



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÕES DE UMA NOVA PROTEASE E UMA
ENDOGLUCANASE DO FUNGO *Pleurotus djamor* PLO13**

MONIZY DA COSTA SILVA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões Tabuleiro dos Martins 57072-970 - Maceió – AL

MONIZY DA COSTA SILVA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÕES DE UMA NOVA PROTEASE E UMA
ENDOGLUCANASE DO FUNGO *Pleurotus djamor* PLO13**

Defesa de tese de doutorado apresentada ao programa de Pós- Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial da obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Prof.º Dr.º Hugo Juarez Vieira Pereira

MACEIÓ- AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586p Silva, Monizy da Costa.
Produção, purificação, caracterização e aplicações de uma nova protease e uma endoglucanase do fungo *Pleurotus djamor* PLO13 / Monizy da Costa Silva. – 2023.
171 f. : il., graf., tabs. color.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 128-164.
Anexos: f. 166-171.

1. Enzimas hidrolases. 2. Fermentação - Estado sólido. 3. Purificação.
4. Aplicações biotecnológicas. I. Título.

CDU: 606:582.28



Universidade Federal de Alagoas
(UFAL) Instituto de Química e
Biotecnologia (IQB)
Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia
Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C.
Simões, Maceió - AL, 57072-970,
Brasil. www.qui.ufal.br // Tel: (82)
3214-1384



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **MONIZY DA COSTA SILVA**, intitulada: “**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE UMA NOVA PROTEASE E UMA ENDOGLUCANASE DO FUNGO *Pleurotus djamor* PLO13.**”, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 30 de outubro de 2023, às 14h, por meio de *videoconferência*.

Maceió, 30 de outubro de 2023.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente:
 **ALDENIR FEITOSA DOS SANTOS**
Data: 13/11/2023 10:32:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. ALDENIR FEITOSA DOS
SANTOS
Examinador Externo à Instituição,
UNEAL/CESMAC

Documento assinado digitalmente:
 **TICIANO GOMES DO NASCIMENTO**
Data: 15/11/2023 21:59:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. TICIANO GOMES DO
NASCIMENTO
Examinador Externo ao Programa,
UFAL

Documento assinado digitalmente:
 **RUTH RUFINO DO NASCIMENTO**
Data: 15/11/2023 14:02:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. RUTH RUFINO DO
NASCIMENTO
Examinadora Interna, UFAL

Documento assinado digitalmente:
 **FRANCIS SOARES GOMES**
Data: 31/10/2023 13:58:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. FRANCIS SOARES GOMES
Examinador Interno, UFAL

Documento assinado digitalmente:
 **HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA**
Data: 31/10/2023 13:50:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA
Presidente

*Dedico esse trabalho aos meus pais!
Obrigada por toda dedicação que tiveram comigo!
Vocês fazem parte da realização desse sonho!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter segurado em minhas mãos nos momentos de dor e angústias, por ter me sustentado e me dado forças para continuar. Por sua presença viva em minha vida me mostrando que nunca estive só.

Aos meus pais, nem tenho palavras para agradecer. Eles são o que eu tenho de mais valioso nessa vida. Obrigada por todo carinho, pela dedicação, pelas noites que passaram em claro para cuidar de mim. Sou grato por todo ensinamento e amor que recebo diariamente e por entenderem a minha ausência. Se hoje sou essa pessoa, saiba que devo a vocês. A vocês dedico o que tenho de melhor, meu AMOR.

Agradeço as minhas irmãs, Michelly Costa, Míriam Costa e Tatiane Costa (em memória), por cuidarem dos nossos pais, por todo amor a me transmitido, por nossa amizade e companheirismo. Costumo dizer que somos abençoadas por termos pais como os nossos e vivermos em união, principalmente nos momentos difíceis. Amo muito vocês!

Agradeço meus sobrinhos, Francielly, Mirelly, Valentina, Thayná (em memória) e Matheus, por todo amor e carinho. Saiba que me orgulho muito de vocês, “meus filhos”!

Agradeço aos meus cunhados, Francisco e Cícero, e aos demais familiares e amigos, por me ajudarem sempre que preciso.

Não poderia deixar de agradecer a pessoa que me convidou a conhecer o laboratório e essa área tão fascinante, Ricardo Costa. Como sempre falo, ele é um ser de luz. Agradeço por sempre está comigo, me ajudando, me auxiliando, segurando minha mão, me dando forças para prosseguir, me mostrando que é possível. Obrigada por ter estado ao meu lado nas várias noites que passamos em claro no laboratório. Sou grata a Deus por sua vida!

Agradeço a minha amiga e irmã, Stella, pela confiança, carinho, respeito. Por ter compartilhado das noites em claro, assim como com Ricardo. Pelas risadas e confiabilidade.

Agradeço a minha amiga e parceira de laboratório, Marta, Foi ótimo compartilhar os momentos contigo. Obrigada pela parceria, pela troca de experiências, pelas conversas, lanches, risadas, enfim... você faz parte neste trabalho, nossa parceria deu muito certo!

Agradeço as minhas parceiras de laboratório, Alessandra (Alê), Amanda e Marta (Lectina), pela disposição e parceria!

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Hugo Juarez, pela paciência e dedicação nos momentos de orientação, pela transmissão dos seus valiosos

conhecimentos. Agradeço também pela compreensão nos momentos que precisei.

Agradeço aos professores, Francis, Edma e Ana Maria, pelo conhecimento transmitido. Bem como aos professores Mario, Sônia, Josué e Luciano pelas parcerias.

Agradeço aos colegas Josiel e Thomás, pela troca de conhecimento e pela parceria.

Agradeço aos colegas de laboratório, Camila, Andrea, Tatielly, Dávida, Marta, Kledson, Keilane, Isadora, Aryane, Edson e demais, pela ajuda nos experimentos, pelas boas conversas e momentos de descontrações.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, professores e demais colaboradores da Escola Estadual Djalma Barros Siqueira, pelo carinho e palavras de incentivo.

Agradeço a Universidade Federal de Alagoas por me permitir concretizar um sonho enquanto profissional.

Agradeço as agências de fomento CNPq e CAPES por prover os recursos que tornaram possível a execução desse projeto de pesquisa.

“Consagra ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”
Provérbios 16:3

RESUMO

A agricultura brasileira, impulsionada pelos avanços tecnológicos e preocupações ambientais, está se tornando um importante motor de desenvolvimento, no entanto é sabido que as atividades agrícolas geram grandes volumes de resíduos e a disposição desses no solo sem tratamento adequado leva à poluição ambiental e a efeitos negativos à saúde. Para tanto, pesquisas estão sendo realizadas a fim de aproveitar essas matérias-primas não comerciais, como a biomassa lignocelulósica, proveniente dos resíduos agroindustriais, para produzir enzimas úteis por meio da fermentação em estado sólido (FES) com fungos, como o *Pleurotus djamor* PLO13. Duas dessas enzimas, proteases e endoglucanases, são amplamente produzidas mundialmente e podem ser aplicadas nas industriais alimentícias, farmacêutica, de cosmético, sucroalcooleira, entre outras. Diante disso, a presente pesquisa tem como objetivo produzir, purificar, caracterizar e aplicar biotecnologicamente as enzimas protease e endoglucanase oriunda do processo de fermentação de estado sólido com o fungo *P. djamor* PLO13. Inicialmente, foi realizado um screening de quatro resíduos agroindustriais, bagaço de cana-de-açúcar (BCA), coroa de abacaxi (CA), fibra de coco (FC) e farelo de trigo (FT) como suporte para o crescimento do fungo, e o FT demonstrou ser o mais eficiente. Posteriormente, foram realizados ensaios enzimáticos para analisar a presença de protease e endoglucanase no extrato, e ambas foram detectadas. O extrato bruto enzimático (EBE) alcançou sua máxima atividade proteolítica sobre a caseína após 120 horas de cultivo. A especificidade da protease foi analisada em relação aos substratos sintéticos específicos e sua inibição na presença de inibidores seletivos, o que permitiu classificá-la como uma serinoprotease semelhante à elastase 2 dependente de íons metálicos, com uma atividade específica de $3.976 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Essa enzima demonstrou alta eficiência na coagulação do leite integral pasteurizado e desnatado reconstituído, tanto na presença quanto na ausência de cálcio, mesmo em temperatura ambiente. O processo de coagulação foi influenciado por fatores como temperatura, tempo e concentração de cálcio. A endoglucanase presente no extrato bruto apresentou temperatura e pH ótimo de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $5,0$, respectivamente, mantendo-se estável em ampla faixa de temperatura e pH, bem como na presença de agentes surfactantes, como SDS, triton X-100, Tween 40 e Tween 80. Sua atividade enzimática foi ativada na presença de EDTA, Na^+ , etanol, propanona, diclorometano, dinitrometano, ureia e β -mercaptoetanol, enquanto Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+} , metanol e heptano reduziram sua atividade. Para a purificação da enzima, empregou-se o processo de fracionamento orgânico seguido de cromatografia de troca aniônica. Foi purificado uma endoglucanase halotolerante e halofílica, com massa molecular de aproximadamente 26 kDa. A enzima purificada apresentou temperatura e pH ótimo de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $5,0$, respectivamente e mostrou-se estável entre 30 a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, e pH de $3,0$ a $10,0$. Ademais, a atividade enzimática foi ativada pela presença de EDTA e Mn^{2+} , enquanto a presença de Mg^{2+} inibiu sua atividade. Em termos de cinética enzimática, a enzima exibiu um K_m de $0,0997 \pm 0,0063 \text{ mg/ml}$ e um V_{max} de $0,1122 \pm 0,00109 \text{ mol/min/mL}$, indicando sua eficácia na hidrólise de substratos específicos. Esses resultados indicam um alto potencial de aplicação industrial para essas enzimas, especialmente nos setores de laticínios, produção de etanol de segunda geração e fabricação de detergentes, devido à sua estabilidade sob uma ampla gama de condições.

Palavras- chave: Enzimas hidrolases. Fermentação em estado sólido. Purificação. Aplicações biotecnológicas

ABSTRACT

Brazilian agriculture, driven by technological advances and environmental concerns, is becoming an important driver of development, however it is known that agricultural activities generate large volumes of waste and their disposal in the soil without adequate treatment leads to environmental pollution and adverse effects. negative to health. To this end, research is being carried out to take advantage of these non-commercial raw materials, such as lignocellulosic biomass, originating from agro-industrial waste, to produce useful enzymes through solid state fermentation (SSF) with fungi, such as *Pleurotus djamor* PLO13. Two of these enzymes, proteases and endoglucanases, are widely produced worldwide and can be applied in the food, pharmaceutical, cosmetics, sugar and alcohol industries, among others. Therefore, the present research aims to produce, purify, characterize and biotechnologically apply the protease and endoglucanase enzymes from the solid state fermentation process with the fungus *P. djamor* PLO13. Initially, a screening of four agro-industrial residues was carried out, sugarcane bagasse (BCA), pineapple crown (CA), coconut fiber (FC) and wheat bran (FT) as support for the growth of the fungus, and FT proved to be the most efficient. Subsequently, enzymatic assays were carried out to analyze the presence of protease and endoglucanase in the extract, and both were detected. The crude enzymatic extract (EBE) reached its maximum proteolytic activity on casein after 120 hours of cultivation. The specificity of the protease was analyzed in relation to specific synthetic substrates and its inhibition in the presence of selective inhibitors, which allowed it to be classified as a serine protease similar to metal ion-dependent elastase 2, with a specific activity of 3,976 U.mg⁻¹. This enzyme demonstrated high efficiency in the coagulation of pasteurized whole and reconstituted skimmed milk, both in the presence and absence of calcium, even at room temperature. The coagulation process was influenced by factors such as temperature, time and calcium concentration. The endoglucanase present in the crude extract presented an optimum temperature and pH of 50 °C and 5.0, respectively, remaining stable over a wide range of temperature and pH, as well as in the presence of surfactant agents, such as SDS, triton X-100, Tween 40 and Tween 80. Its enzymatic activity was activated in the presence of EDTA, Na⁺, ethanol, propanone, dichloromethane, dinitromethane, urea and β-mercaptoethanol, while Mg²⁺, Ca²⁺ and Cu²⁺, methanol and heptane reduced its activity. To purify the enzyme, the organic fractionation process followed by anion exchange chromatography was used. A halotolerant and halophilic endoglucanase was purified, with a molecular mass of approximately 26 kDa. The purified enzyme had an optimum temperature and pH of 50 °C and 5.0, respectively, and was stable between 30 and 70 °C, and a pH of 3.0 to 10.0. Furthermore, the enzymatic activity was activated by the presence of EDTA and Mn²⁺, while the presence of Mg²⁺ inhibited its activity. In terms of enzymatic kinetics, the enzyme exhibited a Km of 0.0997 ± 0.0063 mg/ml and a Vmax of 0.1122 ± 0.00109 mol/min/mL, indicating its effectiveness in the hydrolysis of specific substrates. These results indicate a high potential for industrial application for these enzymes, especially in the dairy, second-generation ethanol production and detergent manufacturing sectors, due to their stability under a wide range of conditions.

Keywords: Hydrolase enzymes. Solid state fermentation. Purification. Biotechnological applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	26
Figura 2- Representação esquemática: A- Fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular de vegetais. B- Estrutura molecular da celulose.....	27
Figura 3- Esquema da estrutura do grão de trigo.....	32
Figura 4- Representação do fungo <i>Pleurotus djamor</i> PLO13. Em A e B: hifas (aumentadas em 20 e 40 vezes), em C e D: septos (aumentadas em 20 e 40 vezes) e em E: fungo cultivado em bagaço de cana-de- açúcar.	36
Figura 5- Fermentação em estado sólido utilizando resíduo de trigo umedecido como meio de cultivo para o fungo <i>P. djamor</i> PLO13.....	38
Figura 6- Crescimento de fungos utilizando substratos sólidos	41
Figura 7- Aplicações Enzimáticas nos setores Industriais em 2015.....	43
Figura 8- Mecanismo de atuação das Endopeptidases e Exopeptidases	44
Figura 9- Aplicações de protease em vários setores industriais	47
Figura 10- Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico.....	54
Figura 11- Resíduos agroindustriais utilizados como meio de cultivo. Em A: fibra de coco (FC), B: bagaço de cana-de-açúcar (BCA), C: coroa de abacaxi (CA) e D: farelo de trigo (FT).....	64
Figura 12- Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri em meio BDA.....	65
Figura 13- Perfil da produção de endoglucanase (U/mL) em fermentações em estado sólido por <i>P. djamor</i> PLO13, com fibra de coco (FC), bagaço de cana-de-açúcar (BCA), coroa de abacaxi (CA) e farelo de trigo (FT), a 27°C e umidade adequada para cada resíduo. A- Concentração de 2.7 mg/ mL e B- Concentração de 5.4 mg/ mL.	76
Figura 14- Temperatura ótima: Endoglucanase presente no EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0) em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 50°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplica.....	79
Figura 15- Perfil de termoestabilidade da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata.....	80
Figura 16- pH ótimo: Atividade da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo, em diferentes pHs (a atividade mais alta obtida em pH 5 foi tomada como 100%).Os experimentos foram realizados em triplicata	81
Figura 17- Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata.....	82
Figura 18- Atividade da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes sais metálicos (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).....	83
Figura 19- : Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo. A atividade da CMCase foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima purificada sem NaCl foi tomada como 100% - controle).	85
Figura 20- Atividade da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes surfactantes (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de	

aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).....	86
Figura 21- Atividade da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes agentes desnaturantes (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).....	88
Figura 22- Atividade da endoglucanase do EBE de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes solventes orgânicos (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).....	89
Figura 23-Atividade para Endoglucase das frações da precipitação salina e orgânica do extrato bruto obtido a partir da FES, com o fungo <i>P. djamor</i> PLO13. A atividade contida no controle foi atribuída como 100%. A-Precipitação salina- Endoglucanase; B- Precipitação orgânica- Endoglucanase	91
Figura 24- Eletroforese: SDS-PAGE (12%) das precipitações salinas e orgânica a do extrato bruto obtido a partir da FES, com o fungo <i>P. djamor</i> PLO13. A eletroforese foi processada avoltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie. Em A: Precipitação Salina (EB- Extrato bruto, 1- F20 %, 2- F40 %, 3- F60 %, 4- F80 % e 5- F100 %.) e em B: Precipitação Orgânica (EB- Extrato bruto, 1- F20 %, 2- F40 %, 3- F60 %, 4- F80 %, 5- F100 % e 6- F100 com PEG).....	93
Figura 25- Metodologia para concentração da atividade endoglucanásica da fração 100 % obtida na precipitação orgânica do extrato bruto obtido a partir da FES, com o fungo <i>P. djamor</i> PLO13. A atividade contida em F100% foi atribuída como 100 %. (F80-100% PEG- fração concentrada com polietilenoglicol, F80-100% ROT- fração rotoevaporada e F80-100% LIOF- fração liofilizada).....	94
Figura 26- Perfil cromatográfico do isolamento da endoglucanase produzida pelo fungo <i>P. djamor</i> PLO13 em cromatografia de troca iônica (CM-SEPHAROSE).....	95
Figura 27-Perfil cromatográfico do isolamento da endoglucanase produzida pelo fungo <i>P. djamor</i> PLO13 em cromatografia de troca iônica (DEAE-SEPHAROSE).....	97
Figura 28- Análise do perfil de proteínas em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata: Perfil de proteínas em gel de poliacrilamida. Canaleta 1: Marcador de massa molecular, canaleta 2: extrato bruto, canaleta 3: fração 80 100% do fracionamento etanólico, canaleta 4: Endoglucanase pura.	99
Figura 29- Temperatura ótima: Endoglucanase pura de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0) em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 50°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata.....	100
Figura 30- Perfil de termoestabilidade da endoglucanase pura de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata.....	102
Figura 31- pH ótimo: Atividade de endoglucanase pura de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo, em diferentes pHs (a atividade mais alta obtida em pH 5 foi tomada como 100%).Os experimentos foram realizados em triplicata	103
Figura 32- Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase pura de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata.....	104
Figura 33- Atividade da endoglucanase pura de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes sais metálicos (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivo: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).	106
Figura 34- Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da da endoglucanase	

pura de <i>P. djamor</i> PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo. A atividade da CMCase foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima purificada sem NaCl foi tomada como 100% - controle).....	107
Figura 35-Análise da curva de Michaelis-Menten da endoglucanase isolada do <i>P. Djamor</i> PLO13.....	108
Figura 36- Aspectos das colônias de <i>P. djamor</i> PLO 13 crescidas em cultura no interior de placa de Petri em meio BDA.	112
Figura 37- Zimograma: A- substrato caseína e em B- substrato gelatina. As áreas claras indicam onde ocorreu a hidrólise da caseína e da gelatina, respectivamente.....	119
Figura 38- Curva de concentrações de proteínas do EBE (1- 1,875; 2- 60; 3- 30; 4- 15; 5- 7,5; 6- 3,75 mg/ mL ⁻¹ ; e 7- branco). Tempo de coagulação.....	122
Figura 39- A- Reação de coagulação do LDR em 37 °C, após 60 min de reação (1,2 e 3- triplicata da reação e 4- branco). B- Reação de coagulação do LDR em 50 °C, após 45 min de reação (1,2 e 3- triplicata da reação e 4- branco). C- Coagulação do LDR em temperatura ambiente (25 °C), após 120 min de reação	123
Figura 40- Verificação de atividade coagulante por meio de eletroforese em SDS-PAGE e quantificação de proteínas: Em A mostra-se o perfil de proteína do leite reconstituído no início e durante o tempo de incubação; em B observa-se a quantificação proteica durante o processo. A reação foi realizada em triplicata	124
Figura 41- Reação de coagulação do leite integral pasteurizado na temperatura de 50 °C, após 30 min de reação (1- Branco; 2, 3 e 4- Triplicata)	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização da palha/farelo de trigo por diferentes autores	32
Tabela 2- Principais vantagens e desvantagens do emprego da FES e FS para a produção de enzimas.	37
Tabela 3- Principais gêneros fungi utilizados em FES para a produção de enzimas	39
Tabela 4- Etapas do processo de FES.....	41
Tabela 5 - Proteases com aplicações terapêuticas.	51
Tabela 6- aplicações industriais das enzimas lignocelulolíticas.....	57
Tabela 7- Massa em gramas de (NH ₄) ₂ SO ₄ por cada mL de amostra utilizada nas frações da Precipitação salina.....	69
Tabela 8- Composição química do farelo de trigo in natura. Abreviaturas: Fibra detergente neutra em FDN e fibra detergente ácida FDA	74
Tabela 9- Resumo da purificação da endoglucanase de <i>Pleurotus djamor</i> PLO13	98
Tabela 10- Composição química do farelo de trigo <i>in natura</i>	117
Tabela 11- Porcentagem de inibição das atividades caseinolítica e elastolítica na presença de diferentes inibidores de protease.....	120

LISTA DE ABREVIACÕES SIGLAS, E SÍMBOLOS

aw	Atividade de água
BDA	Ágar batata dextrose
BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CBM	Módulo de Ligação a carboidratos
CEL	Celulose
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
CMC	Carboximetilcelulose
CA	Coroa de abacaxi
DL-BApNA	N α -Benzoyl- DL -arginine 4-nitroanilide hydrochloride
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DTT	Dithiothreitol
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FT	Farelo de trigo
FC	Fibra de coco
FES	Fermentações em estado sólido
FS	Fermentação submersa
g	Gramas
GEE	Gases de efeito estuda
GH	O- glicosíl hidrolases
GMP	Glicomacropéptido
HC	hemicelulose
HCL	Ácido clorídrico
LIG	Lignina

IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry- União Internacional de Química Pura e Aplicada
kDa	Quilo dalton
kg/ha	Quilograma por hectare
LEU	L-Leu-Pna
mg/mL	Miligramma por mililitro
MS	Matéria seca
mm	Milimetro
mM	Milimolar
Met	Metionina
Min	Minutos
mV	Milivolt
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
nm	Nanômetro
PB	proteína bruta
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	N-Suc-LPhe-Pna
Phe	Fenilalanina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
p/v	Peso por volume
rDNA	DNA recombinante
R\$	Reais
SBTI	Inibidor de Tripsina da Soja
SDS	Dodecil- sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UFV	Universidade Federal de Viçosa

UI	Unidade internacional
UI/g	Unidades internacional por grama
U/ml	Unidade enzimática por mililitro
US\$	Dólar Americano
v/v	Volume por volume
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μL	Microlitros

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIACÕES SIGLAS, E SÍMBOLOS	13
INTRODUÇÃO.....	21
CAPITULO 01	24
Revisão da Literatura.....	24
1. REFERENCIAL TEÓRICO	25
1.1 Biomassa lignocelulósica	25
1.2. Resíduos agroindustriais: Características gerais e utilização biotecnológica	27
1.2.1 Resíduo da cana-de-açúcar	29
1.2.2 Resíduo do coco.....	30
1.2.3 Resíduo do abacaxi.....	30
1.2.4 Resíduo do trigo.....	31
1.3 Utilização de fungos para a produção de enzimas	33
1.3.1 Gênero <i>Pleurotus</i>	34
1.3.1.1 <i>Pleurotus djamor</i>	35
1.4 Obtenção de enzimas a partir do processo de fermentação em estado sólido 36	
1.5 Enzimas: Classificações gerais e aplicações industriais	42
1.5.1 Proteases	43
1.5.1.1 Serinoproteases.....	45
1.5.2 Aplicações biotecnológicas das proteases	46
1.5.2.1 Proteases na indústria de detergente.....	47
1.5.2.2 Proteases na Indústria de couro.....	49
1.5.2.3 Proteases na Indústria Farmacêutica	50
1.5.2.4 Proteases na indústria de alimentos.....	51
1.5.3 Celulase	53
1.5.3.1 Endoglucanase.....	55
1.5.4 Aplicações biotecnológicas das enzimas celulolíticas.....	56
1.5.4.1 Celulases na indústria de papel	57
1.5.4.2 Celulases na indústria têxtil.....	58
1.5.4.3 Produção de Biocombustível.....	58
1.6 Objetivos	61

1.6.1	Objetivo Geral	61
1.6.2	Objetivos específicos	61
1.6.2.1	Enzima Endoglucanase	61
1.6.2.2	Protease	61
CAPITULO 02		62
Endoglucanase		62
2.	MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1	Reagentes e Soluções	63
2.2	Obtenção e preparo dos resíduos	63
2.3	Preparo do inóculo	64
2.4	Perfil fermentativo	65
2.5	Fermentação em estado sólido	65
2.6	Extração enzimática	66
2.7	Atividade endoglucanásica	66
2.8	Determinação da concentração de proteínas	67
2.9	Caracterização bioquímica da endoglucanase presente no extrato bruto enzimático (EBE)	67
2.9.1	Temperatura ótima e termoestabilidade	67
2.9.2	pH ótimo e estabilidade ao pH	67
2.9.3	Efeito da influência de íons na atividade enzimática	68
2.9.4	Efeito sob adição de surfactantes, solventes orgânicos e agentes desnaturantes	68
2.9.5	Halotolerância	68
2.10	Estratégias de Purificação de Proteínas	69
2.10.1	Fracionamento salino de proteínas com sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ ...	69
2.10.2	Precipitação de proteínas com solvente orgânico (etanol)	69
2.10.3	Metodologia para concentração da amostra	70
2.10.3.1	Utilização de Polietilenoglicol (PEG)	70
2.10.3.2	Rotoevaporação e Liofilização da Amostra	70
2.10.4	Eletroforese (SDS-PAGE)	70
2.10.5	Cromatografias utilizadas no processo de purificação	71
2.10.5.1	Troca-iônica: CM	71
2.10.5.2	Troca-iônica: DEAE Sepharose	71
2.11	Caracterização bioquímica da endoglucanase pura	72
2.11.1	Temperatura ótima e termoestabilidade	72
2.11.2	pH ótimo e estabilidade ao pH	72
2.11.3	Efeito da influência de íons na atividade enzimática	72

2.11.4	Halotolerância.....	73
2.11.5	Determinação das constantes cinéticas.....	73
2.12	Resultados e discussões.....	74
2.12.1	Caracterização estrutural dos resíduos orgânicos.....	74
2.12.2	Fermentação em estado sólido e perfil fermentativo diferentes meios de cultura. 75	
2.12.3	Caracterização do extrato	78
2.12.3.1	Temperatura ótima e termoestabilidade	78
2.12.3.2	pH ótimo e estabilidade ao pH	81
2.12.3.3	Efeito da adição de sais	83
2.12.3.4	Halotolerância	84
2.12.3.5	Efeito da adição de solventes orgânicos, detergentes e agentes desnaturantes	86
2.12.4	Técnicas de pré- purificação para proteínas: Precipitação com sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ e com solvente orgânico (etanol).....	90
2.12.5	Perfil proteico do extrato e precipitações salina e orgânica	92
2.12.6	Concentração da amostra (F100 %).....	93
2.12.7	Cromatografia líquida.....	95
2.12.7.1	Cromatografia de troca-iônica catiônica: CM-SEPHAROSE.....	95
2.12.7.2	Cromatografia de troca-iônica aniônica: DEAE-SEPHAROSE	96
2.12.8	Eletroforese SDS-PAGE.....	98
2.12.9	Caracterização bioquímica da endoglucanase pura.....	100
2.12.9.1	Temperatura ótima e termoestabilidade	100
2.12.9.2	pH ótimo e estabilidade ao pH	103
2.12.9.3	Efeito da adição de sais	105
2.12.9.4	Halotolerância	106
2.12.9.5	Determinação das constantes cinéticas	108
CAPITULO 03		110
Elastase 2 símile		110
3	MATERIAL E MÉTODOS	111
3.1	Obtenção e preparo do resíduo agroindustrial: Farelo de trigo.....	111
3.2	Preparo do inóculo	111
3.3	Fermentação em estado sólido (FES)	112
3.4	Extração enzimática.....	112
3.5	Ensaio realizado com a protease coagulante	113
3.5.1	Atividade Proteolítica (caseinolítica)	113
3.5.2	Avaliação da atividade proteolítica para elastase 2 símile, quimi tripsina e	

tripsina	113
3.5.3	Inibição da protease presente no extrato..... 113
3.5.4	Zimografia com caseína e gelatina 114
3.5.5	Determinação da concentração de proteínas..... 114
3.6	Aplicação enzimática da protease na coagulação do leite e estudo das condições de coagulação 114
3.6.1	Ensaio de coagulação e de atividade de coagulação 114
3.6.2	Análise da concentração proteica utilizada na coagulação..... 115
3.6.3	Análise do tempo e da temperatura de coagulação..... 115
3.6.4	Verificação da hidrólise de caseína do leite desnatado por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis 115
3.6.5	Ensaio de desnaturação térmica..... 116
3.6.6	Estudo do efeito da concentração de cálcio sobre a coagulação do leite 116
3.6.7	Utilização de EBE na coagulação do leite integral pasteurizado (LIP).. 116
3.7	Resultados e Discussões 117
3.7.1	Caracterização estrutural do farelo de trigo..... 117
3.7.2	Preparo do extrato enzimático e verificação da atividade caseinolítica e dos inibidores 118
3.7.3	Verificação da atividade caseinolítica frente aos inibidores 119
3.7.4	Aplicação da enzima elastase 2 símile na coagulação do leite e no estudo das condições de coagulação..... 121
3.7.4.1	Análise da concentração de proteínas no EBE utilizadas na coagulação 121
3.7.4.2	Estudo do tempo e da temperatura de coagulação 122
3.7.4.3	Verificação da hidrólise de caseína do leite desnatado por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis..... 123
3.7.4.4	Estudo do efeito da concentração de cálcio na coagulação..... 124
2.1.1.1	Aplicação na coagulação Leite integral pasteurizado- LIP 126
2.	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS 127
4.1	Conclusões em relação a atividade endoglucanásica 127
4.2	Conclusões em relação aos estudos da atividade proteolítica: 127
4.3	Perspectivas 127
5	REFERÊNCIAS 128
ANEXOS 165

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, temos testemunhado um notável aumento na pesquisa voltada para o desenvolvimento de tecnologias alternativas, com foco na utilização de matérias-primas sem valor comercial, isso inclui resíduos agroindustriais, muitas vezes descartados de maneira inadequada, resultando em diversos impactos ambientais significativos e efeitos negativos à saúde (DE CARVALHO et al., 2023; LEITE et al., 2021; CAVALCANTE et al., 2018; DARONCH et al., 2015).

A biomassa lignocelulósica emerge como uma matéria-prima particularmente promissora, sendo a mais abundante e renovável do planeta (DURMAZ et al., 2023; AMINI; VALS; RONCERO, 2021; ISIKGOR; BECER, 2015; ZHOU et al., 2011). Ela desempenha um papel fundamental na transição para uma economia mais sustentável e menos dependente de combustíveis fósseis (SILVA, 2019), sendo produzida principalmente nas indústrias agro, alimentícia e de processamento de alimentos, com uma estimativa global de 1,3 bilhão de toneladas por ano (PRASAD; PADHI; GHOSH, 2023).

Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são celulose, hemicelulose e lignina, sendo a celulose um polissacarídeo formado por ligações glicosídicas β -1,4 entre monômeros de glicose (KUMLA et al., 2020; SILVA, 2020; HAN et al., 2019; SILVA, 2019; CAVALCANTE et al., 2018). Esses polímeros podem ser utilizados na produção de diversos produtos com alto valor agregado, como biocombustíveis, enzimas e ácidos orgânicos, através de processos químicos ou da utilização de microorganismos (PRASAD; PADHI; GHOSH, 2023; AHMED et al., 2022).

Os microrganismos desempenham um papel fundamental na produção global de enzimas, destacando-se por suas vantagens sobre fontes animais e vegetais, bem como por sua facilidade de obtenção e estabilidade dessas biomoléculas (LIU; KOKARE, 2023; EJAZ; SOHAIL; GHANEM, 2021; KOUR et al., 2019). Essa facilidade resulta de vários fatores favoráveis, incluindo um curto tempo de geração e a possibilidade de manipulação fisiológica e genética (VERMELHO et al., 2008; DE CASTRO et al., 2015). Rigo et al. (2021) destacam que os microrganismos contribuem com mais de 80% da produção de enzimas, dos quais os fungos filamentosos e as leveduras representam mais de 50% desse cenário.

Os fungos filamentosos, em particular, são amplamente utilizados em pesquisas

direcionadas à obtenção de enzimas industriais devido à sua habilidade de secretar enzimas quando cultivados em estado sólido ou submerso (RIGO et al., 2021). Entre esses fungos, os do gênero *Pleurotus* se destacam, pois possuem um complexo enzimático composto por várias hidrolases, incluindo celulase, hemicelulase, ligninase, lacase, celobiase e proteases (LOPES et al., 2020; VELEZ et al., 2019; YANG et al., 2016). Além de serem apreciados por suas aplicações gastronômicas, esses fungos são reconhecidos por suas propriedades medicinais e seu potencial em aplicações biotecnológicas e ambientais (MELANOURI; DEDOUSI; DIAMANTOPOULOU, 2022; LOPES et al., 2020; VELEZ et al., 2019; YANG et al., 2016).

É relevante destacar que muitas pesquisas utilizam resíduos agroindustriais como substratos para o cultivo de fungos filamentosos por meio do processo de fermentação em estado sólido (FES) (DE OLIVEIRA MELO et al., 2023; DOS SANTOS et al., 2023; FERREIRA et al., 2023; MELANOURI; DEDOUSI; DIAMANTOPOULOU, 2022; LEITE et al., 2021; ROCHA et al., 2021; SANTOS et al., 2018). Essa técnica tem sido reconhecida como uma alternativa vantajosa para a produção de enzimas, devido à sua baixa demanda de água, à geração reduzida de resíduos tóxicos, à operação simplificada e ao alto rendimento produtivo. A FES procura criar um ambiente que simule as condições naturais para o crescimento dos microrganismos (GAMA et al., 2020; MARQUES et al., 2018; OLIVEIRA, 2018).

As enzimas podem ser aplicadas a diversos setores industriais devido à sua alta eficiência reacional, especificidade de substrato e biodegradabilidade, em contraste com os catalisadores sintéticos (SANTOS, 2020; SILVA, 2019). Entre as enzimas mais utilizadas na biotecnologia, destacam-se as hidrolases, que incluem proteases e celulases.

As proteases, por exemplo, representam cerca de 60% de todo o mercado de enzimas (ARRUDA, 2017; SHARMA et al., 2019) e observa-se um crescimento exponencial no mercado global de proteases, com expectativas de atingir US\$ 3 bilhões até 2024 (NAVEED et al., 2020). Essas enzimas são amplamente empregadas em diversos setores industriais, como laticínios, produção de queijo, detergentes, couro, alimentos, recuperação de prata de filmes fotográficos, farmacêutica e biorremediação (DE SOUZA, 2016; FAZILAT, 2016; WAHAB; AHMED, 2018).

A celulase é composta por um complexo de três enzimas: endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, que trabalham em sinergia. Essas enzimas possuem grande potencial biotecnológico e são responsáveis pela hidrólise da celulose, quebrando as ligações β -1,4 glicosídicas e produzindo glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos como

produtos (LEE et al., 2018; WANG et al., 2018; SILVA, 2020; PATEL; SHAH, 2021). As endoglucanases, em particular, são altamente valorizadas devido às suas inúmeras aplicações industriais em setores como têxtil, celulose e papel, panificação, detergentes, bebidas, alimentos, cervejarias, produção de ração animal e biocombustíveis (KARNCHANATAT et al., 2009; DE ALMEIDA et al., 2013; SHARMA et al., 2016; BASHIROVA et al., 2019).

Portanto, a utilização de resíduos da agroindústria como meio de cultivo para o crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, a produção de enzimas, apresenta vantagens tanto ambientais quanto econômicas, visto que se baseia em metodologias que aproveitam materiais de baixo valor agregado, como substratos abundantes. Ressalta-se ainda a importância do conhecimento das características bioquímicas de novas enzimas, a fim de analisar suas possíveis aplicações biotecnológicas (SANTOS, 2020; SILVA, 2019).

CAPITULO 01

Revisão da Literatura

1. REFERENCIAL TEÓRICO

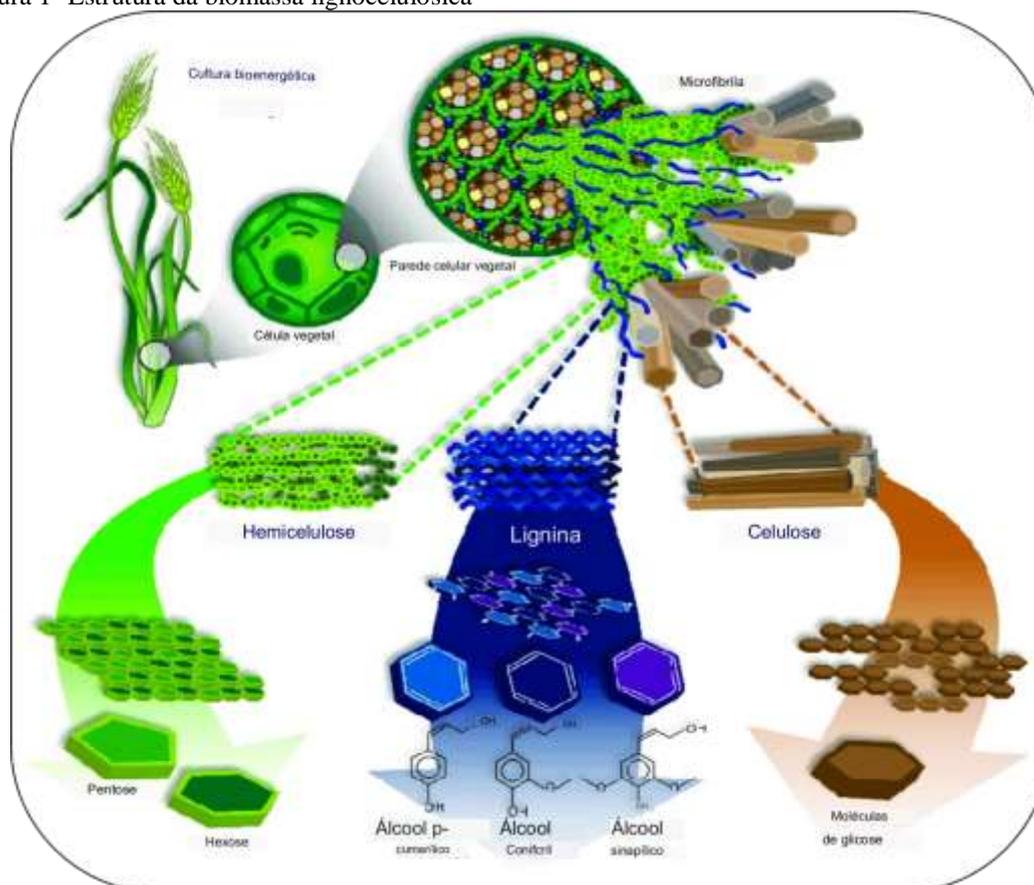
1.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é amplamente reconhecida como a matéria-prima mais abundante e renovável em nosso planeta (DURMAZ et al., 2023; AMINI; VALS; RONCERO, 2021; ISIKGOR; BECER, 2015; ZHOU et al., 2011). Devido à sua disponibilidade em grande escala, é vista como uma fonte potencial de carbono sustentável (DURMAZ et al., 2023; JASWAL; SINGH; MONDAL, 2022). Esta biomassa possui várias vantagens, como baixo custo, alta disponibilidade no mercado e, crucialmente, não compete com alimentos humanos (SILVA, 2019).

É produzida principalmente nas indústrias agro, alimentícia e de processamento de alimentos, com uma estimativa global de 1,3 bilhão de toneladas por ano (PRASAD; PADHI; GHOSH, 2023). É notório mencionar sua alta expressão nos resíduos agroindustriais, como madeira, resíduos de celulose, materiais herbáceos e resíduos sólidos industriais (Vieira, 2020). Em linhas gerais, a biomassa residual proveniente da agroindústria apresenta uma composição rica em lignocelulose, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, unidas por ligações covalentes, em proporções aproximadas de 40-60%, 20-40% e 10-25%, respectivamente (HAN et al., 2019) (Figura 1). além de pequenas quantidades de componentes como cinzas, proteínas, pectinas, minerais, amido, entre outros. É importante destacar que essas proporções podem variar dependendo de fatores sazonais e da idade da planta (RIBEIRO, 2020; SILVA, 2020).

A celulose é o componente predominante na biomassa vegetal, encontrando-se presente na parede celular de todas as plantas. Em plantas lenhosas, ela compreende aproximadamente 85% da biomassa (BEHERA et al., 2017; CORALES et al., 2015). Estudos revelam que a celulose desempenha um papel de relevância não apenas no contexto ecológico, mas também na esfera econômica. De acordo com Moura e colaboradores (2018), em 2015, a indústria celulolítica movimentou cerca de US\$ 572 milhões por tonelada exportada em todo o mundo, com o Brasil liderando as exportações, contribuindo com mais de 10 milhões de toneladas.

Figura 1- Estrutura da biomassa lignocelulósica

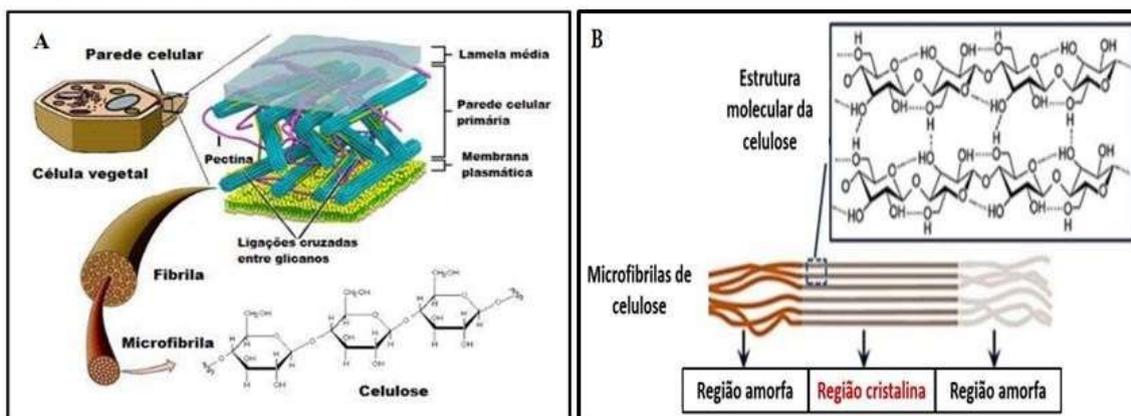


Fonte: Adaptada de Silva (2018)

As microfibrilas de celulose, o principal componente da biomassa vegetal, são polissacarídeos de cadeia longa, formados a partir de resíduos de β -glicose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas e estão incorporados em uma matriz composta por hemicelulose e lignina. Essa estrutura confere estabilidade e proteção à parede celular contra ataques microbianos e enzimáticos (Figura 2A) (KUMLA et al., 2020; SILVA, 2020; SILVA, 2019; CAVALCANTE et al., 2018).

As moléculas de celulose apresentam duas regiões distintas. Uma delas é altamente organizada e rígida, conhecida como região cristalina, estruturada por meio de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, conferindo resistência e impermeabilidade, inclusive à água. A outra região é desordenada ou amorfa, exibindo maior flexibilidade devido ao menor número de ligações de hidrogênio, o que possibilita maior hidratação e acesso a enzimas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2008; BARBOSA et al., 2020; VIEIRA, 2020) (Figura 2B).

Figura 2- Representação esquemática: A- Fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular de vegetais. B- Estrutura molecular da celulose



Fonte: A- Adaptado de Silva (2020); B- Adaptado de Ribeiro (2020).

A biomassa lignocelulósica pode ser convertida em uma variedade de produtos com valor agregado, incluindo biocombustíveis, enzimas e ácidos orgânicos, por meio de processos químicos comerciais ou utilizando microrganismos produtores de enzimas (CHATURVEDI; VERMA 2013; BALA; SINGH, 2017; CHYLENSKI et al., 2017; ROCHA-MARTÍN et al., 2017).

Em virtude da complexidade das estruturas presentes na biomassa lignocelulósica e de sua natural resistência à degradação enzimática, torna-se imperativo conduzir etapas de pré-tratamento. Esse procedimento é essencial para viabilizar o uso desses materiais em processos biotecnológicos, pois tem a capacidade de remover a lignina e aumentar a superfície de contato, tornando assim mais acessível e eficiente a atuação das enzimas (RAVINDRAN et al., 2018; LINI et al., 2018). Atualmente, uma variedade de metodologias de pré-tratamento é empregada nos processos de hidrólise enzimática. Essas metodologias abrangem técnicas físicas, químicas, físico-químicas, biológicas e abordagens híbridas (BARBOSA et al., 2021).

1.2. Resíduos agroindustriais: Características gerais e utilização biotecnológica

Nos últimos anos, houve um aumento significativo na geração de resíduos agroindustriais, impulsionado pelo crescimento populacional global, o avanço econômico e a expansão dos setores industriais correlatos (DE CARVALHO et al., 2023; LEITE et al., 2021; KUMLA et al., 2020; RAVINDRAN et al., 2018). É crucial destacar que a produção desses resíduos pode resultar em sérios problemas ambientais, como contaminação decorrente de práticas inadequadas de manejo, incluindo queima a céu aberto, abandono ou simples enterro (LEITE et al., 2021; BHARATHIRAJA et al., 2017).

Esses materiais, muitas vezes classificados como "lixo", têm o potencial de serem convertidos em matérias-primas para a produção de produtos de alto valor agregado, como biocombustíveis, enzimas, ácidos orgânicos, biopolímeros, biocarvão, etc (PRASAD; PADHI; GHOSH, 2023; AHMED et al., 2022), por meio de processos químicos convencionais ou pela utilização de microrganismos (CHATURVEDI; VERMA, 2013). É importante destacar que os resíduos agroindustriais possuem elevado potencial energético e servem como excelentes fontes de carbono, podendo ser usados como meio de crescimento para microrganismos e, conseqüentemente, para a produção de enzimas por meio de processos biotecnológicos, como a FES. Isso não apenas reutiliza os subprodutos da agroindústria, mas também gera produtos de alto valor comercial e reduz os impactos ambientais (LEITE et al., 2021; KUMLA et al., 2020).

O Brasil apresenta vantagens significativas para o desenvolvimento industrial baseado em matérias-primas renováveis, devido a sua ampla biodiversidade territorial que favorece a agricultura em grande escala, além de uma diversidade climática que desperta interesse econômico e social no bioprocessamento (COUTINHO, BOMTEMPO, 2010).

Estudos têm demonstrado uma grande variedade de resíduos agroindustriais que podem ser utilizados como substratos em meios de cultivo nos processos de FES. Esses resíduos incluem farelo de trigo, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, fibra de coco, coroa de abacaxi, casca de amendoim, casca de café, lascas e pó de madeira, entre outros (FILIPE et al., 2020; TU et al., 2020; RAVINDRAN et al., 2018; SOCCOL et al., 2017).

Em Alagoas, a agricultura se destaca por uma diversidade de culturas que refletem a adaptabilidade do estado a diferentes tipos de cultivo. Entre as principais culturas agrícolas cultivadas, a cana-de-açúcar ocupa uma posição proeminente, ocupando o primeiro lugar na produção dessa cultura na região nordeste e um dos cinco maiores do país, sendo classificado como um dos maiores produtores de açúcar e etanol (CONAB, 2023; SANTOS, 2023). A mandioca também desempenha um papel significativo, com destaque para a produção de farinha, um elemento essencial na dieta local. Além disso, o estado se destaca na produção de coco, especialmente na variedade verde utilizada na produção de água de coco. A diversificação inclui ainda o cultivo de frutas tropicais como manga, banana, abacaxi, e a produção de grãos como milho e feijão (SANTOS; FORTINI, 2021).

1.2.1 Resíduo da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil durante o período colonial e tornou-se um dos principais insumos agrícolas brasileiros, com grande relevância no cenário internacional para a produção de álcool e açúcar (OGUNYEWO et al., 2021; SANTOS, 2018). A safra de 2023/2024, no cenário nacional, produziu cerca de 653 milhões de toneladas, representando um aumento de 6,9 %, com rendimento de US\$ 12 Bilhões, 31,8% a mais, ao comparar com o mesmo período anterior (CONAB, 2023).

Devido ao seu clima quente e úmido, propício para o cultivo de cana-de-açúcar, Alagoas firmou-se como um dos principais produtores dessa cultura no Brasil. A indústria canavieira desempenha um papel crucial na economia alagoana, responsável por um alto percentual do Produto Interno Bruto (PIB) do estado. Essa influência se estende pelo setor agropecuário, pela indústria e pelos serviços (SANTOS, 2011). Em 2022, Alagoas produziu cerca de 21 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Essa significativa contribuição destaca a relevância estratégica da cana-de-açúcar para a dinâmica econômica de Alagoas, consolidando-a como um pilar essencial do desenvolvimento regional (TOLÊDO, 2023).

Contudo, a produção de cana-de-açúcar gera desafios ambientais significativos devido à geração de resíduos sólidos, como o bagaço de cana-de-açúcar (DE CAVALCANTE et al., 2022). A quantidade de bagaço gerada está diretamente relacionada ao teor de fibra da cana processada, com aproximadamente 46% de fibra e 50% de umidade, resultando em cerca de 260 kg de bagaço por tonelada de cana processada (MENESES et al., 2021).

O bagaço de cana é um resíduo rico em compostos lignocelulósicos, composto por cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina (SILVA, 2022). Embora esse resíduo tenha sido utilizado durante anos na geração de energia e calor, na alimentação de caldeiras no setor, esse aproveitamento não se mostrou suficiente para resolver os problemas ambientais associados a esse resíduo. Portanto, busca-se alternativas que não apenas aproveitem esse material, mas também agreguem valor a ele. Dentre essas alternativas, destaca-se o uso do bagaço de cana em técnicas de fermentação sólida para a produção de enzimas e produção de etanol de segunda geração (SILVA et al., 2023; SANTOS, 2018).

1.2.2 Resíduo do coco

O coco (*Cocos nucifera*) é nativo do sudeste asiático e amplamente cultivado em todo o mundo (XU et al., 2022). No Brasil, devido ao clima tropical e altas temperaturas, há uma alta demanda por coco, tanto para consumo direto quanto para a extração de sua água (DE CAVALCANTE et al., 2022). Em 2022, o país produziu 1.829.612 frutos, gerando uma receita de R\$ 1.600.093,00 e Alagoas contribui com uma produção de 106 mil frutos (IBGE, acessado em 12 de junho de 2023). No entanto, é importante descrever que a cada 250 mL de água de coco consumida, cerca de 1 kg de resíduos é gerado (ROMÃO et al., 2022). A fibra de coco, principal subproduto, quando descartada incorretamente ou queimada, pode causar sérios impactos ambientais (SANTOS, 2022).

A fibra de coco é composta por aproximadamente 5% de solubilidade em água, 3% de pectina, 0,3% de hemicelulose, 46% de lignina e cerca de 2% de cinzas (IGWE; ABIA, 2007). Embora a fibra de coco tenha várias aplicações, como biomassa para produção de energia, construção civil (DE CAVALCANTE, 2022), confecção de cordas, vasos, escovas, tapetes, vassouras, estofados automotivos, artesanato e até tábuas (SANTOS, 2022; LOAIZA; GARCIA; COLORADO, 2019), essas aplicações ainda representam um baixo valor agregado para o resíduo. Portanto, têm sido desenvolvidas outras utilizações, como substrato para crescimento microbiano e produção de enzimas.

1.2.3 Resíduo do abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril) é uma fruta comum em países tropicais, como Brasil e Paraguai, e exibe variações em formatos e composições (NARAYANA; RAO, 2021). Em 2022, nosso país produziu 1.558.201 frutos, que geraram uma receita de R\$ 2.758.106,00, sendo Alagoas responsável pela produção de 48.813 frutos e receita de R\$ 93.568, 00 (IBGE, 2022).

Essa fruta é amplamente consumida e produzida comercialmente, seja em rodela, pedaços ou suco pasteurizado e geleias (SHIVAMATHI et al., 2022). No entanto, o consumo gera resíduos significativos da agroindústria, como as cascas e coroas (ZHANG et al., 2022).

As cascas são frequentemente destinadas a ração animal e à produção de fertilizantes, enquanto as coroas são normalmente descartadas em aterros sanitários, tratadas como resíduos orgânicos (AJAYI et al., 2022). A composição da coroa do abacaxi varia em termos de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e outros componentes, dependendo das condições locais, incluindo tipo de planta, solo e clima (SHIVAMATHI

et al., 2022). Um desafio na utilização desse resíduo é a presença de compostos não celulósicos em alta concentração (CHAWALITSAKUNCHAI et al., 2021). Para superar esse obstáculo, muitas vezes recorre-se a tratamentos superficiais na fibra de abacaxi, como o tratamento alcalino com solução de hidróxido de sódio (NaOH) (DE AZEVEDO et al., 2022).

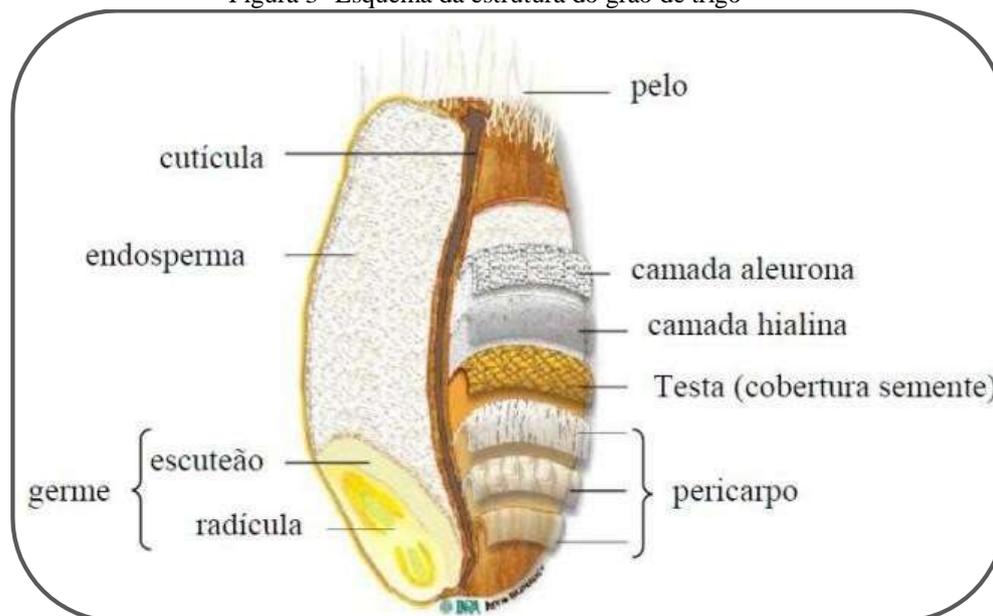
1.2.4 Resíduo do trigo

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma gramínea cultivada globalmente, sendo o cereal de maior produção em todo o mundo, principalmente destinado à alimentação humana e animal (ONIPE et al., 2015). Sua história remonta a cerca de 10.000 anos a.C., quando começou a ser utilizado na Mesopotâmia, contribuindo para o crescimento populacional global desde então (LAMMERS, 2018). De acordo com relatórios da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), responsável pelo monitoramento de assuntos relacionados à produção e comércio de grãos, os estados brasileiros cultivam cerca de 2.739,3 mil hectares deste cereal. O relatório mais recente da CONAB, de maio de 2023, revela que o país alcançou uma produção de trigo equivalente a 2.894kg/ha, totalizando 9.559,5 mil toneladas.

O grão de trigo é predominantemente composto por carboidratos (cerca de 70%), proteínas, lipídios, vitaminas (do complexo B e E), água, micronutrientes e é uma excelente fonte de minerais, como magnésio (BAKKER, 2017; LEÃO, 2013). Vale ressaltar que a composição pode variar dependendo da parte do grão ou das condições de cultivo.

O grão de trigo é composto principalmente por três partes: o farelo, o germe e o endosperma (Figura 3). O farelo de trigo é produzido durante o processo de moagem da farinha e consiste na camada externa da parte comestível do grão de trigo. Sua composição é complexa, com teores médios de celulose (31%), hemicelulose (26%), lignina (24%) e cinzas (7%) (BAKKER, 2017; PAGNUSSATT et al., 2011). O endosperma é uma matriz rica em proteínas e amido, enquanto o germe corresponde à parte embrionária do cereal (SCHEUER et al., 2011). Essa combinação de carboidratos, proteínas, lignina e minerais é responsável pela formação da parede celular do grão de trigo, conferindo-lhe resistência a patógenos, insetos e condições adversas, além de contribuir para sua conservação (SANTALA et al., 2013).

Figura 3- Esquema da estrutura do grão de trigo



Fonte: Adaptado de Leão (2013)

A Tabela 1 relata dados de trabalhos que mostram o percentual de celulose, hemicelulose e lignina presentes no resíduo de palha/farelo de trigo, uma vez que são parâmetros imprescindíveis de avaliação para realizar a caracterização desse substrato.

Tabela 1- Caracterização da palha/farelo de trigo por diferentes autores

RESÍDUO	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	CINZAS (%)	AUTOR
Farelo de trigo	30	24	18	10	Kuhad e Singh (1993)
Farelo de trigo	39	36	10	–	Castro (2010)
Farelo de trigo	31	26	24	7	Scheuer et al. (2011)
Farelo de trigo	10,86	28,88	4,89	–	Azarias et al. (2012)
Palha de trigo	30	50	15	-	Lameira (2013)

Fonte: Adaptado de BAKKER (2017)

Ao analisar os dados da tabela, é evidente que a celulose é o componente mais predominante, seguido pela hemicelulose e a lignina. A principal diferença entre celulose e hemicelulose reside na composição dos monossacarídeos presentes, sendo que a celulose é composta por unidades de glicose ligadas entre si, enquanto a hemicelulose é composta por pentoses e hexoses ligadas entre si. Essa diferença resulta em diferentes graus de polimerização e na presença de regiões cristalinas na celulose, em contraste com a menor polimerização e a presença de regiões amorfas na hemicelulose (LAMEIRA, 2013).

Devido à sua rica composição química, esse resíduo tem sido objeto de pesquisas com o objetivo de desenvolver produtos de alto valor agregado. O farelo de trigo, devido ao baixo teor de lignina e aos elevados teores de celulose e hemicelulose em sua composição, é uma excelente fonte de carbono para a produção de enzimas, tornando-o um recurso valioso para aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizado como suporte para crescimento de fungos filamentosos durante o processo de FES.

1.3 Utilização de fungos para a produção de enzimas

Os microrganismos desempenham um papel preponderante na produção global de enzimas, destacando-se por suas vantagens em relação às fontes animais e vegetais, bem como por sua facilidade de obtenção. Essa facilidade é resultado de diversos fatores, incluindo um curto tempo de geração e a possibilidade de manipulação fisiológica e genética (VERMELHO et al., 2008; DE CASTRO et al., 2015). É importante salientar que as enzimas microbianas apresentam frequentemente elevada estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e a outras condições reacionais, o que favorece a aplicação biotecnológica em diferentes condições (PATEL et al., 2023).

De acordo com Rigo et al. (2021), os microrganismos respondem por mais de 80% da produção mundial de enzimas. Nesse cenário, os fungos filamentosos e as leveduras são os principais contribuintes, representando mais de 50%, enquanto as bactérias contribuem com cerca de 30% desse total. Em contrapartida, fontes animais e vegetais respondem por apenas 8% e 5%, respectivamente, da produção de enzimas.

Um exemplo de microrganismo produtor de enzimas são os fungos de podridão branca. Esses microrganismos têm a capacidade de secretar enzimas oxidativas, como lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, bem como enzimas hidrolíticas, incluindo xilanase, proteases e celulase, através da degradação da biomassa lignocelulósica. O uso desses catalisadores biológicos nas indústrias aumentou significativamente nas últimas décadas, impulsionando um mercado que atingiu um valor estimado de US\$ 8 bilhões (LOPES et al., 2020).

Graças à sua capacidade de secretar enzimas, os fungos filamentosos destacam-se entre os microrganismos mais estudados na busca por enzimas industriais (RIGO et al., 2021). Entre os fungos utilizados em pesquisas para a produção de enzimas capazes de degradar a parede celular vegetal, destacam-se cepas mutantes de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* e *Pleurotus* (SCHNEIDER et al., 2018).

1.3.1 Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus*, conhecido como cogumelos ostra, ocupa o segundo lugar entre os cogumelos comestíveis mais amplamente distribuídos no mundo, ficando atrás apenas do gênero *Agaricus bisporus*. No entanto, no Brasil, sua produção ainda é pequena em comparação com países como a Alemanha, onde *Agaricus bisporus* (*Champignon de Paris*), *Lentinula edodes* (*Shiitake*), *Agaricus blazei* (Cogumelo Piedade), *Pleurotus ostreatus* (Cogumelo Ostra), *Pleurotus sajor-caju* (Cogumelo Gigante) e *Pleurotus ostreatoroseus* (Cogumelo Salmon) são as principais espécies cultivadas (RAMPINELLI, 2009).

Uma das características mais notáveis desses fungos é sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes e substratos. Essa versatilidade torna possível seu cultivo em uma ampla variedade de materiais orgânicos, como serragem, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, farelo de trigo e até mesmo papel reciclado. Essa flexibilidade torna o cultivo desses cogumelos uma opção viável em várias regiões do mundo (LOPES et al., 2020; BANO et al., 2019; YANG et al., 2015; VEGA; FRANCO, 2013; CARVALHO et al., 2012; DAWOUD; EWEIS, 2006).

É relevante destacar que cerca de 80 a 90% da massa desses cogumelos é composta por água, mas eles são excelentes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas (como tiamina, riboflavina e niacina) e minerais, incluindo cálcio, fósforo e ferro. Além disso, possuem baixo teor calórico, com aproximadamente 30 calorias por 100g de matéria seca (BARBOSA et al., 2020; YANG et al., 2015; VELIOGLU; UREK, 2015; CAMARA, 2014).

Esses fungos classificados como de podridão branca, não apenas são apreciados por seu valor gastronômico, mas também são reconhecidos por suas propriedades medicinais. Além disso, apresentam uma série de aplicações biotecnológicas e ambientais que os tornam notáveis no reino dos fungos (MELANOURI; DEDOUSHI; DIAMANTOPOULOU, 2022; LOPES et al., 2020; VELEZ et al., 2019; YANG et al., 2016).

Os cogumelos *Pleurotus* desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica, ajudando a reciclar nutrientes e a manter o equilíbrio dos ecossistemas florestais. Isso os torna importantes não apenas na alimentação humana, mas também na ecologia e no ciclo dos nutrientes em florestas e ambientes naturais (ZÁRATE-SALAZAR et al., 2020).

Outro aspecto a ser considerado é o potencial biotecnológico desses cogumelos. Eles

são fonte de enzimas com diversas aplicações industriais, como celulasas e proteases, que desempenham um papel crucial na produção de biocombustíveis, na indústria têxtil, na agricultura e na biodegradação de resíduos orgânicos (SILVA et al., 2018; CAMARA, 2014).

Estudos científicos têm revelado propriedades medicinais desses cogumelos, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores. Compostos bioativos presentes em fungos do gênero *Pleurotus* têm sido investigados por seu potencial no tratamento de várias doenças, como câncer e doenças cardiovasculares (DOS REIS; SCHENKEL; CAMASSOLA, 2022; SHARMA; SHARMA; TRIPATHI, 2021; BENMRAD et al., 2019; PATEL et al., 2012).

1.3.1.1 *Pleurotus djamor*

Pleurotus djamor é um grupo de cogumelos ligninolíticos pertencentes ao gênero *Pleurotus* e à família Pleurotaceae, encontrados naturalmente em florestas úmidas tropicais e subtropicais em todo o mundo (VELIOGLU; UREK, 2015, COHEN et al., 2002). Esses fungos são classificados como basidiomicetos saprofíticos, pois crescem em biomassa lignocelulósica, degradando a matéria orgânica e, conseqüentemente, produzindo enzimas com alto potencial biotecnológico (MORENO RUIZ et al., 2014).

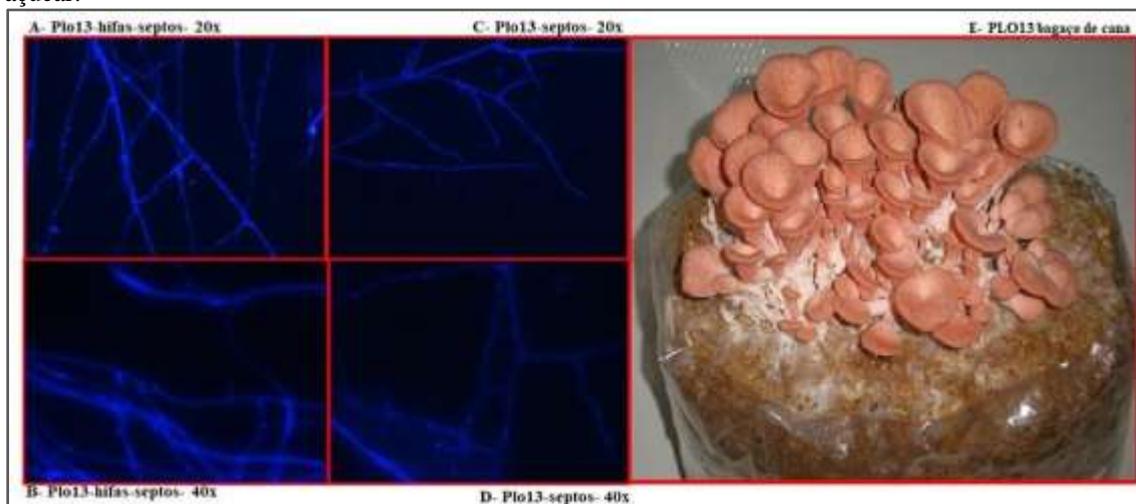
A produção de *Pleurotus djamor* representa uma excelente alternativa nos setores econômico e ambiental, uma vez que pode ser cultivado aproveitando resíduos agroindustriais, reduzindo, assim, os impactos e a poluição ambiental. Os cogumelos deste gênero se reproduzem tanto sexualmente, por meio de esporos, quanto assexuadamente, por multiplicação dos esporos ou de outros fragmentos do basidiocarpo (EIRA, 2003). Eles têm uma aparência semelhante a uma ostra, característica que deu origem ao nome cogumelos ostra (PATEL et al., 2012).

É importante descrever que esta espécie de fungo é pouco documentada na literatura científica quanto a sua produção de proteases, e que não existem relatos, até então observados, sobre a produção ou purificação de endoglucanases por esta espécie.

A Figura 4 ilustra a composição do *Pleurotus djamor* PLO13. As imagens A-D foram registradas com um Microscópio Olympus BX 50 e coradas com calcofluor a partir do crescimento micelial em meio BDA e lignina (20 dias), utilizando o software QColor 3. A imagem E mostra o fungo cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, capturada com uma câmera de celular. Nas imagens A e B, observam-se as hifas ampliadas 20 e 40 vezes, respectivamente. Nas imagens C e D, é possível observar os septos também ampliados 20

e 40 vezes. Por fim, na imagem E, vemos o fungo cultivado no bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 4- Representação do fungo *Pleurotus djamor* PLO13. Em A e B: hifas (aumentadas em 20 e 40 vezes), em C e D: septos (aumentadas em 20 e 40 vezes) e em E: fungo cultivado em bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: fotos cedidas pelo Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (2022)

1.4 Obtenção de enzimas a partir do processo de fermentação em estado sólido

O custo de produção de enzimas é o principal desafio a ser superado para sua aplicação efetiva. Portanto, torna-se crucial analisar os métodos mais eficientes para a produção desses catalisadores biológicos. Na indústria, os processos mais amplamente empregados para a produção de enzimas por microrganismos incluem a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), que se distinguem com base nos parâmetros utilizados (VIEIRA, 2020). Ambas as abordagens possuem suas próprias vantagens e desvantagens. (Tabela 2

Tabela 2- Principais vantagens e desvantagens do emprego da FES e FS para a produção de enzimas.

FATOR	FES	FS
Substrato	Materiais sem custo (produtos residuais)	Materiais muito caros
Suspensão de esporos	Não é necessário	Essencial
Condições assépticas	Não é necessário	Essencial
Umidade	Sem água livre	Necessário meio líquido
Agitação	Muito difícil	Fácil
Controle de processo (T °C, pH)	Difícil	Fácil
Contaminação	Menos chance	Alto risco
Rendimento enzimático	Muito alto	Baixo
Processamento a jusante	Fácil, barato, não demorado	Muito difícil, muito caro
Aumentar a escala	Difícil, novo equipamento de design necessário	Equipamento industrial fácil disponível
Volume e custos do equipamento	Pequenos reatores podem ser usados, baixo custo	Reatores de grande escala necessários, custos muito altos.

Fonte: Adaptado de EL-BAKRY et al. (2015)

Nas últimas décadas, a adoção da FES para a produção de enzimas tem experimentado um elevado crescimento, sendo considerada uma alternativa à fermentação submersa, especialmente quando se trata de microrganismos fúngicos. A FS, em muitos casos, é onerosa, tornando-se frequentemente inviável devido aos seus custos de produção elevados (OLIVEIRA, 2018). Por outro lado, a FES tem surgido como uma técnica altamente vantajosa para a obtenção de enzimas, devido à sua baixa demanda de água, baixa geração de resíduos tóxicos, operação simplificada e alto rendimento produtivo. Isso ocorre porque a FES busca criar um ambiente que simule as condições naturais dos microrganismos (GAMA et al., 2020 e MARQUES et al., 2018).

A FES pode ser definida como um processo biológico em que microrganismos, incluindo bactérias e fungos, crescem sobre suportes sólidos capazes de reter água, como materiais inertes ou substratos insolúveis, que também servem como fonte de nutrientes e energia. Essa técnica é realizada na ausência ou quase ausência de água livre, replicando o ambiente natural de crescimento de muitos fungos, bactérias e leveduras (RIBEIRO,

2020; Vieira, 2020). No entanto, é essencial que o substrato utilizado mantenha a umidade necessária para sustentar o crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos (Figura 5) (GAMA et al., 2020; SILVA et al., 2018; FARINAS et al., 2011; RAHARDJO et al., 2006; COUTO; SANROMÁN, 2006; HOLKER et al., 2004; PANDEY 2003).

Figura 5- Fermentação em estado sólido utilizando resíduo de trigo umedecido como meio de cultivo para o fungo *P. djamor* PLO13



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Com o progresso da biotecnologia na área de enzimas, tem havido um avanço na adoção do método de FES para a produção de enzimas e outros compostos bioativos. Isso resultou no desenvolvimento de um grande número de estudos, como evidenciado na Tabela 3.

É importante destacar que o elevado valor comercial das enzimas é primordialmente atribuído aos substratos empregados na produção, bem como ao crescimento relativamente lento dos fungos (DE BRITO et al., 2017; POLIZELI et al., 2005). Portanto, para alcançar resultados mais eficazes, é fundamental analisar diversos fatores, tais como a seleção adequada do microrganismo e do substrato, o suporte sólido utilizado, o tipo de fermentador, além de considerar variáveis como atividade de água (umidade), temperatura, pH, tamanho das partículas e aeração. Esses aspectos devem ser cuidadosamente estudados antes de iniciar qualquer processo de fermentação (SILVA et al., 2018; PANDEY, 2012; DESWAL; KHASA; KUHAD, 2011).

Tabela 3- Principais gêneros fungi utilizados em FES para a produção de enzimas

FUNGO	SUPORTE SÓLIDO	REFERÊNCIAS
<i>Aspergillus niger</i>	Palha de trigo cortada	Saqib et al. (2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Casca de laranja, flor secae bagaço de cana	Karmakar e Ray (2010)
<i>Trichoderma virride</i>	Grão de milho moído	Farinas et al. (2011)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Palha de arroz e palha detrito	DESWAL; KHASA e KUHAD, (2011)
<i>Fomitopsis sp.</i> <i>Aspergillus.Niger</i>	Farelo de trigo	Farinas et al. (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz, farelo de trigo, farelo de grama preta, GOC e COC	Suganthi et al. (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz, farelo de trigo, farelo de grama pretae soja	Kumar e Duhan (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Zanelato et al. (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	Pirota et al., (2013)
<i>Myceliophthora sp.</i>	Farelo de trigo	Dave et al. (2013)
<i>Rhizopus arrhizus e Mucorsubtillissimus</i>	Casca de mandioca Caorncob, soja, farelo de trigo e polpa cítrica	Nascimento et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz, farelo de trigo, farelo de gramapreta, GOC e COC	Mahalakshmi eJayalakshmi (2016)
<i>Aspergillus terréus</i>	Bolo de óleo de palma	Rahman et al. (2016)
<i>Rhizopus sp.</i>	Pera espinhosa	Santos et al. (2016)
<i>Penicillium roqueforti</i>	Casca de arroz	Marques et al. (2018)
<i>Botrytis ricini</i>	Bagaço de cana-de-açúcar, pó de madeira, fibra de coco,	Silva et al. (2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de alimentos domésticos	Tian et al. (2018)
<i>Penicillium roqueforti</i>	Casca de Cacau	Oliveira et al. (2019)

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A atividade de água (a_w) deve ser mantida em níveis baixos, a fim de minimizar a umidade e prevenir a contaminação do meio, além de proporcionar um ambiente propício para o crescimento microbiano (PELIZER et al., 2003). Pesquisas conduzidas por Tapia, Alzamora e Chirife (2020) revelaram que cada tipo de microrganismo possui um valor mínimo de atividade de água (a_w) necessário para suas atividades metabólicas, sendo que fungos, leveduras e bactérias apresentam, respectivamente, valores mínimos

de aw de aproximadamente 0,70, 0,80 e 0,90.

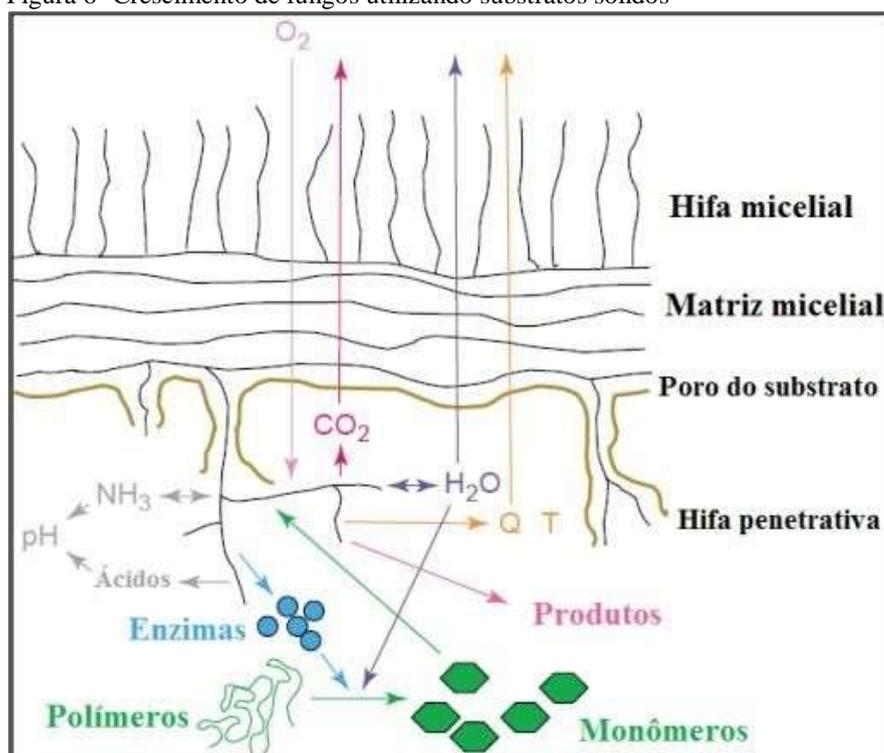
Outro aspecto crucial a ser considerado é a granulometria dos substratos, pois o tamanho das partículas desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do microrganismo alvo. Portanto, é necessário selecionar o tamanho de partícula adequado para cada processo específico, a fim de garantir a área de superfície apropriada para o crescimento microbiano. Partículas muito pequenas tendem a compactar o substrato, dificultando a circulação de gases e o crescimento microbiano, enquanto partículas grandes facilitam a aeração, mas oferecem menor área de contato entre o microrganismo e o substrato (COUTO; SANROMÁN, 2006).

A temperatura e o pH também desempenham papéis essenciais no sucesso do processo de fermentação. A temperatura influencia diretamente o crescimento microbiano (PANDEY, 2004), enquanto o pH deve ser cuidadosamente controlado no meio reacional, muitas vezes por meio da utilização de soluções tampões durante a fase de umidificação do substrato (SANTOS et al., 2018).

Além disso, o tempo é um fator crítico na FES, pois está diretamente relacionado à concentração de nutrientes disponíveis durante o processo fermentativo. A produção microbiana está diretamente relacionada à concentração de nutrientes no meio de cultivo, o que pode afetar a produção das macromoléculas desejadas (DOS SANTOS et al., 2013). Portanto, o controle rigoroso dessas variáveis é fundamental para garantir o máximo rendimento do processo.

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais amplamente utilizados na FES, devido à sua capacidade de crescer em superfícies sólidas com baixo percentual de água livre (DE LA CRUZ QUIROZ et al., 2015). Muitos deles têm a capacidade de crescer em ambientes com baixa umidade e valores de pH reduzidos. Além disso, o desenvolvimento de suas hifas permite uma penetração eficaz no substrato e nas regiões porosas entre as partículas da matéria-prima (Figura 6). Assim, esses organismos se destacam como excelentes produtores de enzimas hidrolíticas, capazes de degradar as biomoléculas presentes nos resíduos utilizados como substratos sólidos (SANTOS et al., 2018).

Figura 6- Crescimento de fungos utilizando substratos sólidos



Fonte: Adaptado de HÖLKER e LANZ (2005)

A produção de biomoléculas por meio de FES utilizando microrganismos é geralmente composta por cinco etapas distintas (SADH; DUHAN e DUHAN, 2018), conforme detalhado na Tabela 4.

Tabela 4- Etapas do processo de FES

ETAPAS	PROCESSO	OBSERVAÇÕES
Etapa 1	Seleção de substrato	Etapa de extrema importância.
Etapa 2	Pré-tratamento do substrato por processamento mecânico, químico ou bioquímico.	Melhorar a disponibilidade dos nutrientes ligados e reduzir o tamanho dos componentes.
Etapa 3	Hidrólise de substratos poliméricos	Polissacarídeos e proteínas.
Etapa 4	Fermentação	Utilização de produtos de hidrólise
Etapa 5	Processamento downstream	Usado na purificação e quantificação de produtos finais

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

1.5 Enzimas: Classificações gerais e aplicações industriais

Nas últimas décadas, o avanço tecnológico e industrial em constante crescimento tem impulsionado uma série de pesquisas com o objetivo de desenvolver metodologias e produtos de baixo custo. Essas iniciativas visam não apenas aumentar a lucratividade, mas também minimizar os impactos negativos no meio ambiente. Nesse contexto, áreas como proteômica e biotecnologia enzimática têm se destacado, pois a maioria dos processos industriais e reações metabólicas depende fortemente das enzimas, moléculas com potencial para promover reações com sustentabilidade, de maneira que métodos convencionais não conseguem alcançar (CHOI, HAN e KIM, 2015).

Essas macromoléculas desempenham um papel fundamental como catalisadores, reduzindo a energia necessária para a formação dos produtos. Isso ocorre por meio da interação entre o catalisador e o substrato durante o estado de transição (SILVA-LOPEZ, 2013; SANTOS, 2020). Enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo animais, vegetais e microrganismos.

A utilização dessas biomoléculas em processos biotecnológicos oferece inúmeras vantagens em comparação com os catalisadores sintéticos. Elas são altamente específicas para o substrato, atuam de maneira mais suave, preservam sua integridade e, o que é ainda mais importante, têm um impacto ambiental sustentável, reduzindo a toxicidade quando em contato com o meio ambiente (MONTEIRO et al., 2009; SHELDON e WOODLEY, 2018; ADAMS et al., 2019; BILAL et al., 2019).

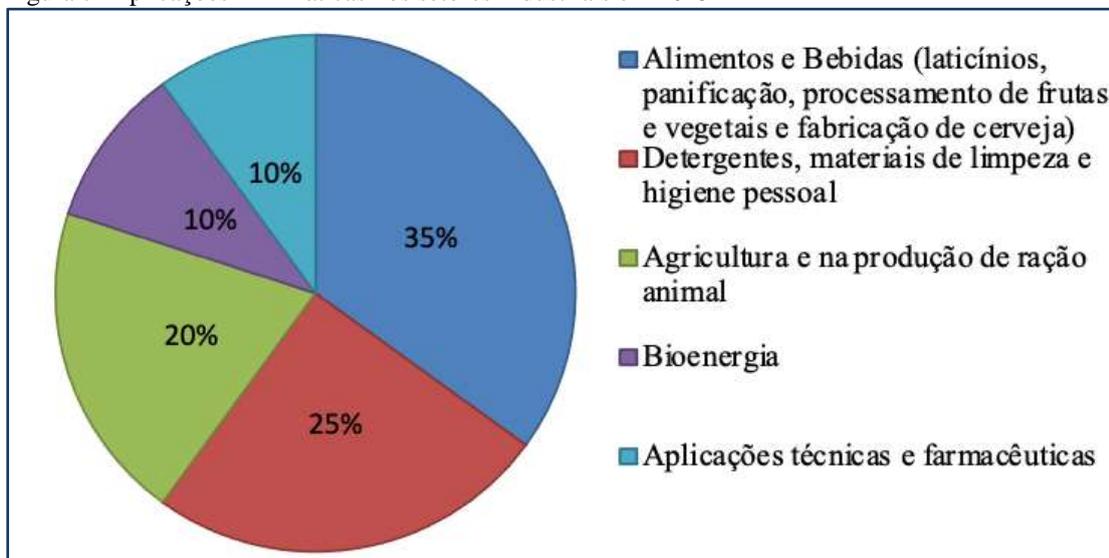
Essas características impulsionam melhorias significativas nos setores industriais. Em muitos casos, observa-se uma redução nos custos de produção, um aumento no rendimento e na qualidade dos produtos, economia de energia, diminuição na produção de intermediários reativos tóxicos, além da redução das emissões de gases de efeito estufa e do descarte de resíduos (ARBIGE; SHETTY; CHOTANI, 2019).

O mercado global de enzimas tem experimentado um elevado crescimento desde a década de 90. Arbige; Shetty e Chotani (2019) relataram que a comercialização de enzimas é destacada em diversos setores, incluindo pesquisa, terapêutica e indústria. O setor industrial, em particular, tem ampla aplicação de enzimas, com um valor de comercialização estimado em cerca de US\$ 8,2 bilhões em 2015. As expectativas indicam que esse valor poderá chegar a impressionantes US\$ 17,5 bilhões até 2024 (CIPOLATTI et al., 2019; DE SOUZA; KAWAGUTI, 2021).

Conforme destacado por Cipolatti et al. (2019), o mercado enzimático apresenta um cenário promissor, com aplicações significativas nas indústrias de alimentos e

bebidas, detergentes, agricultura, ração animal, aplicações técnicas, farmacêutica e bioenergia (Figura 7).

Figura 7- Aplicações Enzimáticas nos setores Industriais em 2015



Fonte: Adaptado de Guerrand (2018)

1.5.1 Proteases

Na área da biotecnologia contemporânea, as proteases ocupam uma posição de destaque. Também conhecidas como proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas, esses biocatalisadores desempenham um papel crucial ao catalisar a clivagem das ligações peptídicas presentes nos resíduos de aminoácidos que constituem as proteínas, mediante reações de hidrólise (MARTIM et al., 2017; DAVID et al., 2018; SANTOS, 2020).

Essas moléculas estão amplamente distribuídas em todos os organismos vivos, sendo responsáveis por aproximadamente 2% do total de enzimas encontradas nesses seres. Além disso, elas compõem a maior família de enzimas e representam cerca de 2% do genoma humano, conforme apontado por Silva (2013) e corroborado por estudos posteriores (GURUMALLESH et al., 2019; NAVEED et al., 2020).

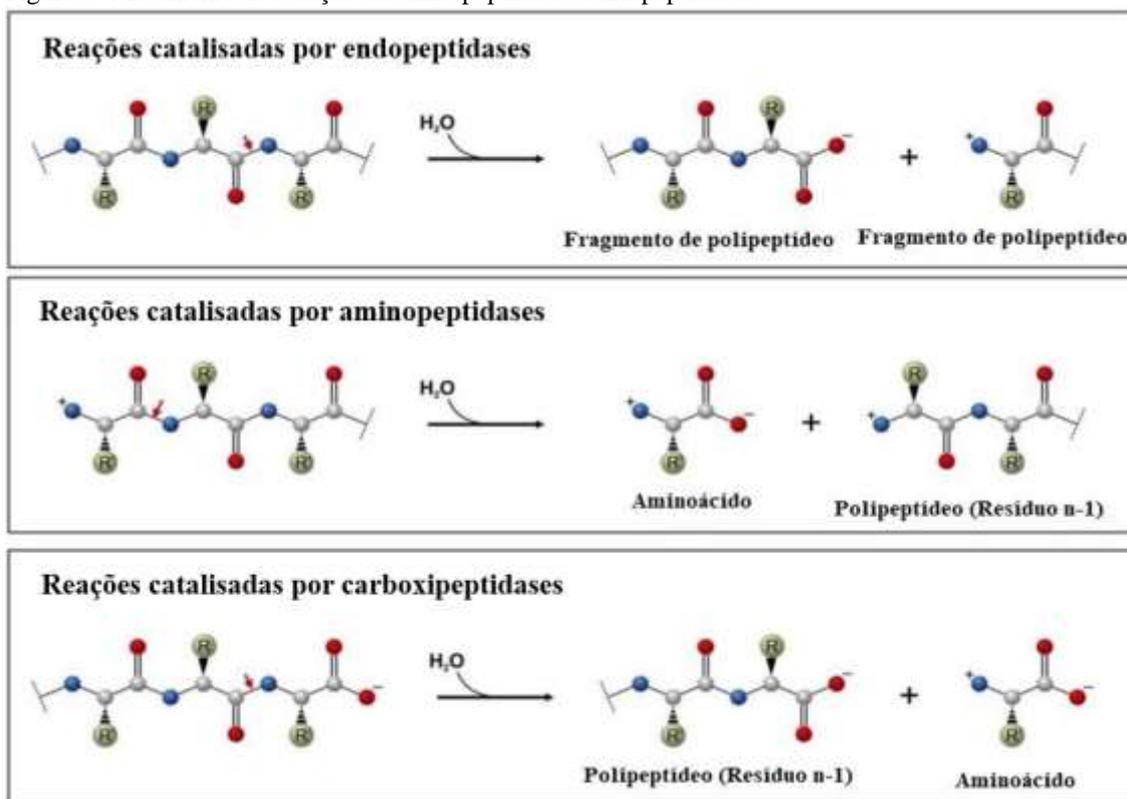
As proteases podem ser categorizadas de acordo com o pH ideal de atuação, classificando-se como enzimas ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,9-7,1) ou alcalinas (pH 8,0-13,0). Essas biomoléculas também exibem uma ampla diversidade em sua massa molecular, variando entre 18 a 90 kDa (NAVEED et al., 2020).

A classificação das proteases baseia-se tanto na natureza catalítica que exercem quanto na natureza química de seus sítios ativos, conforme observado por Younes et al. (2015). De acordo com a International Union of Biochemistry and Molecular Biology

(IUBMB), as proteases pertencem à classe das hidrolases (classe 3) e à subclasse das peptídeo-hidrolases (subclasse 3.4), uma vez que a hidrólise ocorre pela introdução de moléculas de água entre as ligações peptídicas (YOUNES et al., 2015).

Quanto à posição em que ocorre a clivagem das ligações peptídicas, as proteases podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases são responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas no interior das cadeias polipeptídicas, enquanto as exopeptidases preferencialmente atuam nas regiões externas dessas cadeias. As exopeptidases, por sua vez, são subdivididas em aminopeptidases, que atuam na região N-terminal das proteínas, e carboxipeptidases, que desempenham seu papel na região C-terminal. Essa classificação está ilustrada na Figura 8 (MÓTYÁN, TÓTH e TÓZSÉR, 2013; NOREEN et al., 2017).

Figura 8- Mecanismo de atuação das Endopeptidases e Exopeptidases



Fonte: Adaptado de NOREEN et al. (2017).

Outra maneira para classificar as proteases envolve a análise dos grupos químicos presentes no centro ativo, os quais desempenham um papel crucial nos mecanismos catalíticos. Sob essa perspectiva, a classe das carboxipeptidases engloba serinoproteases, metaloproteases e cisteíno proteases, enquanto as endopeptidases se subdividem em serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina peptidases específicas (VERMELHO et al.,

2008; SRILAKSHMI, et al., 2015; SILVA, 2019).

1.5.1.1 Serinoproteases

As serinoproteases constituem uma classe essencial de enzimas proteolíticas caracterizadas por conterem resíduos de serina, histidina e aspartato em seu sítio catalítico (DONG; YANG; LEE, 2021). O resíduo de serina atua como nucleófilo, promovendo a clivagem da ligação peptídica do substrato e formando um intermediário acil-enzima. A histidina age como base, enquanto o aspartato atua como eletrófilo nesse processo (DI CERA, 2009).

Essas enzimas formam uma das maiores superfamílias de peptidases e são amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo tanto em vírus e bactérias como em organismos eucarióticos (GURUMALLESH et al., 2019; DI CERA et al., 2009; LASKAR et al., 2012; RAWLINGS et al., 2007). Com base em similaridades estruturais e evidências funcionais, as serinoproteases são agrupadas em diversas famílias.

Para confirmar a presença de uma serinoprotease, pode-se realizar um ensaio de inibição da atividade enzimática com PMSF ou DFP. PMSF reage com a hidroxila (-OH) do grupo R da serina, formando uma ligação éster entre o PMSF e a serina. Essa ligação é suficientemente forte para inativar permanentemente a enzima, tornando-a ineficaz na clivagem de seus substratos naturais. O grupo fosfato do DFP substitui o grupo hidroxila (-OH) do resíduo de serina, formando uma ligação covalente com a serina. Essa ligação é altamente estável e irreversível, o que significa que a enzima é inativada de forma permanente (REIS, 2009; SANTOS, 2018).

As serinoproteases desempenham funções cruciais em diversos processos fisiológicos, incluindo a digestão de proteínas, coagulação sanguínea, fibrinólise, resposta imunológica, transdução de sinais e ativação de hormônios (BORGES-VELOSO, 2015).

A elastase 2, também conhecida como elastase de neutrófilo humano 2 (HNE2), faz parte da família das elastases, que são serinoproteases. Com uma massa molecular aproximada de 30 kDa e uma tríade catalítica composta pelos resíduos de Ser¹⁹⁵, Asp¹⁰² e His⁵⁷ (LUCAS et al., 2013; WALKER; LYNAS, 2001). A elastase 2 é predominantemente produzida por neutrófilos e desempenha um papel crucial na resposta imunológica, protegendo o organismo contra infecções bacterianas, inflamações e remodelação tecidual (GERACE et al., 2023; ZHENG et al., 2019).

A principal função da elastase 2 é a degradação das proteínas da matriz extracelular, como colágeno e elastina, fundamentais nos tecidos conjuntivos, como pele,

pulmões e vasos sanguíneos (FAYAD; MORIN; NEHMÉ, 2017). A elastina é responsável por conferir elasticidade a esses tecidos, desempenhando um papel vital em sua integridade estrutural. A ação da elastase 2 é rigorosamente controlada pela α 1-antitripsina (AAT), um inibidor sérico específico que regula a atividade dessa protease (CAGNONE et al., 2019).

Essa serinoprotease desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase e na resposta imunológica do organismo. A elastase 2 também possui capacidade de formar Ang II a partir de Ang I, ou seja, é uma enzima conversora de angiotensina (ECA) e atua na regulação da pressão sanguínea e na função cardíaca (PAULA et al., 1998). Mas recentemente foi descrito que essa enzima apresenta uma ligação com a COVID-19, visto que está atua como receptor para a entrada do SARS-CoV-2 nas células (SCHOLZ et al., 2020).

1.5.2 Aplicações biotecnológicas das proteases

A produção e aplicação de enzimas atualmente desempenham um papel fundamental na indústria biotecnológica, atraindo uma série de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de metodologias de baixo custo e alta eficiência de recuperação. Isso é essencial para garantir a viabilidade econômica quando essas enzimas são destinadas à produção em larga escala (NAVEED et al., 2020).

O avanço tecnológico na engenharia de proteínas, aliado à crescente industrialização e às mudanças nos padrões de consumo global, está impulsionando o mercado de proteases (SOLANKI et al., 2021). As proteases estão entre as enzimas industriais mais relevantes, representando cerca de 60% do mercado de enzimas em geral (ARRUDA, 2017; SHARMA et al., 2019). É importante destacar que esse mercado está experimentando um crescimento exponencial, com uma taxa anual de crescimento estimada em 6,1%, com expectativas de atingir US\$ 3 bilhões até 2024 (NAVEED et al., 2020).

As proteases industriais oferecem diversas vantagens, incluindo estereosseletividade, especificidade, biodegradabilidade e a capacidade de produzir compostos naturais sob condições de reação suaves. Além disso, são consideradas uma alternativa sustentável em comparação com métodos tradicionais (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2014). A estabilidade dessas enzimas em uma ampla faixa de pH e temperatura é fundamental nos campos que utilizam biocatálise. A atividade enzimática em reações químicas depende diretamente da estrutura tridimensional da enzima, que, por

sua vez, é influenciada pelos resíduos de aminoácidos presentes e pelas interações entre eles (SILVA, 2013).

Rawlings e colaboradores (2007) destacam que as proteases tiveram uma das primeiras aplicações como biocatalisadores na produção de queijo. Inicialmente, os extratos de plantas eram utilizados para esse fim, mas posteriormente foram substituídos por extratos de estômago de animais, principalmente bovinos. Além da produção de queijo e seus derivados, as proteases desempenham um papel fundamental em diversos setores industriais, abrangendo detergentes, curtimento de couro, processamento de alimentos, produção de carne, fabricação de papel e celulose, recuperação de prata de filmes fotográficos, indústria farmacêutica e processos de biorremediação (DE SOUZA, 2016; FAZILAT, 2016; WAHAB; AHMED, 2018). A Figura 9 ilustra a ampla variedade de aplicações das proteases industriais, algumas das quais serão discutidas a seguir.

Figura 9- Aplicações de protease em vários setores industriais



Fonte: Adaptado de Solanki et al. (2021)

1.5.2.1 Proteases na indústria de detergente

Os primeiros relatos sobre a aplicação de proteases em detergentes remontam a 1913, quando eram produzidos a partir da mistura de carbonato de sódio e extrato de

pâncreas (RAO, 1998). No entanto, apenas a partir do final da década de 90 é que essas enzimas começaram a se destacar no mercado enzimático. Atualmente, as estatísticas apontam que o uso de proteases nesse setor responde por cerca de 20 % das vendas globais de enzimas, representando de 30% a 40% das receitas globais de enzimas, com perspectivas promissoras de crescimento, podendo aumentar até 15,5 % entre os anos de 2020 e 2025 (SOLANKI et al., 2021).

A introdução desses biocatalisadores em detergentes apresenta benefícios significativos. Devido à alta especificidade e características iônicas das proteases, é necessário usar pequenas concentrações para alcançar eficácia na ação dessas enzimas. Além disso, elas precisam ser estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura, sendo compatíveis com os vários componentes dos detergentes, incluindo agentes oxidantes e sequestrantes. As proteases também têm uma vida útil mais longa, o que contribui para a eficiência do produto (BOUACEM, 2015; SINGH et al., 2016).

Essas enzimas facilitam a remoção de manchas de gordura, que geralmente estão ligadas a resíduos proteicos, atuando na hidrólise das moléculas de proteína presentes em manchas de sangue, carne, leite, ovos, peixe e outras secreções corporais. Além disso, as proteases são biodegradáveis, o que não só melhora o desempenho dos detergentes, mas também reduz o custo do processo (NAVEED et al., 2020; SOLANKI et al., 2021).

A adição de enzimas proteolíticas na formulação de detergentes oferece várias vantagens, como economia de energia e baixa emissão de dióxido de carbono, uma vez que substituem agentes surfactantes não biodegradáveis. Com o uso desses biocatalisadores, a temperatura de lavagem pode ser reduzida para cerca de 30 °C (SILVA, 2019; SANTOS, 2020).

Diversos estudos mencionam uma variedade de proteases microbianas que são empregadas como aditivos em detergentes, incluindo aquelas provenientes de *Bacillus megaterium*-TK1 (MANAVALAN et al., 2020), *Bacillus safensis* (REKIK et al., 2019), *Cheotomium globosum* (NADEEM et al., 2019), *Bacillus subtilis* (MARATHE et al., 2018), *Penicillium chrysogenum* (BENMRAD et al., 2018), *Bacillus alkalitelluris* TWI3 (ANANDHARAJ et al., 2016), *Caldicoprobacter guelmensis* (BOUACEM et al., 2015), *Aspergillus flavus* (YADAV et al., 2011), *Aspergillus niger* (DEVI et al., 2008), *Bacillus firmus* MTCC 7728 (RAO et al., 2007), *Bacillus cereus* (BANIK; PRAKASH, 2004).

O avanço biotecnológico tem permitido melhorias significativas nessa área, como o uso da tecnologia de DNA recombinante (rDNA) para criar proteases com maior vida útil. Além disso, a engenharia de proteínas tem sido empregada para substituir resíduos

de aminoácidos visando obter maior branqueamento e estabilidade oxidativa. A utilização de coquetéis enzimáticos, que incluem enzimas como proteases, lipases, celulasas e amilases, também tem como objetivo aumentar o poder de limpeza dos detergentes (SOLANKI et al., 2021).

1.5.2.2 *Proteases na Indústria de couro*

Atualmente, observa-se uma ampla utilização de materiais e acessórios fabricados a partir do couro ou da pele de animais. Esses materiais são predominantemente compostos por colágeno, que interage com outras proteínas globulares e fibrosas (NAVEED et al., 2020). No processo de fabricação desses produtos, é necessário realizar tratamentos químicos da matéria-prima, envolvendo etapas como imersão, calagem, depilação, descalcificação, rebatimento, desengorduramento e decapagem, a fim de transformar o couro bruto em couro processado. No entanto, essas etapas envolvem o uso de diversos produtos químicos altamente prejudiciais ao ecossistema local (SHARMA et al., 2019; SILVA, 2019).

Para mitigar esse problema, tem sido cada vez mais comum a incorporação de proteases nas etapas de processamento do couro. Essas enzimas são empregadas para quebrar os componentes não colagenosos e proteínas não fibrilares presentes na matéria-prima. Essa remoção melhora a qualidade do couro, conferindo-lhe maior maciez e durabilidade, ao mesmo tempo em que reduz o impacto ambiental, contribuindo para a redução da poluição (FANG et al., 2017; NAVEED et al., 2020; SOLANKI et al., 2021). A adoção dessas abordagens biológicas oferece diversas vantagens, incluindo maior eficiência no processo, especificidade enzimática nas reações catalíticas e melhoria na qualidade do couro (SOLANKI et al., 2021).

As proteases com atividades elastolíticas e queratinolíticas são amplamente empregadas na indústria de processamento de couro (MORIDSHAHI et al., 2020), especialmente nas etapas de imersão, rebatimento e depilação na preparação de peles e couros (ZHOU et al., 2018). Essas proteases tendem a reduzir o uso de insumos, como resíduos sólidos e gases nocivos (PAUL et al., 2016).

Assim como em outros setores, na indústria de couro, as enzimas microbianas são as mais utilizadas. Exemplos incluem aquelas produzidas por *Bacillus filamentosus*, *Lysinibacillus cresolivorans* e *Bacillus subtilis* (ULLAH et al., 2021), *Aspergillus terreus* 7461 (DE LIMA et al., 2021), *Bacillus megaterium*-TK1 (MANAVALAN et al., 2020), *Idiomarina* sp. C9-1 (ZHOU et al. 2018), *Bacillus subtilis* (DETTMER et al., 2013),

Bacillus megaterium (ASKER et al., 2013), *Bacillus halodurans* JB 99 (SHRINIVAS; NAIK, 2011), *Bacillus sp.* JB 99 (KAINOOR; NAIK, 2010), *Streptomyces gulbargensis* (SYED et al., 2009), *Streptomyces avermectinus* NRRL B-8165 (AHMED et al., 2008) e *Aspergillus tamaris* (DAYANANDAN et al., 2003).

1.5.2.3 *Proteases na Indústria Farmacêutica*

As proteases têm se mostrado promissoras em aplicações farmacêuticas, uma vez que muitos organismos vivos contêm quantidades significativas dessas enzimas proteolíticas. Portanto, há muito tempo elas vêm sendo utilizadas como componentes em produtos terapêuticos. É fundamental destacar que esses biocatalisadores desempenham papéis essenciais em diversos processos fisiológicos, contribuindo para a regulação de muitas funções do organismo (SILVA, 2019).

Matkawala et al. (2021) relatam que a FDA aprovou uma série de medicamentos que contêm proteases naturais em sua composição para o tratamento de diversas condições clínicas. Além disso, também é mencionado que terapias baseadas em proteases estão em fase de pesquisa clínica.

Estudos demonstram que essas enzimas são fortes candidatas para o tratamento de doenças graves, como câncer, úlceras dérmicas, fibrose cística, doenças cardíacas, distúrbios digestivos e inflamatórios (KUMAR e JAIN, 2018; NAVEED et al., 2020). Essas biomoléculas também são utilizadas na limpeza e desinfecção de lentes de contato em uma única etapa, através do aquecimento a temperaturas entre 60 e 100 °C (MATKAWALA et al., 2021). A tabela 5 apresenta algumas proteases com aplicações terapêuticas.

Tabela 5 - Proteases com aplicações terapêuticas.

PROTEASE	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
Colagenase	Dupuytren, doença de Peyronie, cicatrização de feridas, queimaduras, glaucoma, hérnia de disco intervertebral, desbridamento, quelóide, vitrectomia e celulite.	Gurumallesh et al. (2019)
Asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	Remoção da asparagina do sangue em formas de leucemia linfocítica.	Muneer et al. (2020)
Nattoquinase de <i>Bacillus subtilis</i>	Doenças cardiovasculares.	Lan et al. (2020)
Queratinases	Erradicação da queratina em manchas acne ou prurido na depilação, eliminação de calos humanos, degeneração da pele coberta de queratina, preparação de vacinas para dermatofitoses.	Brandelli; Daroit; Riffel (2010) Tavano et al. (2018)
protease alcalina de cepa <i>Bacillus</i>CK 11-4	Atividade fibrinolítica utilizada como agente trombolítico	Matkawala et al. (2021)

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

1.5.2.4 Proteases na indústria de alimentos

O uso de proteases nas indústrias de alimentos e bebidas é amplamente observado e remonta a décadas atrás (NAVEED et al., 2020). Essas enzimas desempenham um papel crucial no aprimoramento do processamento de alimentos, contribuindo para a melhoria do valor nutricional e funcional dos produtos. Isso se traduz em uma maior absorção, modificações na textura e sabor dos produtos, além de melhorias na capacidade antioxidante (VAN BOEKEL, 2010).

A utilização de enzimas proteolíticas na indústria de alimentos é um fator significativo para o aprimoramento econômico das empresas. Elas permitem agregar valor, funcionalidade e aplicabilidade a produtos que, de outra forma, teriam pouco valor comercial. Isso ocorre porque esses biocatalisadores apresentam características únicas em comparação com outros agentes químicos, como especificidade, ausência de toxicidade e a necessidade de baixas concentrações (LLORENTE et al., 2014). Nos setores alimentícios, essas enzimas são usadas no processamento de laticínios, massas, fabricação de pães, trituração de cereais, produção de cervejas, hidrolisados proteicos e como amaciadores de carnes (SAVITHA, 2011).

É relevante destacar que as proteases microbianas apresentam vantagens em

relação às proteases vegetais e animais no setor alimentício, como custos de produção mais baixos, diversidade bioquímica e a capacidade de manipulação genética. Isso proporciona maior estabilidade, consistência aprimorada e maior potencial de otimização ou modificação nas etapas do processo (SILVA et al., 2021; MANO et al., 2020; DA SILVA et al., 2017; ALECRIM et al., 2017; GURUNG et al., 2013).

No setor de panificação, as proteases são usadas para degradar as proteínas presentes nas matérias-primas utilizadas na fabricação de biscoitos e pães (FAZILAT, 2016). Na indústria de cerveja, essas enzimas atuam na extração das proteínas da cevada e do malte (KUMAR, 2020). Enquanto na indústria de laticínios, elas desempenham um papel na modificação do sabor e na redução da lactose (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018).

Devido ao aumento da produção global de queijo, escassez e aumento do custo do coalho bovino, questões religiosas, preocupações com o bem-estar animal e preferências alimentares, pesquisas têm se concentrado em buscar alternativas ao coalho tradicional. Isso impulsionou o uso de enzimas de coagulação do leite como substitutos adequados (LEMES et al., 2016).

É fundamental ressaltar que as proteases destinadas à indústria de laticínios devem exibir alta atividade e estabilidade em pH ácido (MANO et al., 2020). Como resultado, uma variedade de pesquisas busca identificar proteases com essas características, tanto de fontes vegetais (GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ et al., 2021; WANG et al., 2021; AFSHARNEZHAD; SHAHANGIAN; SARIRI, 2019; WANDERLEY et al., 2018) quanto animais (SHAMTSYAN et al., 2014; ROLET-RÉPÉCAUD et al., 2013). No entanto, fatores como sazonalidade, variações climáticas e limitações na produção limitam seu uso.

Diante desses obstáculos, a pesquisa tem se concentrado em fontes microbianas, que se mostram altamente promissoras como alternativas ao coalho bovino devido às suas características específicas. Isso tem contribuído para reduzir a dependência do coalho bovino, que hoje representa apenas cerca de 30% da demanda mundial (MANO et al., 2020; ZHAO et al., 2019; LEMES et al., 2016). Diversas pesquisas têm demonstrado a eficácia da utilização de microrganismos para a produção de proteases capazes de coagular o leite (FERREIRA et al., 2023; PRADO et al., 2021; MARTIN et al., 2017; DA SILVA et al., 2017; SUMANTHA; CHRISTIAN; ASHOK, 2006).

O leite, fundamental na produção de queijo, é um dos alimentos mais consumidos globalmente devido à sua rica composição nutricional, que inclui proteínas, lipídios e

cálcio (KAPAJ; DECI, 2017). Anualmente, a produção mundial de leite atinge 816 milhões de toneladas, com uma média de consumo de 116,5 kg por pessoa (SIQUEIRA, 2019). No Brasil, observou-se um aumento no crescimento da produção de leite entre 1970 e 2017, colocando o país como o quarto maior produtor, impulsionado em grande parte pela produção de queijo. Em 2018, a indústria de laticínios gerou cerca de R\$ 66,7 bilhões, classificando-se como o segundo setor mais importante na indústria de alimentos do país.

Entre os produtos lácteos, o queijo se destaca como o mais relevante e amplamente produzido. Anualmente, são fabricados cerca de mil tipos diferentes de queijos em todo o mundo (MANO et al., 2020). A etapa de coagulação do leite é crucial na produção de queijo (SILVA et al., 2021). O objetivo primordial desse processo é promover mudanças físico-químicas nas moléculas de caseína, transformando o leite de líquido para sólido, conhecido como coalhada. Esse processo pode ocorrer por meio de acidificação ou utilizando enzimas, sendo esta última abordagem a mais comum (DA SILVA et al., 2017). A coagulação do leite com enzimas é uma etapa fundamental no setor de laticínios, e a adição de coalho (ou renina) ou agentes coagulantes é amplamente praticada.

O termo "coalho" refere-se ao conteúdo enzimático composto por proteases ácidas oriundas do quarto estômago de ruminantes, principalmente bezerros. Nesse contexto, duas enzimas predominam: a quimosina e a pepsina, sendo que sua atuação varia de acordo com a idade do animal. Durante o período de amamentação, a quimosina é mais prevalente, enquanto após o desmame, a pepsina assume um papel mais ativo (GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ et al., 2021; MANO et al., 2020; MARTIN et al., 2017).

O processo de coagulação ocorre em duas etapas: inicialmente, o coalho ou coagulantes são adicionados, desencadeando a hidrólise enzimática da ligação peptídica entre Phe¹⁰⁵ e Met¹⁰⁶ na k-caseína. Isso resulta na formação de para-k-caseína e glicomacropéptido (GMP), seguido pela precipitação dessas frações de para-k-caseína na presença de cálcio, formando um coágulo denso e pouco solúvel (DA SILVA et al., 2017).

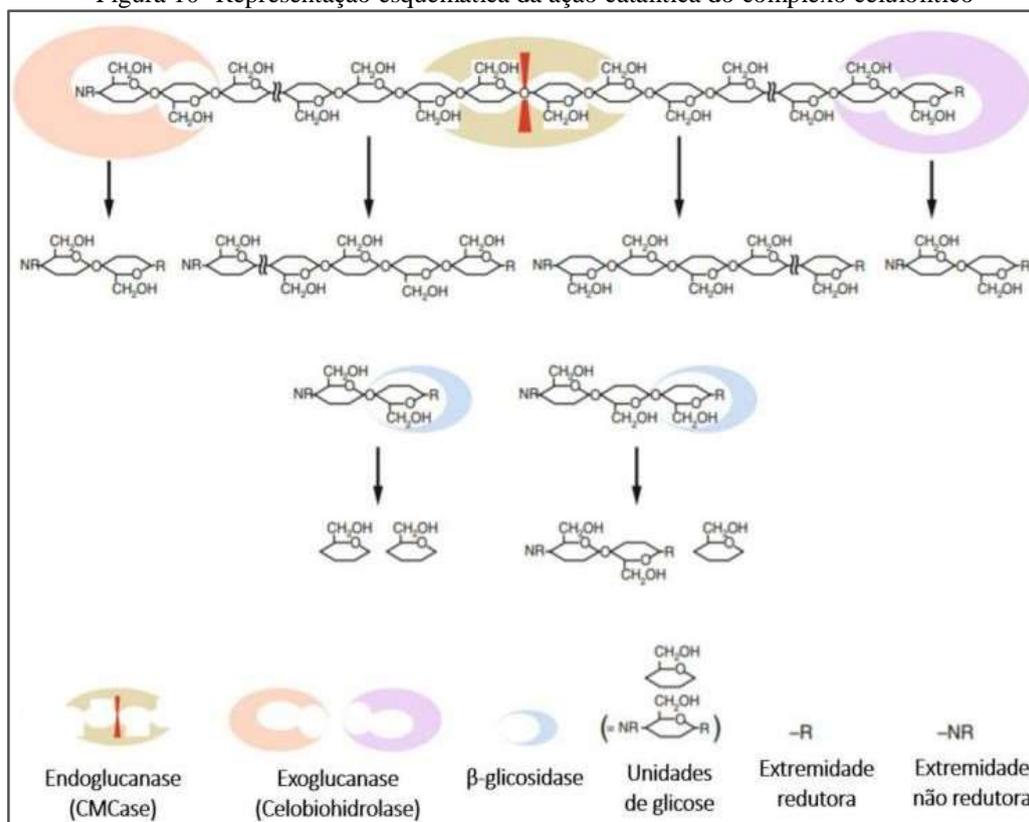
1.5.3 Celulase

As celulases pertencem ao grupo das glicosil-hidrolases, abrangendo aproximadamente 162 famílias documentadas (SILVA, 2019). Elas podem ser produzidas por microrganismos, como fungos e bactérias, durante seu crescimento em contato com resíduos lignocelulósicos (SILVA, 2019). Essas enzimas desempenham um papel

fundamental na transformação bioquímica da celulose, promovendo a quebra das ligações β -1,4 glicosídicas para gerar produtos como glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. Para a hidrólise completa da celulose, é necessária a atuação de três tipos de enzimas em sinergia: as endoglucanases (EC 3.2.1.4), as exoglucanases (EC 3.2.1.91) e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (LEE et al., 2018; WANG et al., 2018; SILVA, 2020; PATEL; SHAH, 2021).

A endoglucanase inicia o processo de hidrólise da celulose, sendo responsável por quebrar as ligações β -1,4 na região central da molécula, expondo as extremidades redutoras e não redutoras. Em seguida, as exoglucanases, representadas pelas celobiohidrolases do tipo I e II, atuam nas extremidades redutoras e não redutoras, respectivamente, liberando oligossacarídeos, como unidades de celobiose. Por fim, as β -glicosidases, também conhecidas como celobiasas, hidrolisam as unidades de celobiose em glicose (VIEIRA, 2020; SILVA, 2019; BARBOSA, 2019; CASTRO, 2010; VILELA, 2013). A Figura 10 esquematiza o sistema de ação das celulases na hidrólise da celulose.

Figura 10- Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico



Fonte: Adaptado de Barbosa (2019)

Vieira (2020) descreve as celulases como enzimas com pesos moleculares variando entre 34 kDa e 250 kDa. Dentro desse espectro, as endoglucanases têm massas

moleculares situadas entre 25 e 50 kDa, as exoglucanases variam de 41 a 68 kDa, e as β -glicosidases apresentam massas de 165 a 182 kDa.

Quando examinamos sua estrutura tridimensional, fica evidente que essas enzimas são classificadas como bimodulares. Elas possuem um domínio catalítico, que inclui um sítio ativo aberto (fenda), permitindo que se liguem a diferentes locais ao longo da região amorfa da celulose e, assim, hidrolisem as ligações β -1,4 glicosídicas. Esse arranjo confere uma alta especificidade a essas enzimas nessa região. Além disso, há o segundo domínio, chamado de módulo de ligação a carboidratos (CBM), responsável por facilitar a ligação entre a enzima e o substrato, podendo até mesmo iniciar a hidrólise da celulose. Esses dois domínios são conectados por uma curta sequência proteica altamente glicosilada, rica em serina e treonina (KARNCHANATAT et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2019; SILVA, 2020).

1.5.3.1 Endoglucanase

Conforme a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), as endoglucanases, também denominadas endo-1,4- β -glucanase, têm uma nomenclatura sistemática como 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase. Essas enzimas fazem parte do grupo das celulasas e têm a responsabilidade de clivar as ligações glicosídicas β -1,4, especificamente na região amorfa das fibras de celulose. Isso resulta na liberação de oligossacarídeos, com regiões terminais redutoras e não redutoras, que servem como substrato para a posterior ação das exoglucanases e β -glicosidases, culminando na produção de celooligossacarídeos, celobiose e glicose (BASHIROVA et al., 2019; ONI; OKE; SANI, 2020).

Quanto à sua sequência e estrutura tridimensional, as endoglucanases fazem parte da ampla família de glicosil-hidrolases (GH), que abrange 17 famílias diferentes de GH. A maioria delas possui peso molecular situado entre 25 e 50 kDa, como observado na endoglucanase isolada da espécie *Phanerochaete chrysosporium*, que apresentou peso molecular entre 28 e 37 kDa (VIEIRA, 2020). A atividade dessas enzimas pode ser medida utilizando como substrato a carboximetilcelulose (CMC) derivada da celulose solúvel (SHARMA et al., 2016).

As endoglucanases são amplamente reconhecidas como excelentes biocatalisadores devido às suas numerosas aplicações industriais e importância comercial. Essas enzimas desempenham um papel fundamental em diversos setores industriais, como a indústria têxtil, de celulose e papel, panificação, detergentes, bebidas, alimentos,

cervejas, ração animal e biocombustíveis de segunda geração (KARNCHANATAT et al., 2009; DE ALMEIDA et al., 2013; SHARMA et al., 2016; BASHIROVA et al., 2019). É relevante destacar que a aplicação dessas enzimas está em constante expansão, especialmente devido ao avanço nas indústrias de biocombustíveis de segunda geração, onde são essenciais (ONI; OKE; SANI, 2020; SILVA, 2020).

A maioria das endoglucanases utilizadas na indústria é classificada como termoestável, pois sua resistência e estabilidade a diferentes temperaturas as tornam aplicáveis em diversos setores (SILVA et al., 2018). Vale ressaltar que muitas endoglucanases descritas na literatura exibem essa característica, apresentando uma temperatura ótima de atividade geralmente entre 50°C e 80°C (SRIVASTAVA et al., 2018).

1.5.4 Aplicações biotecnológicas das enzimas celulolíticas

As celulasas desempenham um papel de destaque na indústria, representando aproximadamente 20% da demanda total de enzimas comercializadas em escala global. Essas enzimas encontram aplicação em diversos setores industriais, incluindo: indústria têxtil; indústria farmacêutica e de cosmética, indústria de sucos, alimentos e cervejaria; indústria de papel e celulose; indústria de detergentes, na indústria de reciclagem, tratamento de água e esgotos, biorremediação e bioetanol (YOON et al., 2014; ORJI et al., 2016; COELHO et al., 2018). A Tabela 6 retrata algumas aplicações industriais das enzimas lignocelulolíticas.

Tabela 6- aplicações industriais das enzimas lignocelulolíticas

SETOR INDUSTRIAL	FUNÇÕES TÉCNICAS	REFERÊNCIAS
Ração animal	Melhora digestibilidade dos nutrientes e eficiência da utilização da ração.	Najafi et al. (2005)
Agricultura	Atua em mecanismos de defesa contra pragas e insetos, parede celular e metabolismo secundário, ativação de fitocromos, metabolismo de pigmentos e amadurecimento de frutos.	Gerardi et al. (2001)
Detergente	Modifica a estrutura da fibra de celulose, melhorando o brilho da cor e o material do tecido.	Choi et al. (2015)
Papel e celulose	Aumenta a maciez da fibra, flexibilidade e melhoram a drenagem da água.	Solomon et al. (1996)
Têxteis e Polímeros	hidrolisam amido, amaciando o algodão, melhorando o acabamento de tecidos em denim, melhoria da cor e vivacidade da superfície.	Banerjee et al. (2014)
Biocombustíveis	Conversão da biomassa celulósica em matérias-primas químicas e biorrefinarias.	Sanchez and Demain (2010)
Alimentação e Bebidas	Auxiliam na hidrólise da pectina, diminuem a viscosidade e mantêm a textura na indústria de sucos. Melhoram a vida de prateleira e a qualidade dos produtos lácteos. Atuam na hidrólise da lactose em glicose e galactose no processamento do leite. Potencializam o aroma nas indústrias vinícolas, desamargamento de sucos cítricos e xarope de soja.	Bhalla et al. (2017), Sharma and Chadha(2011) Wellenbeck et al. (2017)

Fonte: Adaptado de Thapa et al. (2020).

1.5.4.1 Celulases na indústria de papel

Devido aos crescentes impactos ambientais associados ao desmatamento e às políticas de proteção ambiental, as indústrias de papel e celulose estão adotando uma abordagem mais sustentável, substituindo a celulose bruta pela celulose reciclada (Kuhad et al., 2011; AHMED et al., 2018; KARTHIKEYAN; KRISHNAMOORTHY, 2021). Como resultado desse movimento em direção à sustentabilidade, o uso de aplicações enzimáticas tem ganhado destaque nesse setor industrial.

As celulases desempenham um papel fundamental em várias etapas do processo de produção de papel e celulose, incluindo polpação, refino, destintagem, desaguamento, biocaracterização das fibras de polpa, melhoria do brilho da polpa, biobranqueamento de polpas kraft e drenagem aprimorada (MAIJALA et al., 2008; BAJAJ et al., 2019; SINGH

et al., 2021).

No processo de polpação, as indústrias estão fazendo a transição do método mecânico tradicional para o método biomecânico, que utiliza enzimas, como a celulase. Esse método demonstrou economizar uma porcentagem significativa de energia, que pode variar entre 20% e 40% durante o refino, ao mesmo tempo em que aumenta a resistência do produto, tornando-o uma alternativa viável (AHMED; BIBI, 2018). Além disso, as celulases desempenham um papel crucial no processo de biodestinação, uma vez que hidrolisam as fibras de celulose presentes na superfície, removendo os resíduos de tinta. Esse processo resulta em uma melhoria na qualidade do produto, na qualidade das fibras e no brilho, além de reduzir o número de partículas residuais (BAJAJ; MAHAJAN, 2019; SINGH et al., 2021).

1.5.4.2 Celulases na indústria têxtil

O uso de celulases na indústria têxtil teve seu início por volta de 1980, quando começaram a ser aplicadas na etapa de pedragem (ARJA, 2007). Desde então, o uso dessas enzimas tem crescido consideravelmente, com 14% do mercado de celulases destinado a esse setor industrial (THAPA et al., 2020). As aplicações das celulases na indústria têxtil abrangem diversos processos, incluindo o amaciamento do algodão, o acabamento de jeans, o biopolimento e a lavagem com bistone (DE SOUZA MOREIRA et al., 2016).

No biopolimento, as enzimas celulolíticas são empregadas, melhorando o processamento do jeans (NANDY et al., 2021) ou atuando em tecidos de algodão para remover fibras e flocos da superfície, aumentando o brilho e a maciez (KUHAD et al., 2011). Essas enzimas desempenham um papel fundamental nos processos de redução de corantes índigo em jeans, desfibrilação e amaciamento de fibras coloridas, além de remover as fibras salientes, resultando em um acabamento de alta qualidade nos tecidos (SARWAN; BOSE, 2021). O uso de celulases na indústria têxtil oferece vantagens econômicas, uma vez que melhora a qualidade do produto, ao mesmo tempo em que contribui para a preservação do meio ambiente, reduzindo o consumo de água e produtos químicos (SINGH et al., 2021).

1.5.4.3 Produção de Biocombustível

A crise energética atual, ocasionada pela diminuição das reservas de combustíveis fósseis, aliada ao agravamento das mudanças climáticas devido ao aumento dos gases de

efeito estufa, como metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), devido ao alto consumo desses combustíveis, tem motivado o desenvolvimento de políticas ambientais voltadas para a redução desses impactos (SINGH et al., 2021; KUMAR et al., 2020; LIU et al., 2021). Como alternativa a esse problema, a produção de biocombustíveis tem se destacado como uma solução promissora, sendo considerada uma opção viável e sustentável em substituição aos combustíveis derivados do petróleo (KUMAR et al., 2020; CARVALHO, 2008).

Os biocombustíveis são classificados em primeira, segunda, terceira e quarta geração, dependendo da fonte e dos critérios de produção. Os de primeira geração são produzidos a partir de matérias-primas alimentícias, como açúcares, óleos vegetais e amido. Os de segunda geração utilizam a biomassa lignocelulósica como matéria-prima. Os de terceira geração são oriundos de biomassas cultivadas especificamente para essa finalidade, sem competir com a produção de alimentos, como no caso das algas, enquanto os de quarta geração envolvem organismos geneticamente modificados para melhorar o desempenho, como as algas geneticamente modificadas (PABBATHI et al., 2021; ABDULLAH et al., 2019; DUTTA; DAVEREY; LIN, 2014).

A utilização de biocombustíveis na indústria automobilística remonta aos primórdios da indústria e era considerada viável até o final da Segunda Guerra Mundial, quando os combustíveis derivados do petróleo se tornaram mais baratos. No entanto, na década de 70, com a crise do petróleo, vários países começaram a investir na produção de biocombustíveis, com o Brasil liderando a produção de bioetanol por meio do Programa Nacional de Etanol, conhecido como "Proálcool" (SOCCOL et al., 2005). No final da década de 1990, devido ao aumento no valor do barril de petróleo, países como os EUA e europeus passaram a incentivar a produção desse combustível. É importante destacar que somente na última década, em virtude das políticas adotadas para mitigar os danos ambientais causados pelas altas emissões de gases de efeito estufa (GEE), os biocombustíveis passaram a ocupar um lugar significativo na escala de produção de combustíveis (JESWANI; CHILVERS; AZAPAGIC, 2020).

A produção mundial de biocombustíveis é liderada pelo Brasil e pelos EUA, que responderam por cerca de 70 % do biocombustível produzido em 2018, enquanto a Europa contribuiu com 9 % (RATURI, 2019). As estimativas indicam um aumento substancial na produção de biocombustíveis, com a produção de bioetanol crescendo 67 %, passando de 67 bilhões de litros para 110,4 bilhões de litros entre 2008 e 2018. O biodiesel também apresentou um aumento expressivo, saltando de 12 bilhões de litros

para 41 bilhões de litros no mesmo período (IEA, 2019).

Embora o bagaço de cana-de-açúcar e a palha do milho sejam as principais matérias-primas lignocelulósicas utilizadas na produção de bioetanol (JESWANI; CHILVERS; AZAPAGIC, 2020), outras fontes também são exploradas, como sementes (cevada, aveia, arroz, trigo, sorgo), beterraba e outras fontes de celulose (CORRÊA, 2014).

Na última década, testemunhamos um avanço significativo nas pesquisas relacionadas à produção de biocombustíveis, o que levanta expectativas de gerar aproximadamente US\$ 950 milhões até 2024. Nesse cenário, Brasil, EUA e França têm desempenhado papéis proeminentes nesse crescimento (Global Market Insights, 2019). O mesmo relatório também destaca que, devido a esse avanço, o mercado de enzimas que compõem o complexo de celulases está projetado para crescer, impulsionado pelas importantes aplicações desses biocatalisadores nas etapas de produção de biocombustíveis de segunda geração. Em 2017, o mercado de enzimas já alcançava cerca de US\$ 6,3 bilhões, e espera-se que até 2024 apresente um crescimento adicional de aproximadamente 6,8 %.

Entre as enzimas utilizadas na hidrólise da celulose, as endoglucanases desempenham um papel essencial, pois atuam na decomposição do polissacarídeo de forma aleatória, agindo nas regiões amorfas para liberar oligossacarídeos. Esses oligossacarídeos são posteriormente hidrolisados em unidades de celobiose pelas exoglucanases, enquanto as β -glicosidases atuam liberando os monômeros de glicose, que são essenciais para a produção de biocombustíveis (SRIVASTAVA et al., 2018; SILVA et al., 2018; YENNAMALLI et al., 2013).

Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de biomassa, sendo a biomassa lignocelulósica uma das fontes mais promissoras. Ela é composta por resíduos amplamente disponíveis e acessíveis, onde os polissacarídeos são convertidos em açúcares monoméricos. Posteriormente, esses açúcares são utilizados na produção de etanol por meio de processos de fermentação (LIU et al., 2018; ALI et al., 2020). Vale ressaltar que o custo de produção da celulase representa aproximadamente 40% do custo total de produção do etanol de segunda geração, o que tem impulsionado pesquisas com o objetivo de reduzir os custos de produção, aprimorar o desempenho enzimático e aumentar o rendimento do produto final (BEHERA e RAY, 2016; BARBOSA et al., 2020; GEEM et al., 2021).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo que englobe a produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação biotecnológica de uma nova protease e uma endoglucanase obtidas por meio do processo de fermentação em estado sólido com farelo de trigo, empregando o fungo *Pleurotus djamor* PLO 013 como organismo produtor.

1.6.2 Objetivos específicos

1.6.2.1 Enzima Endoglucanase

- Verificar o potencial do fungo *Pleurotus djamor* PLO13, como agente fermentador nos meios de cultura alternativos para produção de endoglucanases por fermentação em estado sólido;
- Determinar atividade endoglucanásica no extrato bruto;
- Caracterizar bioquimicamente a endoglucanase presente no extrato;
- Determinar a melhor metodologia de precipitação de proteínas;
- Purificar a endoglucanase produzida por cromatografia líquida;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima isolada.

1.6.2.2 Protease

- Analisar a produção de proteases pelo fungo cultivado em farelo de trigo como meios de cultura alternativo por fermentação em estado sólido;
- Determinar atividade proteolítica no extrato bruto;
- Caracterizar bioquimicamente a protease presente no extrato;
- Avaliar a atividade coagulante da protease do extrato bruto na coagulação de leite bovino desnatado e integral.

CAPITULO 02

Endoglucanase

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes empregados nos ensaios foram de grau analítico de pureza e as soluções foram preparadas utilizando água destilada e água ultrapura com uma resistividade específica de 18,2 M Ω cm, obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os seguintes reagentes foram utilizados neste estudo: Potato Dextrose Agar (PDA) (Kasvi, Itália), Ácido acético, metanol, etanol, butanol, t-butanol, isopropanol, propanona, acetronitrila, dinitrometano, diclorometano, heptano, bicromato de potássio, ácido nítrico (Dinâmica, São Paulo, Brasil), cloreto de sódio (NaCl), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), azul de bromofenol, cloreto de magnésio (MgCl₂), cloreto de manganês (MnCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), cloreto de zinco (ZnCl₂) (Synth, São Paulo, Brasil), azul de Coomassie brilhante, reagente de Bradford, albumina de soro bovino, sulfato de amônio, β - mercaptol, benzamidina, nitrato de prata (Sigma-Aldrich, São Luís, EUA), Triton X-100, Tween-40, Tween- 80, ácido tricloroacético, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de cálcio (CaCl₂), carboximetil celulose (CMC) (Vetec, São Paulo, Brasil), glicerol (Nuclear), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), (Roche, Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Obtenção e preparo dos resíduos

Neste estudo, empregamos uma variedade de resíduos industriais, a saber: fibra de coco (FC), bagaço de cana-de-açúcar (BCA), coroa de abacaxi (CA) e farelo de trigo (FT), conforme ilustrado nas Figuras 11A-D. Esses resíduos foram adquiridos junto a empresas localizadas em Maceió e na região circundante, no estado de Alagoas, Brasil.

Inicialmente, procedemos à secagem dos materiais em uma estufa com circulação de ar da marca TECNAL, a uma temperatura de 50°C, ao longo de um período de 24 horas. Em seguida, trituramos os resíduos em um moinho de lâminas do tipo Wiley da marca ACB LABOR®, até alcançarem um tamanho de partícula de 2,0 mm. Posteriormente, armazenamos esses resíduos em recipientes plásticos para uso futuro.

Para a análise dos resíduos agroindustriais utilizados neste estudo, determinamos o teor de proteína bruta, a fibra em detergente neutro (FDN), a fibra em detergente ácido (FDA), a lignina, a celulose e a hemicelulose, utilizando o protocolo da Association of Official Analytical Chemists (Associação dos Químicos Oficiais Analíticos).

Figura 11- Resíduos agroindustriais utilizados como meio de cultivo. Em A: fibra de coco (FC), B: bagaço de cana-de-açúcar (BCA), C: coroa de abacaxi (CA) e D: farelo de trigo (FT)



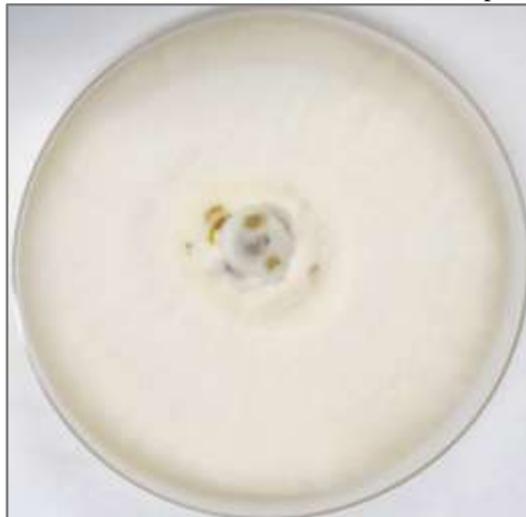
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

2.3 Preparo do inóculo

A linhagem *Pleurotus djamor* PLO13 foi originalmente adquirida da Micoteca da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situada em Minas Gerais, Brasil. Para o cultivo do fungo, seguimos o protocolo descrito por Velez et al. (2019), com algumas modificações. Utilizamos 20 mL de ágar batata dextrose (BDA) como meio de cultura e mantivemos as culturas a uma temperatura constante de 4 ± 2 °C.

Para estabelecer as culturas, transferimos um fragmento de micélio para uma placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA. Em seguida, incubamos essa placa em uma estufa bacteriológica (modelo SL 222, Solab) a uma temperatura de 25 ± 3 °C por um período de 10 dias. Após esse período, as culturas foram armazenadas em refrigeração a 4 ± 2 °C, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12- Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri em meio BDA



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

2.4 Perfil fermentativo

O perfil fermentativo foi conduzido com o objetivo de identificar a maior atividade de hidrólise e determinar o melhor período de fermentação para cada um dos resíduos agroindustriais utilizados como suportes. Com esse propósito, as fermentações foram realizadas ao longo de um período de 240 horas. A cada intervalo de 24 horas, coletou-se uma amostra da fermentação e quantificou-se a atividade endoglucanásica, conforme descrito em detalhes na seção 2.7.

2.5 Fermentação em estado sólido

Para o processo de FES, adotou-se a metodologia proposta por Patel e Shah (2021), com adaptações específicas para o nosso estudo. Após o crescimento micelial, procedemos à inoculação de quatro discos de ágar, cada um com 1,0 cm de diâmetro, contendo micélio de *P. djamor* PLO13, em cada um dos três erlenmeyers de 100 mL. Estes erlenmeyers continham previamente 5 g de resíduos (FC, BCA, CA e FT) que foram umedecidos com água destilada estéril até atingir a umidade desejada (umidade: 85 %, 80 %, 80 % e 60 % para FC, BCA, CA e FT, respectivamente;). Os resíduos foram previamente esterilizados em uma autoclave vertical a 121 °C por 20 minutos.

Os erlenmeyers foram mantidos em uma câmara de germinação (modelo SL 222, Solab) com temperatura controlada a 27 °C por um período de 10 dias. Todo o processo de inoculação dos discos de micélio nos resíduos foi estritamente realizado em uma capela de fluxo laminar para garantir condições estéreis.

2.6 Extração enzimática

Para o preparo do EBE utilizou-se a metodologia descrita por Silva et al. (2018). Para tanto, a cada 24h, após o início da etapa de fermentação, foi adicionado, a cada Erlenmeyer, 5 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5) para cada 1,0 g de resíduo. Essa mistura foi deixada em contato com o resíduo macerado por 10 minutos a 25°C. Posteriormente, o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi submetido a um processo de filtração e centrifugação a 9000 xg, durante 15 minutos, a 25°C. Esse procedimento resultou na separação do sobrenadante e do precipitado. O sobrenadante, obtido após a centrifugação e filtração, foi denominado como extrato bruto, enquanto o precipitado foi devidamente descartado.

2.7 Atividade endoglucanásica

Os ensaios de atividade enzimática seguiram o protocolo padrão recomendado pela IUPAC (GHOSE; BISARIA, 1987). A atividade da enzima endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucanase; EC 3.2.1.4) foi avaliada em um volume total de reação de 1,0 mL, composto por 10 μ L do extrato bruto ou frações do fracionamento orgânico, 100 μ L de uma solução de CMC a 2%, e 190 μ L de um tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5). Para o controle da reação, foram incubados 290 μ L de tampão acetato de sódio com 10 μ L do extrato enzimático bruto, mantidos a 50°C por 60 minutos.

Após a incubação, a quantificação dos açúcares redutores foi realizada de acordo com o método de Miller (1959), que envolveu a adição de 200 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) aos meios reacionais, seguida de incubação em água fervente por 5 minutos, seguida de resfriamento. Nesse processo, observa-se a redução do ácido 3,5-di-nitrosalicilato (inicialmente amarelo forte) e a oxidação do monossacarídeo, resultando na formação do produto 3-amino-5-nitro-salicilato (de cor laranja-marrom forte).

Após a diluição com 500 μ L de água destilada, a absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberado foi quantificada usando uma curva padrão de glicose. Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores por minuto a 50°C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g).

2.8 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi quantificada seguindo o método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Para isso, 10 µL das amostras foram misturados com 190 µL do reagente de Bradford. Após uma incubação de 5 minutos, a absorbância foi medida a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL de proteína.

2.9 Caracterização bioquímica da endoglucanase presente no extrato bruto enzimático (EBE)

Para os ensaios de caracterização bioquímica da endoglucanase utilizou-se as metodologias descritas por Silva et al. (2018), com adaptações, como descrito a seguir.

2.9.1 Temperatura ótima e termoestabilidade

A determinação da temperatura ótima de reação para a atividade da endoglucanase foi conduzida utilizando o ensaio padrão para a determinação dessa atividade (conforme a seção 2.7). As reações foram realizadas em uma faixa de diferentes temperaturas de incubação variando de 20 °C a 100 °C.

Para avaliar a estabilidade térmica, 10 µL do EBE contendo endoglucanase foi incubado em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5) a diferentes temperaturas (20 °C a 100 °C) por 1 hora. Após a incubação, o substrato (CMC) foi adicionado, e os ensaios de atividade endoglucanásica foram realizados nas condições ótimas de temperatura e pH. Ambas as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo que o resultado mais alto obtido foi considerado como 100%.

2.9.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

Para investigar o efeito do pH de reação, foram realizados testes em uma ampla faixa de pH, abrangendo valores de 2 a 13, utilizando os seguintes tampões: pH 2-3 citrato de sódio 0,05 M, pH 4-6 Acetato de sódio 0,05 M, pH 7 e 8 Tris-HCl 0,05 M, pH 9-11 Glicina 0,05 M e pH 12 e 13 Fosfato de sódio 0,05 M.

Para avaliar a estabilidade da endoglucanase em relação ao pH, 10 µL do EBE contendo endoglucanase foram incubados nos tampões com diferentes pH 2-3 citrato de sódio 0,05 M, pH 4-6 Acetato de sódio 0,05 M, pH 7 e 8 Tris-HCl 0,05 M, pH 9-11 Glicina 0,05 M e pH 12 e 13 Fosfato de sódio 0,05 M, por 1 hora a 50°C. Em seguida, adicionou-se o substrato (CMC) e realizaram-se os ensaios de atividade endoglucanásica

nas condições ótimas de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo considerado como 100% o valor de atividade mais elevado obtido.

2.9.3 Efeito da influência de íons na atividade enzimática

Foi avaliado o efeito de diferentes sais metálicos, incluindo $MgCl_2$, $CaCl_2$, $CuSO_4$, $NaCl$ e EDTA, sobre a atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos adicionando esses sais ao meio reacional, cada um a uma concentração de 10 mmol/L. Inicialmente, a enzima foi incubada na presença dos íons por 1 hora. Em seguida, adicionou-se o substrato (CMC) e realizaram-se os ensaios de atividade endoglucanásica nas condições ótimas de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), tendo como referência a atividade endoglucanásica nas condições padrões de temperatura e pH ótimos, que foi considerada 100%.

2.9.4 Efeito sob adição de surfactantes, solventes orgânicos e agentes desnaturantes

Foi realizado um estudo sobre a estabilidade da enzima presente no EBE na presença de surfactantes (SDS, Triton-X100, Tween 40 e Tween 80), solventes orgânicos (metanol, etanol, butanol, t-butanol, isopropanol, propanona, acetonitrila, dinitrometano, diclorometano, heptano) e agentes desnaturantes (ureia, tiourea e β -mercaptoetanol). Inicialmente, a enzima foi incubada na presença dessas substâncias por 1 hora. Em seguida, adicionou-se o substrato (CMC) e realizaram-se os ensaios de atividade endoglucanásica nas condições ótimas de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), tendo como referência a atividade endoglucanásica nas condições padrões de temperatura e pH ótimos, que foi considerada 100%.

2.9.5 Halotolerância

A tolerância ao sal da endoglucanase presente no EBE de *P. djamor PLO13* foi avaliada ao estimar a atividade de hidrólise em diferentes concentrações de $NaCl$. Utilizamos um tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5, e variamos a concentração de $NaCl$ nas reações (0M, 0,01M, 0,05M, 0,1 M, 1M, 2M, 3M, 4 M, 5M, 6M e 7 M).

2.10 Estratégias de Purificação de Proteínas

2.10.1 Fracionamento salino de proteínas com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Após a confirmação da presença das enzimas no extrato enzimático obtido por FES com o fungo *P. djamor* PLO 013, iniciou-se o processo de purificação enzimática. Utilizou-se o método de fracionamento salino com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, dividido em cinco frações, conforme detalhado na Tabela 9. O objetivo desse processo foi reduzir a concentração de moléculas contaminantes e concentrar a atividade enzimática em uma amostra mais pura. O sal foi adicionado gradualmente ao volume de extrato (10 mL), com agitação constante, em um banho de gelo, seguindo a metodologia proposta por De Santos et al. (2016), com algumas adaptações. Após a adição de sal, procedeu-se à centrifugação a 15.000 g, 4 °C, por 15 minutos, utilizando uma centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K). O sobrenadante foi retirado, e o precipitado foi ressuspensão em 500 μL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). A eficiência do processo de precipitação foi avaliada por meio da análise da atividade enzimática.

Tabela 7- Massa em gramas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por cada mL de amostra utilizada nas frações da Precipitação salina

Fração (%)	Massa em g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /mL
0- 20	0,106
20- 40	0,113
40- 60	0,120 1
60- 80	0,129
80- 100	---

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

2.10.2 Precipitação de proteínas com solvente orgânico (etanol)

Além do fracionamento com sulfato de amônio, também se realizou o fracionamento do extrato enzimático usando etanol como solvente orgânico. Assim como no fracionamento salino, foram realizados cinco ciclos de precipitação proteica com concentrações de etanol de 20 %, 40 %, 60 %, 80 % e 100 % (g/100 mL). Após a adição do volume de etanol em cada faixa desejada, as amostras foram incubadas na geladeira por 60 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (HITACHI Rx II series) a 15.000 g, a 4 °C, por 15 minutos. O sobrenadante foi então removido, e o precipitado foi ressuspensão em 500 μL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). A eficiência do processo de precipitação foi avaliada por meio do método de análise da atividade enzimática.

2.10.3 Metodologia para concentração da amostra

A fração que demonstrou a mais alta atividade enzimática (F80-100 %) foi submetida a metodologias de concentração de solução, conforme detalhado a seguir, com o objetivo de determinar a estratégia mais eficaz para a amostra em estudo.

2.10.3.1 Utilização de Polietilenoglicol (PEG)

Inicialmente, utilizou-se o polietilenoglicol como método para concentrar a amostra. Para isso, 10 mL da F80-100 % foram colocados em uma membrana de diálise, e sobre ela, adicionou-se uma quantidade suficiente de PEG para envolvê-la. Esse procedimento foi repetido até que uma redução significativa no volume inicial da amostra fosse observada.

2.10.3.2 Rotoevaporação e Liofilização da Amostra

Com o objetivo de eliminar o percentual de solvente orgânico (etanol) presente na amostra antes da liofilização, a amostra passou por um processo de rotoevaporação. Nesse caso, 10 mL da fração 80-100 % foram adicionados a um balão de decantação no rotoevaporador, permanecendo por cerca de 10 minutos ou até a completa evaporação do solvente ser observada. Em seguida, 10 mL do tampão da amostra (acetato de sódio a 100 mM com pH 5,0) foram usados para ressuspender a amostra no balão.

Após a remoção do etanol da amostra, esta foi submetida ao processo de liofilização para concentrá-la ainda mais. Para isso, 5,0 mL da amostra foram adicionados a um frasco de vidro e liofilizados por 12 horas a -30 °C. Ao final dessa etapa, a amostra foi ressuspensa em 1 mL do tampão mencionado anteriormente.

2.10.4 Eletroforese (SDS-PAGE)

Para a análise do perfil proteico, adotou-se o método de eletroforese desenvolvido por Laemmli (1970), utilizando gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram preparados géis de empilhamento e separação com concentrações de 5 % e 12 % (m/v), respectivamente, aplicando uma voltagem constante de 90 mV. O tampão das amostras consistia em 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 % de SDS, 10 % de glicerol, 5 % de β -Mercaptoetanol e 0,001 % de azul de Bromofenol. As amostras foram submetidas a um aquecimento de 5 minutos a 100 °C. As proteínas presentes no gel foram

reveladas usando uma solução de nitrato de prata (AgNO_3). Para isso, o gel foi inicialmente fixado em uma solução de metanol 40 % e ácido acético 10 % por 30 minutos. Em seguida, foi submetido a uma segunda fixação em uma solução de etanol 10 % e ácido acético 5 % por 20 minutos. Posteriormente, o gel foi incubado em uma solução contendo 0,0034 M de Bicromato de Potássio e 0,0032 N de ácido nítrico, sob agitação, durante 20 minutos. Após esse período, o gel foi lavado com água e imerso em uma solução de 0,012 M de nitrato de prata por 30 minutos. Em seguida, foi novamente lavado com água e colocado em uma solução de 0,28 M de carbonato de sódio (3 %) e 1,85% de formaldeído até que as bandas proteicas fossem visualizadas. A reação foi interrompida usando ácido acético 5 %.

2.10.5 Cromatografias utilizadas no processo de purificação

2.10.5.1 *Troca-iônica: CM*

Após a análise da maior atividade enzimática e do perfil proteico das frações resultantes do fracionamento orgânico, optou-se por aplicar a fração 100% rotoevaporada, injetando 5 mL da amostra por corrida, em uma coluna de cromatografia líquida de troca-iônica. O volume total da fração F80-100% foi injetado em um cromatógrafo líquido do tipo FPLC (Fast Protein Chromatography) AKTA pure M1GE, utilizando uma coluna de troca-iônica Hitrep CM-Sepharose de 56 mL equilibrada em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). Após essa etapa, as proteínas adsorvidas foram eluídas aplicando um gradiente salino com tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0 com 0,5 M de NaCl), numa taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A atividade enzimática de cada fração foi monitorada de acordo com o método descrito na seção 3.7. Além disso, a presença de proteínas foi avaliada por meio da leitura de absorbância a 280 nm.

2.10.5.2 *Troca-iônica: DEAE Sepharose*

A fração 80-100% rotoevaporada, injetando 5 mL da amostra por corrida, em uma coluna de cromatografia líquida de troca-iônica. A cromatografia foi realizada em uma coluna DEAE-Sepharose (30 cm) de caráter aniônico, acoplada a um sistema de FPLC AKTA Pure M1 (GE). A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0). Após o processo de lavagem, as proteínas adsorvidas foram eluídas aplicando um gradiente salino com tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0 com 0,5 M de NaCl), a uma taxa de fluxo de 0,5mL/min. A atividade enzimática de cada fração foi monitorada de acordo com o método descrito na seção 3.7. Adicionalmente, a presença

de proteínas foi avaliada por meio da leitura de absorvância a 280 nm.

2.11 Caracterização bioquímica da endoglucanase pura

Para os ensaios de caracterização bioquímica da endoglucanase utilizou-se as metodologias descritas por Silva et al. (2018), com adaptações, como descrito a seguir.

2.11.1 Temperatura ótima e termoestabilidade

A determinação da temperatura ótima de reação para a atividade da endoglucanase foi conduzida utilizando o ensaio padrão para a determinação dessa atividade (conforme a seção 2.7). As reações foram realizadas em uma faixa de diferentes temperaturas de incubação variando de 20 °C a 100 °C.

Para avaliar a estabilidade térmica, 10 µL do EBE contendo endoglucanase foi incubado em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5) a diferentes temperaturas (20 °C a 100 °C) por 1 hora. Após a incubação, o substrato (CMC) foi adicionado, e os ensaios de atividade endoglucanásica foram realizados nas condições ótimas de temperatura e pH. Ambas as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo que o resultado mais alto obtido foi considerado como 100%.

2.11.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

Para investigar o efeito do pH de reação, foram realizados testes em uma ampla faixa de pH, abrangendo valores de 2 a 13, utilizando os seguintes tampões: pH 2-3 citrato de sódio 0,05 M, pH 4-6 Acetato de sódio 0,05 M, pH 7 e 8 Tris-HCl 0,05 M, pH 9-11 Glicina 0,05 M e pH 12 e 13 Fosfato de sódio 0,05 M.

Para avaliar a estabilidade da endoglucanase em relação ao pH, 10 µL do EBE contendo endoglucanase foram incubados nos tampões com diferentes pH 2-3 citrato de sódio 0,05 M, pH 4-6 Acetato de sódio 0,05 M, pH 7 e 8 Tris-HCl 0,05 M, pH 9-11 Glicina 0,05 M e pH 12 e 13 Fosfato de sódio 0,05 M, por 1 hora a 50°C. Em seguida, adicionou-se o substrato (CMC) e realizaram-se os ensaios de atividade endoglucanásica nas condições ótimas de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo considerado como 100% o valor de atividade mais elevado obtido.

2.11.3 Efeito da influência de íons na atividade enzimática

Foi avaliado o efeito de diferentes sais metálicos, incluindo MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CuSO₄, ZnCl₂ e EDTA, sobre a atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos

adicionando esses sais ao meio reacional, cada um a uma concentração de 10 mmol/L. Inicialmente, a enzima foi incubada na presença dos íons por 1 hora. Em seguida, adicionou-se o substrato (CMC) e realizaram-se os ensaios de atividade endoglucanásica nas condições ótimas de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), tendo como referência a atividade endoglucanásica nas condições padrões de temperatura e pH ótimos, que foi considerada 100%.

2.11.4 Halotolerância

A tolerância ao sal da endoglucanase de *P. djamor* PLO13 foi avaliada ao estimar a atividade de hidrólise em diferentes concentrações de NaCl. Utilizamos um tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5, e variamos a concentração de NaCl nas reações (0M, 0,01M, 0,05M, 0,1 M, 1M, 2M, 3M, 4 M, 5M, 6M e 7 M).

2.11.5 Determinação das constantes cinéticas

Os parâmetros cinéticos foram determinados em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, variando a concentração do substrato (CMC) de 0,05 % a 3,5 %, sob condições de ensaio otimizadas pelo método padrão mencionado na seção 2.7. A constante de Michaelis-Menten (K_m , mg/mL) e a velocidade máxima de reação (V_{Max} , mol/min/mL) foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. Cada experimento foi realizado em triplicata.

2.12 Resultados e discussões

2.12.1 Caracterização estrutural dos resíduos orgânicos

O potencial nutritivo (*in natura*) dos substratos lignocelulósicos, fibra de coco (FC), bagaço de cana-de-açúcar (BCA), coroa de abacaxi(CA) e farelo de trigo (FT) foram investigados através de análises físico-químicas, a fim de determinar seu uso como fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultivo microbiano para o crescimento do fungo *Pleurotus djamor* PLO13. Os percentuais (% g / 100 g de matéria seca) obtidos *in natura* foram expressos na tabela 8.

Tabela 8- Composição química do farelo de trigo *in natura*. Abreviaturas: Fibra detergente neutra em FDN e fibra detergente ácida FDA

Componentes	Farelo de trigo (FT)	Fibra de Coco (FC)	Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)	Coroa de abacaxi (CA)
	% (g / 100 g)			
Proteína bruta	19,46 ± 0,53	3,98± 0,62	2,67± 0,09	7,77± 0,21
FDN	51,93 ± 1,94	79,09± 0,49	95,8± 0,12	89,38± 0,17
FDA	13,32 ± 0,89	71,37± 0,37	63,17± 0,20	44,38± 0,32
Lignina	3,37 ± 0,46	30,24± 0,19	10,24± 1,08	4,96± 0,24
Celulose	9,94 ± 0,98	41,12± 0,24	52,92± 0,15	39,42± 0,09
Hemicelulose	38,86 ± 1,65	7,72± 0,61	32,63± 0,08	44,9± 0,19

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A análise físico-química do potencial nutritivo dos substratos lignocelulósicos revelou uma notável diversidade entre os resíduos, com diferenças significativas em todas as respostas analisadas (Tabela 8). Entre os resíduos investigados, o FT se destacou, apresentando o maior teor de proteínas totais (19,46%) e os menores percentuais de FDA (13,32 %), lignina (3,37 %) e celulose (9,94 %). No entanto, também demonstrou um teor significativo de FDN (51,93 %) e hemicelulose (38,86 %). O alto percentual de proteínas totais, juntamente com o reduzido teor de lignina no farelo de trigo, são fatores que podem favorecer o aumento na secreção de enzimas, especialmente as lignocelulósicas. Esses resultados corroboram com estudos anteriores, como o de Franceschina (2013), que analisou o potencial nutritivo *in natura* de coprodutos do trigo e encontrou um teor de proteína total semelhante, igual a 17,49 %.

Por outro lado, a FC, BCA e CA revelaram os menores percentuais de proteínas totais e hemicelulose, acompanhados por elevados teores de frações fibrosas, como FDN,

FDA, lignina e celulose. A composição química desse resíduo é considerada complexa devido ao alto percentual de lignina presente.

A fração FDN é responsável por fracionar a amostra em uma porção solúvel em detergente neutro, que compreende o conteúdo celular, incluindo amido, proteína, açúcar e outros compostos altamente digestíveis, e uma porção insolúvel em detergente neutro, correspondente à parede celular. Por outro lado, a FDA, por ser digerida em detergente ácido, solubiliza a hemicelulose da parede celular, liberando a celulose e a lignina (PRATES, 2007).

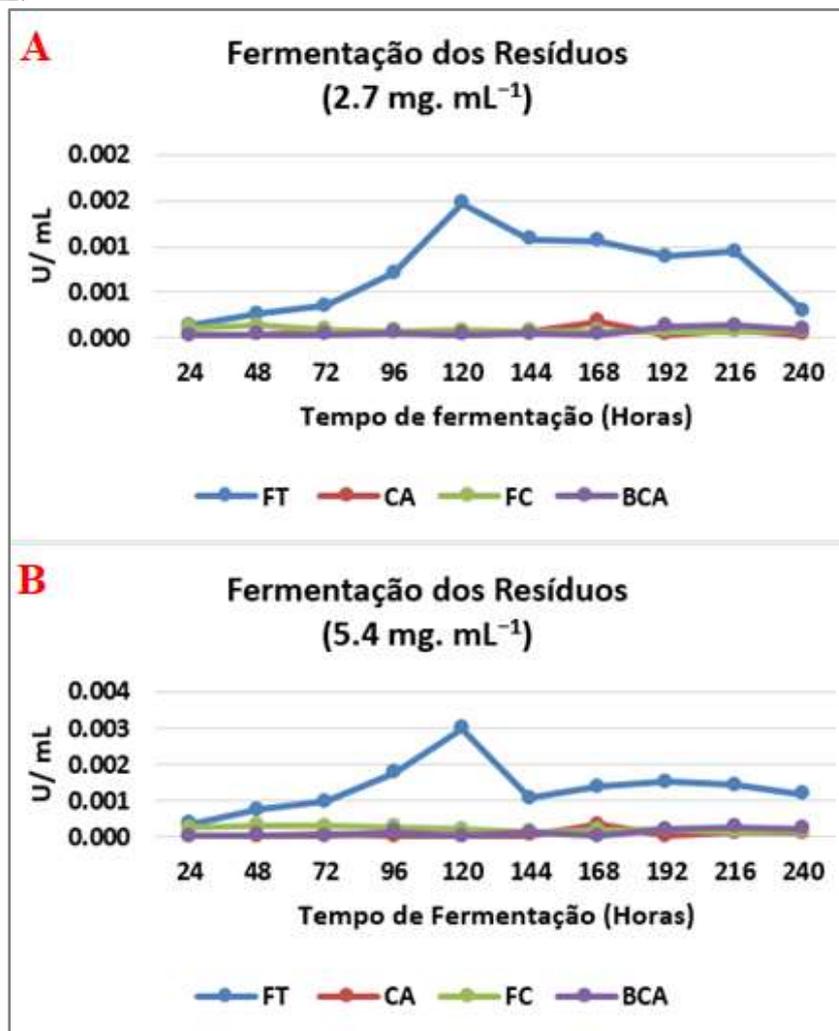
A lignina, um polímero complexo e resistente presente nas paredes celulares das plantas, desempenha um papel importante, fornecendo rigidez e resistência. No entanto, sua insolubilidade em água representa uma barreira para a conversão efetiva de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis mediante a ação de alguns fungos filamentosos (ÁZAR et al., 2019). Desta forma é notório dizer que, quanto menor o teor de lignina em presente em uma amostra, maior será a facilidade de degradação da celulose e hemicelulose por tais microorganismos que, conseqüentemente apresetarão maior secreção de enzimas, especialmente as lignocelulolíticas (DOS SANTOS, 2023).

Os resíduos agroindustriais apresentam um elevado potencial de utilização em meios de cultivos para microrganismos nos processos de FES, devido à sua riqueza em nutrientes e carbono, além de proporcionarem condições ideais para o crescimento de fungos. A eficiência desse processo está intrinsecamente ligada à composição nutricional do meio de cultivo e a fatores ambientais, como temperatura, pH, período de incubação e densidade inicial do inóculo (MAMO et al., 2020; SANTOS et al., 2016).

2.12.2 Fermentação em estado sólido e perfil fermentativo diferentes meios de cultura.

O fungo *Pleurotus djamor* PLO13 apresentou crescimento e perfil de produção da enzima endoglucanase bem distintos nos quatro resíduos agroindustriais e duas concentrações analisadas (2.7 mg/ mL e 5.4 mg/mL) respectivamente, como mostra os perfis fermentativos na figuras 13A e 13B.

Figura 13- Perfil da produção de endoglucanase (U/mL) em fermentações em estado sólido por *P. djamor* PLO13, com fibra de coco (FC), bagaço de cana-de-açúcar (BCA), coroa de abacaxi (CA) e farelo de trigo (FT), a 27°C e umidade adequada para cada resíduo. A- Concentração de 2.7 mg/ mL e B- Concentração de 5.4 mg/ mL.



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

São apresentados os perfis de produção da enzima (U/mL) em função do tempo de incubação nos seguintes meios de cultivo: Farelo de trigo (em azul), Coroa de abacaxi (vermelho), Fibra de coco (verde) e bagaço de Cana-de-açúcar (roxo). Os resultados expressos na figura 13 demonstram que o fungo foi capaz de sintetizar a endoglucanase nos quatro meios de cultivo empregados utilizando as seguintes condições: umidade de 85 %, 80 %, 80 % e 60 % para FC, BCA, CA e FT, respectivamente; temperatura de 27 °C, em um período de 240 horas. Essa característica se deve à fácil adaptação e desenvolvimento do microrganismo em diferentes meios e condições de cultivo, como temperatura entre 14 a 28°C e alta umidade relativa (RIGO et al., 2021).

Em ambas as concentrações, observou-se que o farelo de trigo foi o resíduo agroindustrial que apresentou melhores condições para o crescimento do fungo e, conseqüentemente, maior produção da enzima endoglucanase. Observando o perfil

fermentativo do fungo no farelo de trigo, percebe-se que a produção da endoglucanase apresentou uma curva de produção com aumento ao longo do tempo, atingindo seu pico em 120 horas, decrescendo em até 240 horas de cultivo. O farelo de trigo é um resíduo menos complexo quando comparado com os outros três utilizados, e isso favoreceu o desenvolvimento do fungo e a produção da enzima. Outras características, como porosidade do resíduo, tamanho adequado das partículas, baixa concentração de lignina e elevada quantidade de nutrientes essenciais, como celulose, hemicelulose, sais minerais e proteínas na amostra, podem ter influenciado na produção da enzima (TANASKOVIC et al., 2021).

É importante ressaltar que a produção enzimática é diretamente proporcional à quantidade de nutrientes presentes no meio de cultivo, uma vez que o microrganismo depende desses nutrientes para se desenvolver e, conseqüentemente, secretar as enzimas. Desta forma, é normal observar um crescimento, seguido de decréscimo na produção enzimática durante o período de FES (SANTOS et al., 2016), como mostrado na Figura 19.

O bagaço de cana-de-açúcar, em ambas as concentrações, foi o resíduo que apresentou o menor crescimento do fungo e, conseqüentemente, menor produção da enzima, que foi detectada após 192 horas. Tal resultado pode ser justificado devido à sua composição complexa, oriunda do alto percentual de lignina, que varia entre 17 % e 32 % e atua como uma barreira para o fungo, impedindo a conversão efetiva dos polímeros celulose e hemicelulose em açúcares redutores (DOS SANTOS et al., 2023; ÁZAR et al., 2019).

A coroa de abacaxi apresentou comportamento semelhante ao bagaço da cana-de-açúcar, demonstrando um baixo crescimento do fungo e a produção da endoglucanase manteve-se próxima à linha de base, porém é possível observar que há presença de pequenas quantidades de açúcares redutores após 168 horas de cultivo do fungo. A fibra de coco apresentou perfil de crescimento lento semelhante aos detectados para BCA e CA, no entanto, observou-se que foi capaz de secretar uma quantidade de endoglucanase, mesmo que reduzida, a partir de 24 horas de cultivo, mantendo-se nesse perfil até as 120 horas, com posterior redução. Semelhante à cana-de-açúcar, o coco apresenta uma alta complexidade em seu resíduo, devido ao alto percentual de lignina, o que resulta no aumento da dificuldade de alguns fungos se desenvolverem e terem acesso à hemicelulose e celulose (YOON et al., 2019). A fibra do coco verde apresenta entre 35 % e 45 % de lignina, 23 % e 43 % de celulose e 3 % e 18 % de hemicelulose (DOS SANTOS et al., 2023).

É essencial ressaltar que a maioria dos trabalhos faz uso de algum tipo de suplementação do meio de cultivo, o que encarece o processo, diferente do que foi adotado neste trabalho, que procurou utilizar apenas o resíduo lignocelulósico, água e o microrganismo, e obteve bons resultados na produção enzimática (Figura 19).

O método de FES tem sido amplamente utilizado em pesquisas que buscam produzir enzimas, como a endoglucanase, pois é considerado ambientalmente sustentável e proporciona um ambiente favorável para o crescimento dos microrganismos responsáveis pela secreção de biomoléculas de alto valor biotecnológico. Narra e colaboradores (2014) utilizaram FES como método para o cultivo do fungo *Aspergillus terreus*, visando a produção de endoglucanase da família GH 12. O *Trichoderma reesei* RUT C-3 foi capaz de secretar endoglucanase em farelo de trigo (IDRIS et al., 2017). O extrato bruto obtido da FES com o fungo *Fomitopsis meliae* CFA 2, submetido à precipitação orgânica com acetona, resultou em uma endoglucanase bruta (PATEL et al., 2021). A produção de endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 foi avaliada, utilizando farinha de casca de arroz como substrato na FES (MARQUES et al., 2018).

2.12.3 Caracterização do extrato

2.12.3.1 Temperatura ótima e termoestabilidade

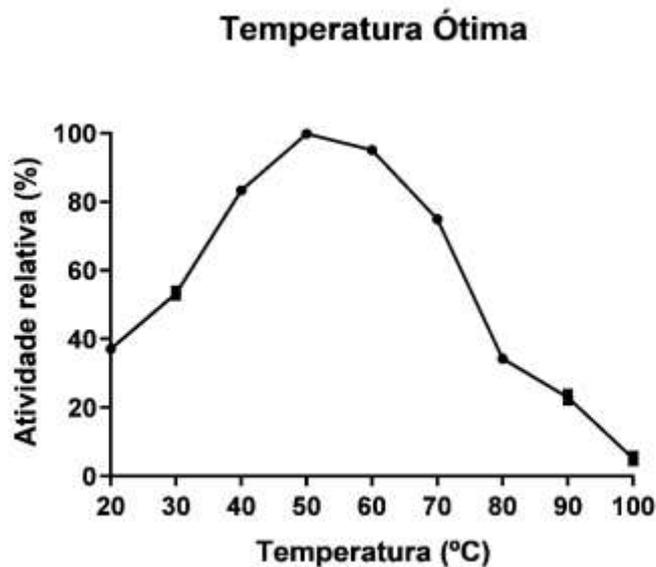
A estabilidade e manutenção de uma proteína são influenciadas por diversos fatores, sendo a temperatura um dos componentes físicos mais determinantes para a estrutura nativa das proteínas. Cada proteína possui uma faixa de temperatura ótima na qual apresenta seu melhor desempenho (NELSON; COX, 2014).

O efeito da temperatura na atividade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 foi avaliado em uma faixa de 20 a 100 °C, conforme ilustrado na Figura 14. Observa-se que a atividade relativa da endoglucanase aumentou à medida que a temperatura de reação foi incrementada, atingindo seu valor máximo a 50 °C. A enzima manteve aproximadamente 75 % de sua atividade máxima até 70 °C e ainda preservou cerca de 30 % de sua atividade a 80 °C, mantendo ativa em até 90 °C, com cerca de 20 % de atividade, o que demonstra um considerável potencial para aplicações industriais. A temperatura é um fator que influencia diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a formação de produtos nos fungos filamentosos (SANTOS et al., 2016).

Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores, como o de Santos et al. (2023), que descreveram a endoglucanase de *P. sanguineus* apresentando temperatura ótima de 50 °C. Além disso, o estudo de Hmad et al. (2017) sobre a endoglucanase de *Stachybotrys microspora* também identificou a temperatura ótima como sendo 50 °C. Esses dados reforçam a importância da temperatura como um fator crítico no desempenho das enzimas e destacam a capacidade da endoglucanase de *P. djamor* PLO13 de manter sua atividade em uma ampla faixa de temperatura, o que a torna promissora para diversas

aplicações industriais.

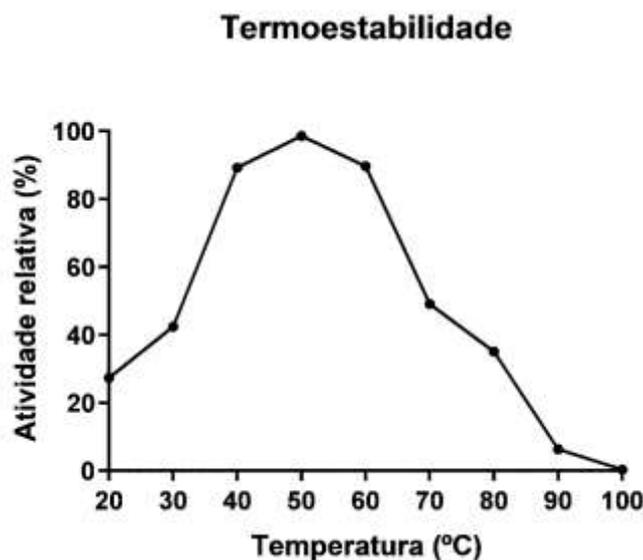
Figura 14- Temperatura ótima: Endoglucanase presente no EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0) em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 50°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplica.



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A termoestabilidade da endoglucanase proveniente do EBE de *P. djamor* PLO13 foi avaliada mediante sua incubação na faixa de temperatura de 20 a 100 °C, durante um período de 1 hora, conforme exemplificado na Figura 15. Os resultados obtidos revelam que a enzima manteve 90% de sua atividade relativa na faixa de 40 a 60 °C, demonstrando, assim, uma ampla e relevante estabilidade térmica. Surpreendentemente, mesmo quando exposta a 70 °C, a enzima conservou aproximadamente 75% de sua atividade, e a 80 °C, ainda foi observado cerca de 35% de atividade. Somente a 90 °C, a enzima sofreu uma perda quase completa de sua atividade.

Figura 15- Perfil de termoestabilidade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Esses resultados corroboram com as descobertas previamente apresentadas por Silva e colaboradores (2018), que também avaliaram a estabilidade térmica de uma endoglucanase purificada de *B. ricini* URM 5627. Neste estudo, a endoglucanase conseguiu manter cerca de 90% de sua atividade na faixa de temperatura de 39 a 60 °C, após 1 hora de incubação. Em um outro trabalho realizado por Santos et al. (2016) a endoglucanase produzida por *Aspergillus niger* manteve sua atividade por 60 minutos a 60 °C. É igualmente relevante mencionar um estudo anterior com a endoglucanase de *Aspergillus terreus*, que exibiu estabilidade em temperaturas de 30, 40 e 50 °C durante 30 minutos, mantendo 100 % de sua atividade. No entanto, a enzima foi inativada a 70 °C, preservando apenas 10 % de sua atividade após 30 minutos de incubação (Narra et al., 2014). Esses achados indicam a capacidade da endoglucanase de *P. djamor* PLO13 de manter sua atividade em uma ampla faixa de temperatura, o que a torna altamente promissora para diversas aplicações industriais que requerem estabilidade térmica, como as indústrias de alimentos e biotecnologia.

As proteínas exibem variações significativas em sua estabilidade, sendo influenciadas por diversos fatores, como pH e temperatura, entre outros. O aumento da temperatura em um ambiente proteico desencadeia uma série de eventos cinéticos que afetam diretamente a conformação molecular da proteína. Esses eventos incluem vibrações que impactam as ligações não covalentes e promovem rotações ao longo dessas ligações. Como resultado, átomos podem se afastar ou se aproximar de maneira indesejada, levando a alterações na conformação tridimensional da proteína (COSTA,

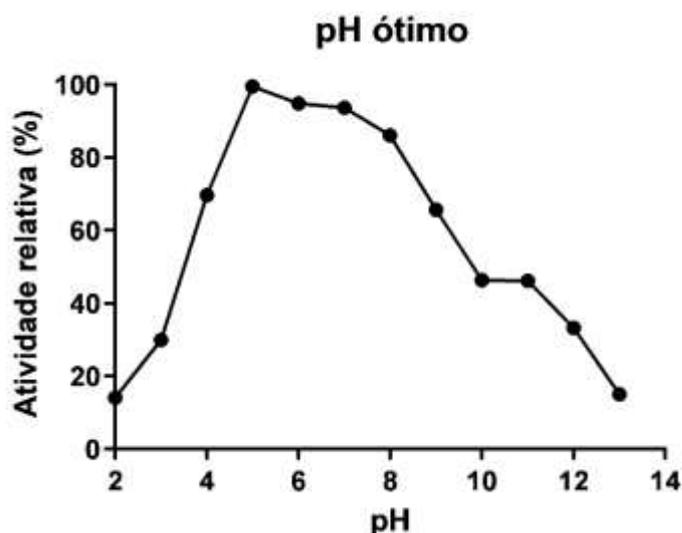
2022; SANTOS, 2020)

Em ambas as situações, a molécula proteica tende a perder sua estrutura nativa, alcançando estados energéticos desfavoráveis. Isso, por sua vez, leva à diminuição ou até mesmo à completa perda de sua atividade biológica. Esses conceitos fundamentais sobre a influência da temperatura na estabilidade proteica são amplamente respaldados pela literatura científica (STRYER; JEREMY, 2003; NELSON; COX, 2014).

2.12.3.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

A atividade enzimática da endoglucanase presente no EBE de *P. djamor* PLO13 foi investigada em uma faixa de pH que variou de 2,0 a 13,0, mantendo a temperatura constante a 50 °C, conforme ilustrado na Figura 16. Os resultados revelaram que essa enzima atingiu sua atividade máxima em um ambiente com pH 5,0, indicando que esse é o pH ótimo para sua ação catalítica. É relevante destacar que a atividade enzimática permaneceu notavelmente estável em uma ampla faixa de pH, abrangendo valores de 4,0 a 11,0. Somente em pH extremamente ácido ou alcalino ocorreu uma redução significativa da atividade enzimática. Esses achados são consistentes com resultados anteriores de pesquisa, como o estudo realizado com a celulase de *Aspergillus niger*, obtida a partir de FES utilizando pera espinhosa como substrato, que também apresentou atividade ótima em pH 5,0 (SANTOS et al., 2016).

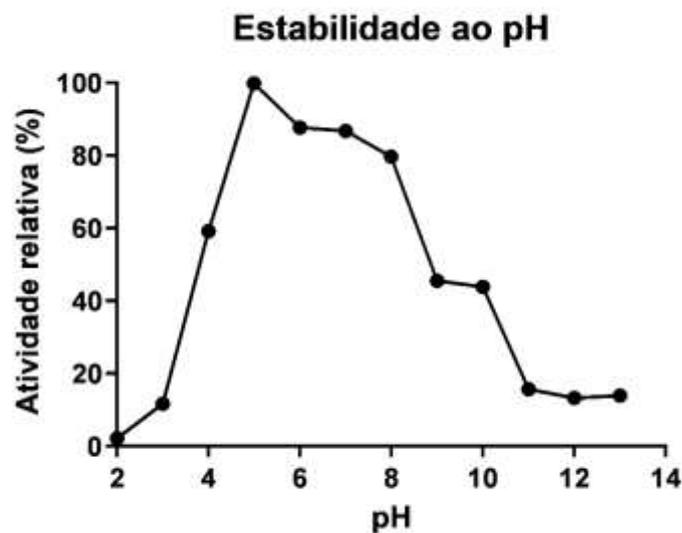
Figura 16- pH ótimo: Atividade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo, em diferentes pHs (a atividade mais alta obtida em pH 5 foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Sabe-se que a variação do pH pode ser classificada como um dos fatores que podem desnaturar as proteínas. Isso ocorre porque as variações de pH têm o potencial de modificar a estrutura proteica, seja por meio da quebra das ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos ou pela alteração das pontes salinas entre as cadeias laterais compostas por aminoácidos que possuem cargas (MONDAL; SWAMY, 2020). Nesse contexto, realizamos uma avaliação da estabilidade da endoglucanase em diferentes faixas de pH, abrangendo condições ácidas, neutras e alcalinas.

Figura 17- Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A estabilidade ao pH foi avaliada em uma ampla faixa, variando de 2 a 13 (Figura 17). Os resultados revelam que a enzima manteve sua atividade em uma ampla faixa de pHs, mantendo-se estável em pHs ácidos, neutros e alcalinos. No pH 4,0, a atividade foi mantida em cerca de 70 %, enquanto nos pHs 6,0 e 7,0, sua atividade permaneceu em torno de 95 %, com uma leve redução para 80 % no pH 8,0. No pH 9,0, a enzima ainda manteve cerca de 60 % de sua atividade, porém, no pH 10,0 essa atividade foi reduzida para 40 %. Somente em pH superior a 11,0 a endoglucanase teve sua atividade completamente inativada. Em um estudo realizado por De Almeida e colaboradores (2013), foi descrito que a endoglucanase de *Fusarium verticillioides* apresenta atividade máxima entre pH 4,5 e 5,5.

As endoglucanases que apresentam estabilidade em pH acima de 7,0 são amplamente utilizadas nas indústrias de detergentes e têxteis. Esses resultados destacam a considerável estabilidade da enzima em uma ampla faixa de pH, tornando-a

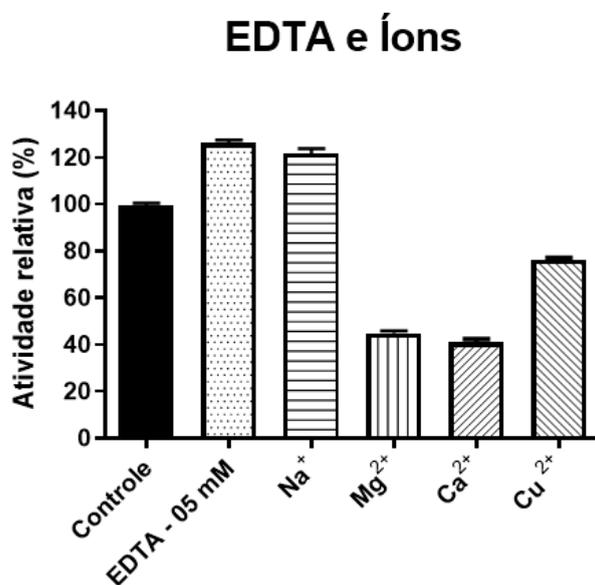
potencialmente útil em diversas aplicações industriais (DHAR; KASANA; GULATI, 2015).

2.12.3.3 Efeito da adição de sais

Sabe-se que algumas proteínas são formadas por uma parte não proteica em sua molécula, caracterizada como coenzimas ou cofatores, que desempenham um papel fundamental na facilitação das funções dessas biomoléculas (COSTA, 2022). Sendo assim, buscamos analisar se a endoglucanase presente no extrato necessita dessas moléculas para exercer sua atividade completa.

O EDTA, ácido etilenodiaminotetracético, é classificado como um íon quelante que auxilia na estabilização e ligação proteica, inibindo a atividade de proteínas dependentes de íons metálicos, além de remover cátions divalentes interferentes (SANTOS, 2020). Para tanto, a especificidade de ligação de vários íons metálicos foi investigada frente a atividade endoglucanásica, como mostra a figura 18.

Figura 18- Atividade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes sais metálicos (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A análise do gráfico (Figura 18) revela um aumento de 20 % na atividade da endoglucanase em estudo na presença de EDTA. Esse resultado pode ser explicado pelo efeito quelante do EDTA, que se liga a íons metálicos, estabilizando a enzima e criando um ambiente mais favorável para sua atividade enzimática. Essa melhoria na atividade na

presença de EDTA é consistente com descobertas anteriores, como as de Pham, Quyen e Nghiem (2012), que observaram um aumento de 35 % na atividade da endoglucanase purificada de *Aspergillus niger* VTCC-F021 na presença de EDTA em uma concentração semelhante à usada neste estudo.

Por outro lado, em contraste com esses resultados, um estudo realizado por Marques e colaboradores (2018) demonstrou que o EDTA inibiu a atividade das endoglucanases presentes no extrato bruto obtido a partir da FES de resíduo de casca de arroz com o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. Essa variação nos efeitos do EDTA pode estar relacionada às características específicas das enzimas e das condições da reação em cada estudo.

Dentre os íons metálicos analisados, o Na^+ teve a maior influência, aumentando a atividade enzimática em cerca de 20 %. Essa ativação pelo íon Na^+ é consistente com os resultados relatados por Wang e colaboradores (2008), que observaram um aumento de 57 % na atividade enzimática na presença desse íon. No entanto, os íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+} atuaram como inibidores da atividade da endoglucanase. Os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} tiveram o maior impacto na redução da atividade enzimática, com uma queda de 60% na presença de Mg^{2+} . Essa inibição pelos íons divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} é consistente com a necessidade comum de cátions divalentes para estabilizar a atividade de enzimas celulolíticas, conforme destacado por Lin (2012).

Além disso, o íon Cu^{2+} também demonstrou um efeito inibitório, o que está em conformidade com relatos anteriores sobre o efeito inibidor desse íon em endoglucanases de vários microrganismos (MURASHIMA et al., 2002; HUY et al., 2016; PHADTARE et al., 2017). Portanto, a influência dos íons metálicos na atividade da endoglucanase pode variar dependendo das condições específicas da reação e das propriedades da enzima envolvida.

2.12.3.4 *Halotolerância*

A halotolerância, que se refere à capacidade de manter a atividade em elevadas concentrações salinas, é uma característica frequentemente encontrada em microrganismos extremófilos e em algumas macromoléculas. Essa característica é de grande importância para diversos processos industriais, visto que permite a realização de reações em condições salinas adversas (SANTOS et al., 20223).

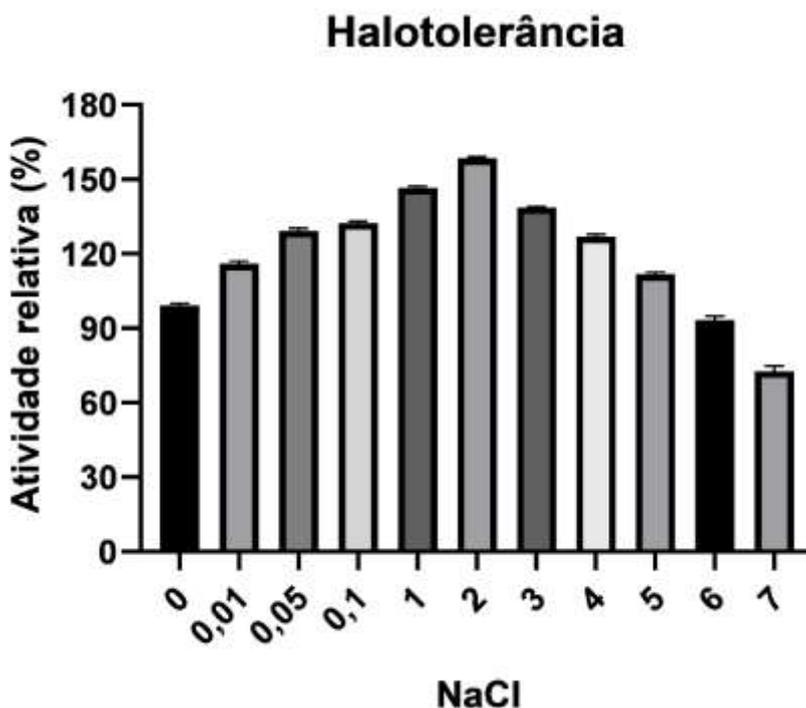
Embora a capacidade halotolerante seja mais comum em microrganismos extremófilos, também pode ser encontrada em macromoléculas de microrganismos

mesófilos. A endoglucanase presente no EBE de *P. djamor* PLO13 foi submetida a ensaios na presença de diferentes concentrações de NaCl (variando de 1 a 7 M), em comparação com um controle mantido nas condições padrão. Os resultados demonstram que a enzima manteve sua atividade em todas as concentrações de sal testadas.

Além disso, observou-se que a atividade da endoglucanase aumentou com o aumento da concentração salina, atingindo seu pico em torno de 2 M de NaCl. Esse comportamento caracteriza a enzima como halotolerante, uma vez que ela manteve uma atividade enzimática superior a 100 % em até 5 M de NaCl. Nas concentrações de 6 M e 7 M, a enzima se manteve ativa, com ativa em torno de 90 % e 70 %, respectivamente. Vale destacar também que a endoglucanase apresentou um comportamento halofílico, o que significa que sua atividade enzimática foi maior na presença de sal em comparação com a atividade na ausência de NaCl (Figura 19).

Esses resultados indicam que a endoglucanase de *P. djamor* PLO13 é capaz de manter sua atividade e até mesmo aumentá-la em ambientes com concentrações salinas elevadas, tornando-a uma potencial candidata para aplicações industriais que envolvem condições salinas desafiadoras.

Figura 19- : Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo. A atividade da CMCase foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima purificada sem NaCl foi tomada como 100% - controle).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

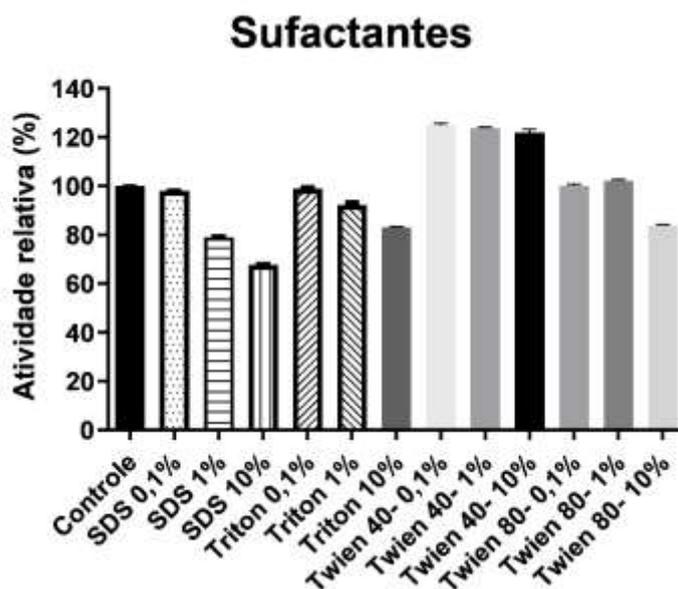
Diversos estudos na literatura corroboram a observação de endoglucanases com características semelhantes às encontradas na enzima em estudo. Santos e colaboradores (2023) investigaram a endoglucanase de *P. sanguineus* e também observaram sua característica halotolerante, uma vez que a enzima manteve sua atividade enzimática em mais de 100 % em concentrações de até 5 M de NaCl. Além disso, os autores classificaram a enzima como halofílica, pois sua atividade enzimática foi ainda maior na presença de sal quando comparada com a atividade na ausência de NaCl.

Em outro estudo, Santos et al. (2018) purificaram uma endoglucanase halotolerante de *Botrytis ricini*, a qual também apresentou atividade enzimática acima de 100% em uma concentração de 2 M de NaCl. Esses achados reforçam a presença de endoglucanases com características halotolerantes e halofílicas em diferentes microrganismos.

2.12.3.5 Efeito da adição de solventes orgânicos, detergentes e agentes desnaturantes

Conforme ilustrado nas Figuras 20, 21 e 22, a endoglucanase encontrada no EBE de *P. djamor* PLO13 mostrou-se estável diante de diversas condições.

Figura 20- Atividade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes surfactantes (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).



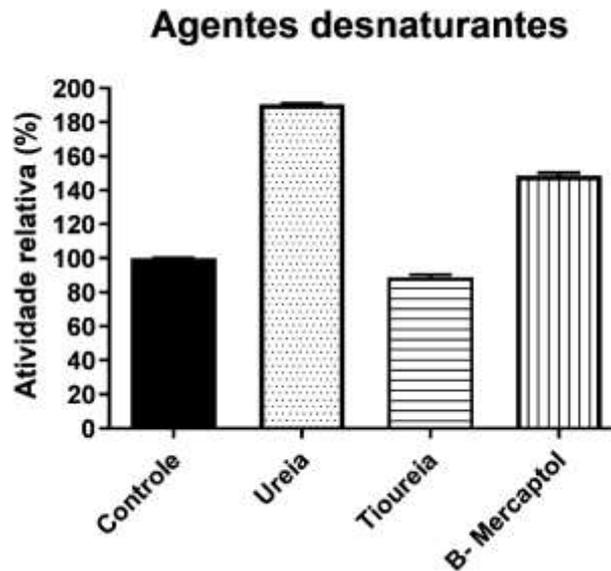
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Os resultados da avaliação da atividade da endoglucanase em relação aos surfactantes testados (Figura 20) revelaram que a enzima exibiu uma estabilidade

excepcional. A presença de 0,1 % de SDS não afetou sua atividade, mantendo-se a 100 %. Mesmo em concentrações mais elevadas de 10 % de SDS, a enzima conservou cerca de 70 % de sua atividade. Quando exposta ao Triton X-100, nas concentrações de 0,1 %, a atividade enzimática permaneceu inalterada, enquanto em concentrações de 1,0 % e 10 %, houve uma leve redução, mantendo-se em aproximadamente 95 % e 90 %, respectivamente. Por outro lado, na presença de Tween 40, nas três concentrações testadas, a atividade da endoglucanase aumentou em 20 % em comparação com o controle, atingindo um impressionante percentual de 120 %. Em relação ao Tween 80, na concentração de 0,1 %, a atividade manteve-se em 100 %, aumentando para cerca de 110 % em 1,0 %, e experimentando uma leve redução, mantendo-se em torno de 90 % na concentração de 10 %.

É importante destacar que o efeito dos surfactantes nas proteínas é influenciado pela natureza do detergente, pelas características da proteína e pelas condições ambientais (AFSHARNEZHAD; SHAHANGIAN; SARIRI, 2019; NAEEM; FATIMA; HASAN KHAN, 2006). Esses resultados são inovadores, uma vez que enzimas estáveis em relação a detergentes aniônicos como o SDS, detergentes não iônicos como o Triton X-100 e surfactantes não iônicos como o Tween 40 e o Tween 80, que diferem em propriedades físico-químicas como hidrofobicidade, tamanho e peso molecular, ainda são pouco estudadas. A estabilidade da enzima presente no EBE obtido através da FES na presença desses surfactantes abre perspectivas promissoras para sua aplicação em diversas indústrias, notadamente nas áreas de detergentes, cosméticos e alimentos (CHOI et al., 2015). É relevante mencionar que manchas de origem proteica podem ser efetivamente removidas somente por detergentes que contenham enzimas (KUMAR et al., 2008).

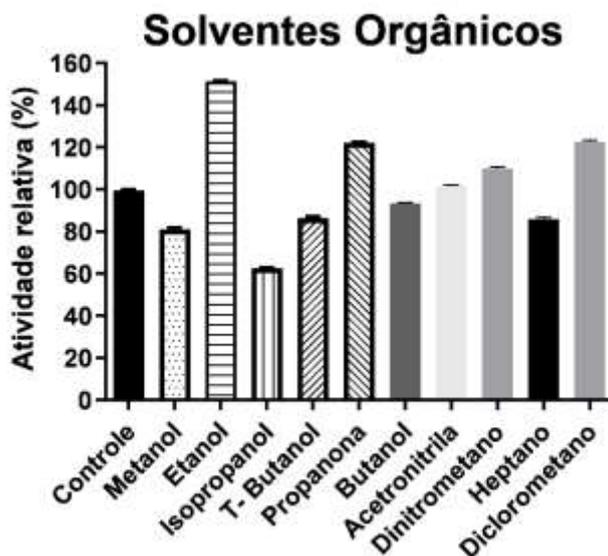
Figura 21- Atividade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes agentes desnaturantes (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A estabilidade da endoglucanase também foi investigada diante de agentes desnaturantes, incluindo ureia, tiourea e β -mercaptoetanol (Figura 21). Os resultados revelaram que a enzima exibiu alta estabilidade nesse contexto. Na presença de ureia, sua atividade dobrou, e quando confrontada com β -mercaptoetanol, houve um aumento significativo de cerca de 60 % em comparação com o controle. Por outro lado, na presença de tiourea, a atividade da enzima sofreu uma ligeira redução, mantendo-se em torno de 95% de sua atividade. Esses resultados sugerem que a alta integridade do sítio ativo da enzima na presença desses desnaturantes pode levar ao aumento da atividade, um fenômeno já documentado em estudos anteriores envolvendo diversas enzimas (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012; YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2012;). Essa estabilidade e capacidade de adaptação da endoglucanase a diferentes condições tornam-na uma candidata promissora para uma ampla gama de aplicações industriais.

Figura 22- Atividade da endoglucanase do EBE de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes solventes orgânicos (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Os efeitos dos solventes orgânicos na atividade das enzimas são de grande relevância em aplicações industriais e de pesquisa, pois podem influenciar significativamente o desempenho das enzimas em diferentes condições. De acordo com os dados apresentados na Figura 22, foi observado que a endoglucanase exibiu respostas variadas na presença de diferentes solventes orgânicos.

Em condições de exposição a solventes como etanol, propanona, dinitrometano e diclorometano, a endoglucanase apresentou um aumento em sua atividade, com incrementos de aproximadamente 55 %, 20 %, 10 % e 20 %, respectivamente, em comparação com o controle. Essa melhoria na atividade enzimática pode ser atribuída a interações específicas entre a enzima e esses solventes, que podem estabilizar ou facilitar a conformação ativa da proteína. Por outro lado, butanol e acetonitrila não tiveram um impacto significativo na atividade da enzima, mantendo-a próxima ao nível de controle. No entanto, em presença de metanol e heptano, houve uma redução na atividade enzimática, com valores em torno de 80 % e 90 % da atividade original, respectivamente. Já na presença de T-butanol e heptano, a atividade da endoglucanase foi reduzida em cerca de 10 %.

Ao avaliar a estabilidade da endoglucanase diante de uma diversidade de solventes orgânicos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, reveste-se de relevância nas aplicações enológicas, especialmente no contexto de enzimas capazes de tolerar o etanol durante processos de fermentação alcoólica. Além disso, a capacidade de tolerância a

solventes revela-se crucial, potencializando sua aplicação em setores industriais que empregam solventes para a produção de produtos de elevado valor agregado (SAROJ; NARASIMHULU, 2022). A ativação da atividade da endoglucanase frente a etanol, a configura como uma ótima candidata à produção de etanol 2G, uma vez que resiste a presença dele. Outros trabalhos também descreveram sobre a estabilidade de endoglucanases na presença de etanol. Gomes e colaboradores (2023) descreveram que a endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 manteve 92,65 % de sua atividade na presença de etanol. Sheng Xue et al. (2018) observaram um acréscimo na atividade da endoglucanase de *Aspergillus niger* quando submetida a uma solução de etanol a 8 %.

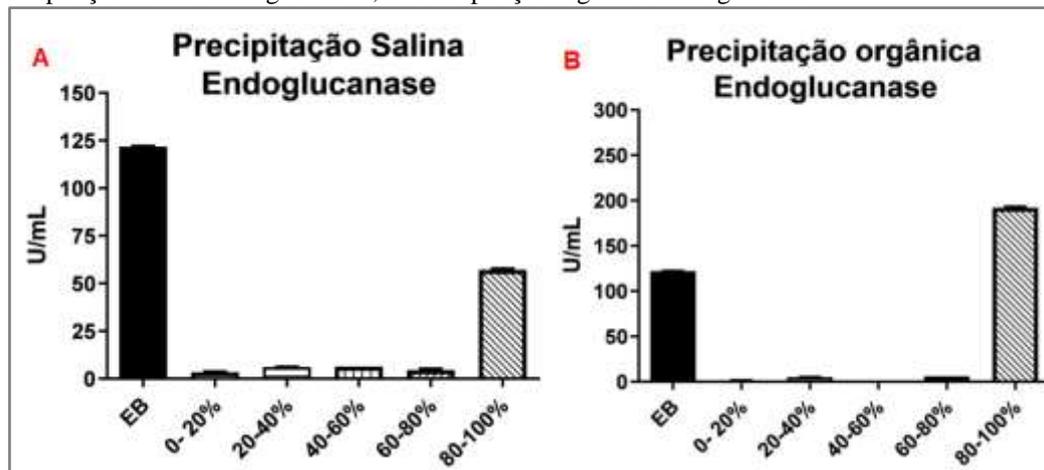
Essas respostas podem ser explicadas pela interação dos solventes com a estrutura da proteína, influenciando o ambiente ao redor da enzima e, conseqüentemente, afetando sua atividade. Além disso, solventes com propriedades iônicas podem afetar os estados de ionização dos aminoácidos na enzima, contribuindo para a alteração na atividade (ZHAO, 2016; SCHIFFER; DÖTSCH, 1996). Essas informações são valiosas para o entendimento das condições ideais de uso da endoglucanase em processos industriais, onde a presença de solventes orgânicos pode ser comum. A otimização dessas condições pode levar a um melhor desempenho da enzima em diversas aplicações biotecnológicas e industriais.

2.12.4 Técnicas de pré- purificação para proteínas: Precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e com solvente orgânico (etanol).

Os métodos de precipitação desempenham um papel crucial na preparação de amostras antes de serem submetidas a processos cromatográficos. Essas etapas têm como objetivo concentrar a amostra em uma fração mínima ou única, ao mesmo tempo em que eliminam parte dos contaminantes que podem estar presentes. É fundamental destacar a importância do controle cuidadoso dos parâmetros de agitação e temperatura, uma vez que esses fatores desempenham um papel fundamental na obtenção de resultados ideais durante o processo de recuperação (FRANÇA, 2013; WARNER, 2017).

A precipitação salina, utilizando o sal sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, é amplamente reconhecida como a metodologia principal para precipitar proteínas de soluções ou extratos brutos. Isso se deve ao fato de que o sal interage com as moléculas proteicas, afetando sua solubilidade em água de maneira controlada e seletiva.

Figura 23-Atividade para Endoglucanase das frações da precipitação salina e orgânica do extrato bruto obtido a partir da FES, com o fungo *P. djamor* PLO13. A atividade contida no controle foi atribuída como 100%. A-Precipitação salina- Endoglucanase; B- Precipitação orgânica- Endoglucanase



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A análise do gráfico da Figura 23 revelou que a concentração da endoglucanase permaneceu na faixa de 80-100% (Figura 29A), embora com uma perda de mais de 50 % de atividade em comparação com o extrato bruto, resultando em uma recuperação de 4,6 %. Além da baixa recuperação, ao ser submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS- PAGE, a precipitação salina não mostrou um perfil proteico satisfatório. Santos et al. (2023) mencionam que a precipitação salina com sulfato de amônio pode ser ineficaz para algumas proteínas e enzimas, podendo levar a modificações em sua estrutura tridimensional e à redução ou perda de atividade.

Diante da falta de sucesso do método anterior, o EBE foi submetido a uma nova metodologia de precipitação, desta vez utilizando etanol. A utilização de etanol como solvente orgânico em métodos de precipitação de proteínas pode ser eficaz, uma vez que o etanol possui baixa solubilidade em amostras proteicas e tende a aumentar as interações entre essas biomoléculas. Além disso, ele interage com a água, diminuindo a interação dessas moléculas com as proteínas presentes na solução (ALGHANIMI; ALEBADI; AL-ETHARI, 2020).

Novamente, observou-se que a enzima em estudo foi concentrada na faixa de 80-100% (Figura 29B), com alta atividade em comparação com o extrato bruto e uma recuperação de aproximadamente 194,18 %. Recuperações acima de 100 % são pouco descritas na literatura, e tais resultado, sugere-se que a metodologia empregada pode ter permitido a remoção de contaminantes e possíveis inibidores presentes no extrato bruto.

Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores, como os de Santos et al. (2023) que utilizaram o mesmo agente precipitante para precipitar a endoglucanase

de *P. sanguineus* e obtiveram uma recuperação de 126 %. Farinas e colaboradores (2011), também utilizaram etanol para precipitar endoglucanase e xilanase de *Aspergillus niger*, retendo a melhor atividade dessas enzimas na fração de 80%, com recuperações de 23 % e 40 %, respectivamente. Paulo et al. (2016) empregaram a precipitação com etanol para purificar parcialmente endoglucanases de fungos filamentosos, como *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*.

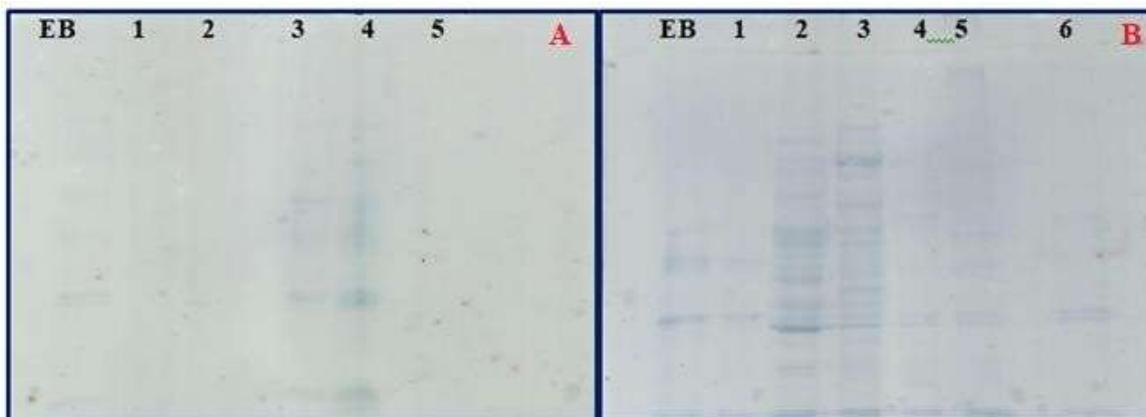
Outros solventes orgânicos também são amplamente utilizados no fracionamento de endoglucanases, como exemplificado pelos resultados descritos por Patel et al. (20210), que obtiveram uma endoglucanase bruta a partir do extrato bruto obtido pela FES com o fungo *Fomitopsis meliae* CFA 2, seguido de precipitação orgânica com acetona.

A precipitação com etanol é uma etapa comum de purificação para várias outras enzimas. Elgammal et al. (2020) utilizaram etanol para precipitar a protease termofílica alcalina extracelular de um fungo endofítico *Aspergillus ochraceus* BT21. Da mesma forma, uma serina protease de *Aspergillus fumigatus* também foi precipitada usando este solvente orgânico (DUNAEVSKY et al., 2020).

2.12.5 Perfil proteico do extrato e precipitações salina e orgânica

Por meio da análise do gel de eletroforese, foi possível examinar o perfil proteico do extrato bruto e das frações resultantes da precipitação salina (Figura 24A) e da precipitação orgânica (Figura 24B). Nota-se que o extrato bruto da FES do fungo *P. djamor* PLO13 é uma solução pouco concentrada, tornando-se desafiador visualizar suas proteínas. À medida que os processos de precipitação são realizados, essa solução se torna progressivamente mais concentrada, como pode ser visualizado nos geis A e B.

Figura 24- Eletroforese: SDS-PAGE (12%) das precipitações salinas e orgânica a do extrato bruto obtido a partir da FES, com o fungo *P. djamor* PLO13. A eletroforese foi processada avoltagem constante (90 mV), e as bandas foram coradas com Coomassie. Em A: Precipitação Salina (EB- Extrato bruto, 1- F20 %, 2- F40 %, 3- F60 %, 4- F80 % e 5- F100 %.) e em B: Precipitação Orgânica (EB- Extrato bruto, 1- F20 %, 2- F40 %, 3- F60 %, 4- F80 %, 5- F100 % e 6- F100 com PEG)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

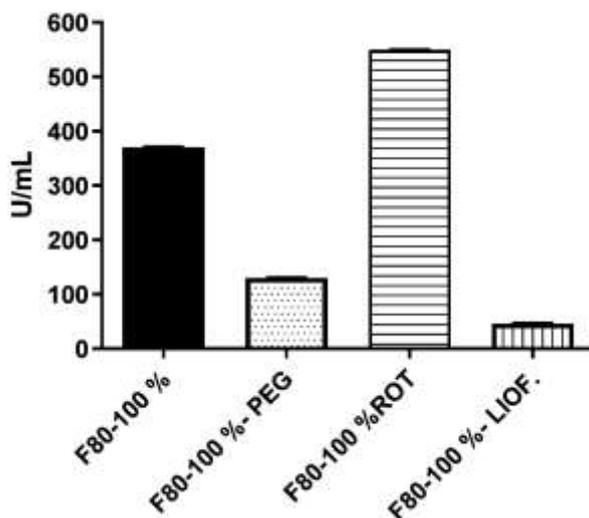
As duas metodologias de precipitação apresentaram características distintas em relação à concentração e à separação das proteínas presentes no extrato. No caso da precipitação salina (gel A), observa-se um número relativamente baixo de bandas proteicas originadas do extrato, e não se evidencia uma concentração eficaz da amostra. Isso caracteriza o método como insatisfatório para a amostra em estudo.

Por outro lado, na precipitação orgânica (gel B), foi possível detectar com maior precisão as bandas proteicas, bem como a sua separação. Ao longo desse processo, observou-se que as frações iniciais (20-40 % e 40-60 %), após serem concentradas, apresentaram um alto número de bandas. Nas duas frações subsequentes, já se percebeu uma mudança nesse perfil, com a detecção de que a enzima de interesse foi predominantemente concentrada na fração F80- 100%, tanto antes quanto após o processo de rotoevaporação (canaletas 5 e 6, respectivamente). Essa tendência também foi confirmada pelos dados quantitativos, que revelam uma alta atividade enzimática e excelente recuperação nessa fração. Esses resultados sugerem uma maior eficácia na aplicação do método de pré-purificação por precipitação orgânica.

2.12.6 Concentração da amostra (F100 %)

Com o objetivo de reduzir o volume da amostra (F80-100%) e concentrar sua atividade, empregaram-se três métodos distintos, cujos resultados estão apresentados na Figura 25.

Figura 25- Metodologia para concentração da atividade endoglucanásica da fração 100 % obtida na precipitação orgânica do extrato bruto obtido a partir da FES, com o fungo *P. djamor* PLO13. A atividade contida em F100% foi atribuída como 100 %. (F80-100% PEG- fração concentrada com polietilenoglicol, F80-100% ROT- fração rotoevaporada e F80-100% LIOF- fração liofilizada)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Inicialmente, a concentração da amostra foi realizada utilizando polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico que tem afinidade pela água presente na solução proteica. Este método resultou em uma recuperação de 42,5 % em comparação com a fração não concentrada.

Posteriormente, a fração em estudo foi submetida a um processo de rotoevaporação, visando a remoção do solvente orgânico presente na amostra, antes de passar pelo processo de liofilização e visando sua utilização na cromatografia líquida. Após a rotoevaporação, a amostra apresentou uma recuperação consideravelmente elevada, cerca de 194 %, em relação à fração inicial.

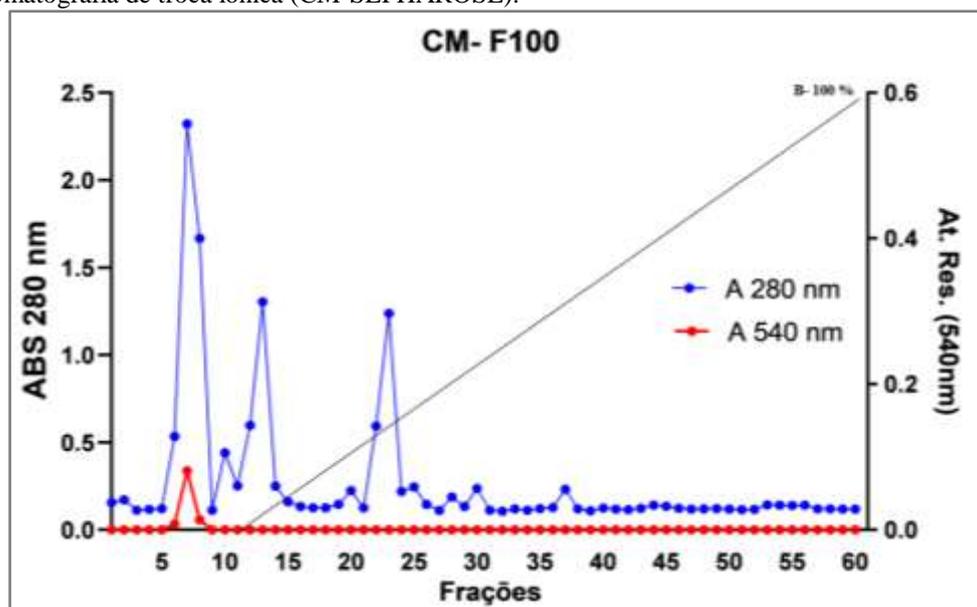
No entanto, após o processo de liofilização, observou-se uma drástica diminuição na atividade enzimática, com uma recuperação de apenas 8 %. Isso sugere que a liofilização não é um método eficaz para preservar a atividade da enzima em estudo. É plausível inferir que temperaturas muito baixas, associadas a elevadas pressões, que resultaram na diminuição do volume da amostra, podem ter interferido na estabilidade da enzima, afetando seu sítio ativo e, conseqüentemente, desestabilizando-a (SANTOS, 2020; BEZERRA, 2014; MEHRNOUSH et al., 2011).

2.12.7 Cromatografia líquida

2.12.7.1 Cromatografia de troca-iônica catiônica: CM-SEPHAROSE

Após a conclusão da etapa de precipitação com etanol e a análise do gel de eletroforese, com a fração 80-100%, que exibiu a maior atividade enzimática e uma recuperação excepcional (194,18 %), foi submetida à cromatografia de troca iônica (CM-SEPHAROSE). Durante o processo cromatográfico, foram coletadas aproximadamente 60 frações, com 12 mL em cada uma delas. A análise do gráfico apresentado na Figura 26 revela que a enzima foi eluída na fração 7. Essa fração também corresponde ao pico mais proeminente no perfil de proteínas detectado a 280 nm, e foi o único pico que exibiu atividade enzimática, conforme evidenciado pela análise a 540 nm, com uma taxa de recuperação de 36,54 %.

Figura 26- Perfil cromatográfico do isolamento da endoglucanase produzida pelo fungo *P. djamor* PLO13 em cromatografia de troca iônica (CM-SEPHAROSE).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Analisando o cromatograma apresentado na Figura 26, fica evidente que a endoglucanase foi eluída antes mesmo do início do gradiente de concentração de sal, sugerindo que não houve uma forte interação entre a resina e a endoglucanase do *P. djamor* PLO13. Essa observação nos leva a inferir que a enzima de interesse pode conter uma baixa quantidade de aminoácidos com cargas positivas.

É relevante destacar que na literatura estão descritos diversos métodos cromatográficos para isolar endoglucanases, incluindo cromatografia de gel filtração, troca iônica e afinidade. As duas primeiras são as mais comuns, e a escolha adequada

depende do perfil da amostra em estudo. Muitas vezes, a pureza necessária da enzima não pode ser obtida em um único passo de cromatografia. Portanto, é necessária uma série ou combinação de etapas de cromatografia (SANTOS et al., 2023; TAN et al., 2015).

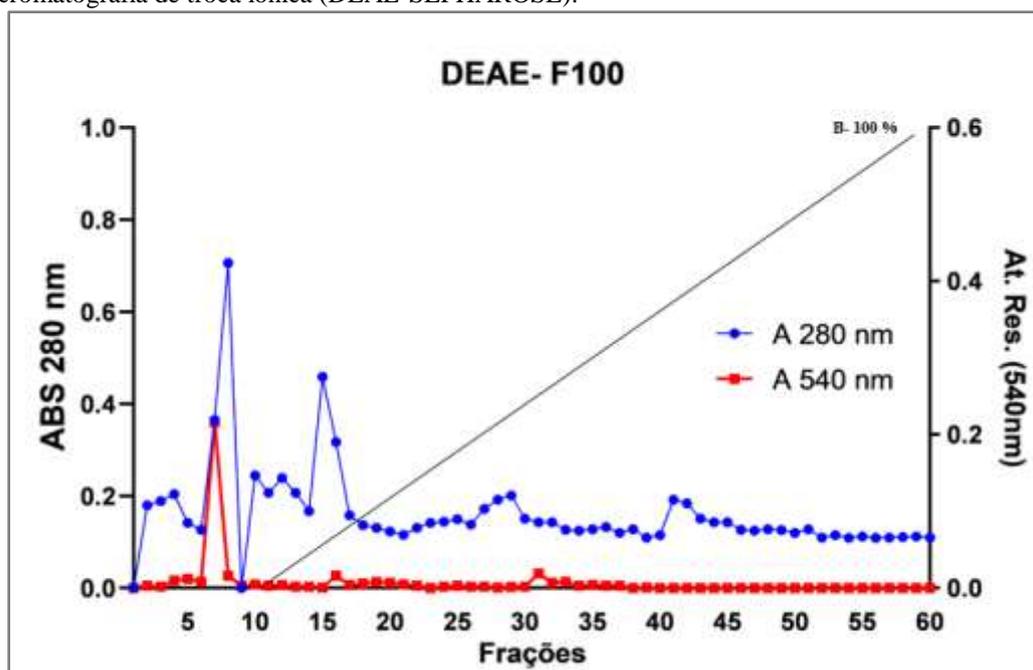
Outros estudos também relataram a purificação de endoglucanases utilizando cromatografia de troca catiônica. Por exemplo, Karnchanatat e colaboradores (2008) empregaram três colunas cromatográficas para obter a purificação total da endoglucanase de *D. eschscholzii*, começando com a coluna CM Sepharose, seguida pela coluna Phenyl Sepharose e, por último, a Sephacryl S-100.

Apesar da eficácia da cromatografia catiônica na purificação, enfrentamos um obstáculo na caracterização da endoglucanase purificada. Infelizmente, não conseguimos prosseguir com a etapa de caracterização devido à impossibilidade de visualizar as bandas proteicas no gel de poliacrilamida SDS-PAGE, mesmo após a mesma ser sido liofilizada e realizada a etapa com coloração com prata. Esse desafio tornou difícil a avaliação da pureza da amostra e a realização de análises adicionais.

2.12.7.2 *Cromatografia de troca-iônica aniônica: DEAE-SEPHAROSE*

Diante do insucesso da cromatografia de troca catiônica a fração 80-100 % foi submetida à cromatografia de troca iônica (DEAE-SEPHAROSE). Durante o processo foram coletadas aproximadamente 60 frações, com 12 mL em cada uma delas. Através da análise do gráfico apresentado na Figura 27 pode-se observar que a enzima foi eluída na fração 7, semelhante ao observado na coluna CM-SEPHAROSE e coincidentemente essa fração também corresponde ao pico mais representativo no perfil de proteínas detectado a 280 nm, e foi a única fração que exibiu atividade enzimática conforme evidenciado pela análise a 540 nm, com uma taxa de recuperação de 110 %. A endoglucanase purificada apresentou valor de atividade específica de 2.481383 U/mg (Tabela 9).

Figura 27-Perfil cromatográfico do isolamento da endoglucanase produzida pelo fungo *P. djamor* PLO13 em cromatografia de troca iônica (DEAE-SEPHAROSE).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Semelhante ao que foi observado na cromatografia catiônica, no processo de cromatografia de troca aniônica (Figura 27), a endoglucanase foi eluída antes mesmo do início do gradiente de concentração de sal, indicando que a interação entre a resina e a endoglucanase do *P. djamor* PLO13 não foi significativa. Essa observação nos leva a inferir que a enzima de interesse pode conter uma baixa quantidade de aminoácidos com cargas negativas. No entanto, é importante destacar que a maioria das proteínas presentes na fração obtida da precipitação orgânica foi adsorvida pela resina DEAE-Sepharose, pois sua eluição ocorreu à medida que o gradiente salino aumentava, confirmando a presença de proteínas com diferentes cargas.

Vale ressaltar que, mesmo sem a adsorção da endoglucanase na fase estacionária da coluna (DEAE-Sepharose), esse processo de cromatografia demonstrou alta eficiência na purificação da endoglucanase do fungo *P. djamor* PLO13, uma vez que a enzima foi totalmente isolada após essa etapa. Isso é particularmente relevante, pois o isolamento de enzimas com apenas um passo cromatográfico permite aumentar a taxa de recuperação e reduzir significativamente os custos do processo.

A resina DEAE-Sepharose possui grupos dietilaminoetil ligados a polímeros de sepharose, o que lhe confere ampla estabilidade nas condições experimentais, como fluxo de eluição, pH e concentração salina (SIGMA-ALDRICH, 2016). Além de suas propriedades operacionais, essas resinas cromatográficas são altamente úteis na

purificação de endoglucanases de fungos, como demonstrado por Santos et al. (2023) ao purificar a endoglucanase do fungo *P. sanguineo* usando DEAE-Sepharose como método cromatográfico. Chaudhary e Grover (2023) utilizaram a fração enzimática obtida da precipitação com sulfato de amônio (30-60%), seguida de diálise e, posteriormente, cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-celulose para purificar a endoglucanase de *Trichoderma viride*. A endoglucanase de *Aspergillus aculeatus* também foi purificada com sucesso por meio da cromatografia de troca iônica (Nargotra et al., 2022). Rawat et al. (2015) empregaram a cromatografia de troca iônica, seguida da cromatografia de gel-filtração, para purificar a endoglucanase de *Aspergillus niger*.

Além disso, a cromatografia de troca iônica também é amplamente utilizada para a purificação de outras enzimas, como exemplificado por Soraj e Narashimhulu (2022), que utilizaram DEAE-Sepharose para purificar carboximetilcelulase e β -glucosidase termoestáveis de *Aspergillus fumigatus*.

O resumo da purificação referente à endoglucanase de *Pleurotus djamor* PLO13, pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9- Resumo da purificação da endoglucanase de *Pleurotus djamor* PLO13

Etapas de Purificação	At. Total U/mL	Proteína Total mg/mL	At. Específica U/mg	Recuperação
Extrato bruto	1.436	0.2302	6.239697	100%
F 80-100 %	0.781	0.6341	1.231387	194,18 %.
DEAE	0.128	0.0517	2.481383	110%

Abreviaturas: F 80-100 %- Fração da precipitação orgânica com etanol; DEAE- cromatografia de troca aniônica.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

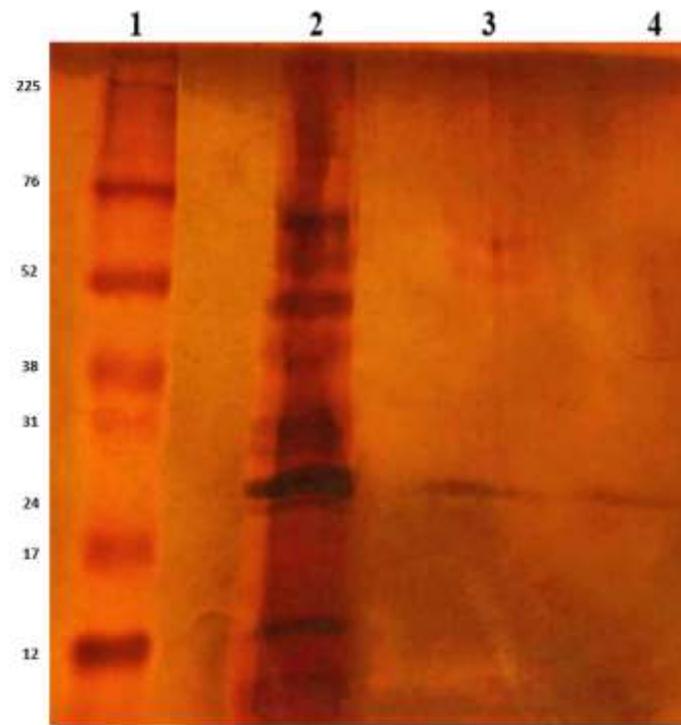
2.12.8 Eletroforese SDS-PAGE

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da fração obtida após a cromatografia de troca aniônica DEAE-SEPHAROSE (F7) sob condições desnaturantes e redutoras revelou um perfil proteico singular, onde apenas uma única banda proteica foi discernida. A massa molecular estimada dessa proteína foi de aproximadamente 26 kDa, conforme demonstrado na Figura 28, canaleta 4. Comparativamente, na literatura científica, massas moleculares de endoglucanases de fungos variam na faixa de 25 a 70 kDa (NARRA et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2013).

Ao examinar o gel mais detalhadamente, observa-se que o extrato bruto (canaleta 2) exibe um perfil proteico complexo, evidenciado pela presença de múltiplas bandas escuras. Essa complexidade proteica é consideravelmente reduzida na fração F80-100%, que se originou da etapa de precipitação orgânica, apresentando um número

consideravelmente menor de bandas proteicas. Esses resultados validam a eficácia do método de precipitação empregado para remover os contaminantes proteicos da amostra, demonstrando com êxito a capacidade de concentrar e isolar a endoglucanase em um único passo cromatográfico.

Figura 28- Análise do perfil de proteínas em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata: Perfil de proteínas em gel de poliacrilamida. Canaleta 1: Marcador de massa molecular, canaleta 2: extrato bruto, canaleta 3: fração 80 100% do fracionamento etanólico, canaleta 4: Endoglucanase pura.



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Embora seja amplamente reconhecido que a determinação precisa da massa molecular de proteínas requer o uso de espectrômetros de massa, os géis de eletroforese desempenham um papel valioso ao proporcionar uma estimativa confiável da massa molecular. Essa técnica é frequentemente empregada em análises de purificação de proteínas e enzimas devido à sua eficácia e acessibilidade (SANTOS et al., 2023).

Por exemplo, a endoglucanase encontrada no extrato bruto produzido pela cepa *Fomitopsis meliae* CFA 2 foi submetida à purificação, resultando em uma única banda proteica com um peso molecular estimado de 37,87 kDa, conforme documentado por Patel e Shah (2021).

Da mesma forma, uma endoglucanase pertencente à família *Tricholoma matsutake* foi purificada com sucesso por meio de cromatografia de gel filtração, revelando uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa, como evidenciado no

estudo de Onuma et al. (2019).

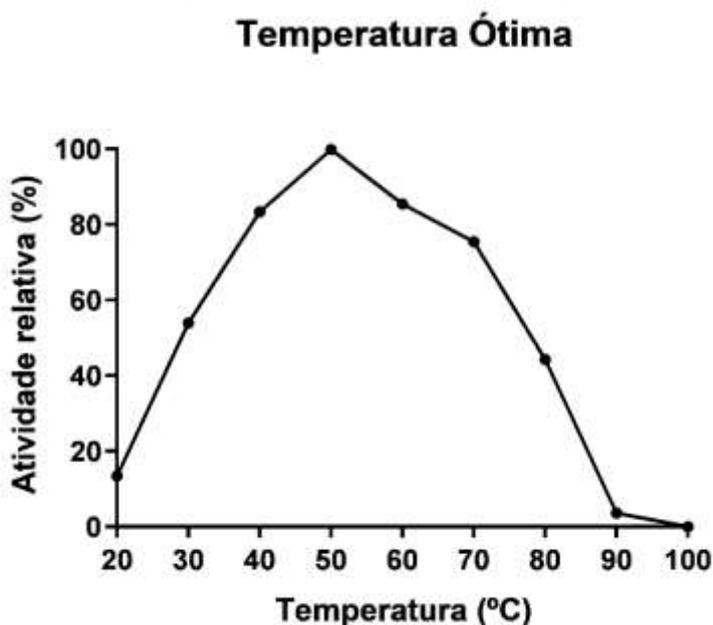
Outros exemplos incluem as endoglucanases isoladas dos fungos *P. sanguineus* e *Botrytis ricini* URM 5627, cujas massas moleculares foram estimadas em 76 kDa e 39 kDa, respectivamente, como indicado nos estudos de Santos et al. (2023) e Silva et al. (2021). Embora as massas moleculares determinadas por géis de eletroforese sejam aproximações, essas informações são fundamentais para a caracterização e purificação de proteínas, desempenhando um papel crucial em pesquisas biotecnológicas e científicas.

2.12.9 Caracterização bioquímica da endoglucanase pura

2.12.9.1 Temperatura ótima e termoestabilidade

O efeito da temperatura foi avaliado na faixa de 20-100 °C, conforme evidenciado na Figura 29. Observou-se um aumento na atividade relativa da endoglucanase de *P. djamor* PLO13 à medida que a temperatura de reação aumenta, culminando na sua atividade ótima a 50 °C, onde alcança seu ápice, atingindo 100 % de eficiência. É importante destacar que a enzima purificada retém cerca de 85 % de sua atividade máxima nas temperaturas de 40 e 60 °C, mantendo aproximadamente 75 % de sua atividade a 70 °C e ainda mantém cerca de 40 % de atividade a 80 °C. Somente a partir de 80 °C, sua atividade é inativada, demonstrando, assim, seu potencial para aplicações industriais.

Figura 29- Temperatura ótima: Endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0) em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 50°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

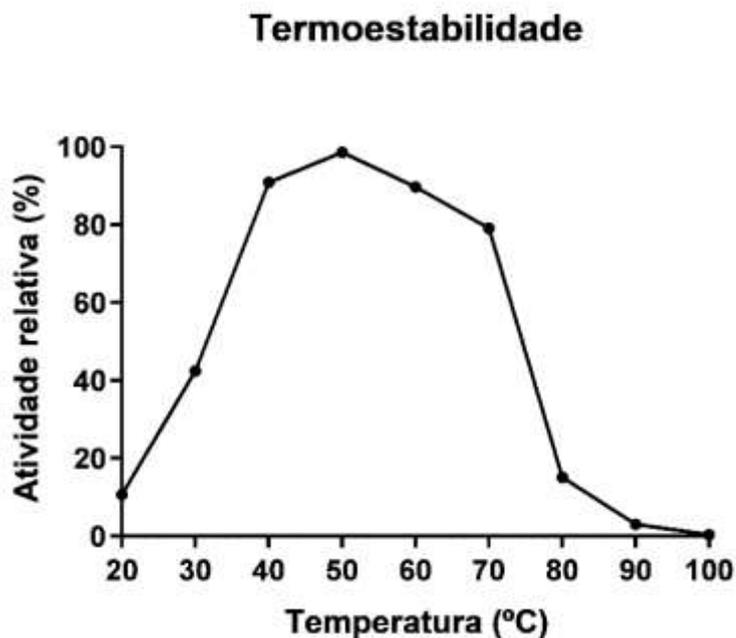
De maneira geral, as endoglucanases são enzimas que apresentam temperaturas ótimas consideradas elevadas, geralmente variando entre 50 a 70°C, com exceção das provenientes de microrganismos extremófilos, que podem alcançar temperaturas ótimas de até 80 °C, como mencionado por Santos et al. (2023).

Os dados desta análise corroboram com os achados de Narra et al. (2014), que determinaram que a endoglucanase de *Aspergillus terreus* apresenta uma temperatura ótima de 50 °C. Além disso, Hmad e colaboradores (2017) também destacaram o efeito da temperatura sobre a atividade da endoglucanase de *Stachybotrys microspora*, com temperatura ótima a 50 °C. Por outro lado, as endoglucanases de *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 e *Aspergillus flavus* demonstraram uma temperatura ótima de 40 °C (ASHA; DIVYA; SINGH, 2016; AIN et al., 2022), endoglucanase de *Fomitopsis meliae* CFA 2 apresentou temperatura ótima de 70 °C (PATEL; SHAH, 2021), ilustrando a diversidade de temperaturas ótimas encontradas nas endoglucanases de diferentes microrganismos.

A estabilidade térmica é uma característica bioquímica de extrema importância em enzimas de interesse biotecnológico, uma vez que a maioria dos processos industriais ocorre em uma ampla faixa de temperaturas. Enzimas com boa estabilidade térmica são capazes de manter sua atividade em condições variáveis de temperatura.

No caso da endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13, a termoestabilidade foi avaliada mediante incubação na faixa de 20-100 °C por 1 hora, e os resultados são apresentados na Figura 30. De maneira geral, a enzima manteve aproximadamente 90 % de sua atividade relativa na faixa de 40 a 60 °C, preservando cerca de 80 % de sua atividade a 70 °C. Isso demonstra sua estabilidade térmica. No entanto, observou-se que a partir de 80 °C, a atividade catalítica da endoglucanase foi completamente inativada. Isso sugere que temperaturas muito elevadas podem alterar a estrutura tridimensional da enzima, afetando suas ligações covalentes e, conseqüentemente, levando à perda de atividade enzimática.

Figura 30- Perfil de termoestabilidade da endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Os resultados obtidos corroboram com os estudos descritos na literatura, a exemplo da alta termoestabilidade observada na endoglucanase de *Fomitopsis meliae* CFA 2, que se manteve estável na faixa de 50 a 70 °C, conforme relatado por Patel e Shah (2021). Além disso, a endoglucanase de *Aspergillus terreus* demonstrou estabilidade por 30 minutos a temperaturas de 30, 40 e 50 °C, mantendo 100 % de atividade, mas foi inativada a 70 °C, com 10 % de atividade remanescente após 30 minutos de incubação, como descrito por Narra et al. (2014). Santos e colaboradores (2023) purificaram uma endoglucanase de *P. sanguineus* que manteve sua estabilidade entre 20 e 55 °C. Por outro lado, Silva et al. (2018) relataram que a endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 foi estável na faixa de 39 a 60°C.

É fundamental ressaltar que a termoestabilidade é uma propriedade de grande relevância e desejável em proteínas, oferecendo vantagens econômicas substanciais, bem como aplicações terapêuticas e industriais significativas (Kumar, Awasthi e Singh, 2011; Sterner e Liebl, 2001).

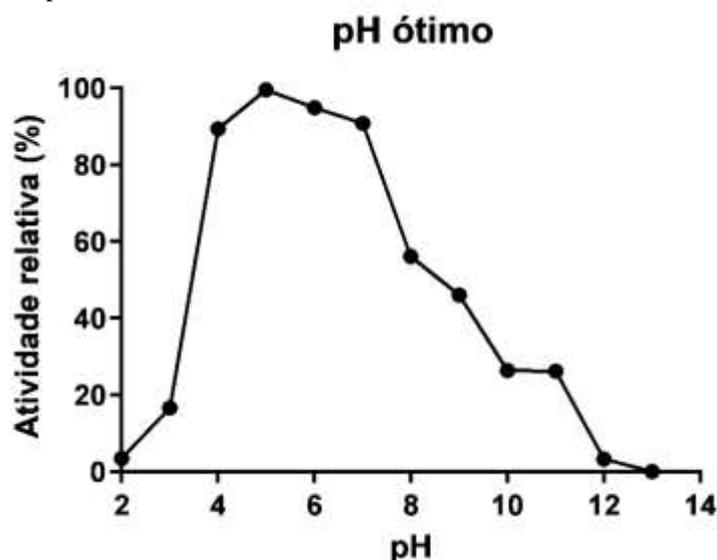
O uso de endoglucanases termoestáveis é altamente benéfico em diversas indústrias, incluindo têxteis (para biopolimento de tecidos e bioestonagem de jeans), processamento de celulose, destintagem de papel, detergentes (para clareamento e

amacramento de cores), produção de bebidas (purificação de cerveja e sucos de frutas), alimentos de panificação (melhoramento do valor nutricional), agricultura, pré-processamento de resíduos industriais e produção de biocombustíveis. As vantagens comerciais potenciais de celulasas termoestáveis eficientes e econômicas, com baixa inibição, podem reduzir consideravelmente os custos de produção de bioetanol a partir de materiais celulósicos em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (Akram et al., 2018; Haq et al., 2015; Liu et al., 2011).

2.12.9.2 pH ótimo e estabilidade ao pH

O efeito do pH foi investigado na faixa de 2 a 13, como representado na Figura 31. Ficou evidente que a máxima atividade relativa da endoglucanase de *P. djamor* PLO13 foi alcançada em pH 5, destacando-se como o ponto ótimo de funcionamento. No entanto, é fundamental ressaltar que a enzima exibiu estabilidade em uma ampla faixa de pH, mantendo cerca de 95 % de sua atividade catalítica em pHs variando de 4,0 a 7,0. Mesmo em pH 8,0, a endoglucanase preservou aproximadamente 55 % de sua atividade. À medida que o pH se tornou mais alcalino, a atividade enzimática foi reduzida progressivamente. Nos pHs 9,0 e 10,0, a enzima ainda manteve uma atividade em torno de 45 % e 30 %, respectivamente, antes de ser completamente inativada em pH 12,0.

Figura 31- pH ótimo: Atividade de endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo, em diferentes pHs (a atividade mais alta obtida em pH 5 foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata



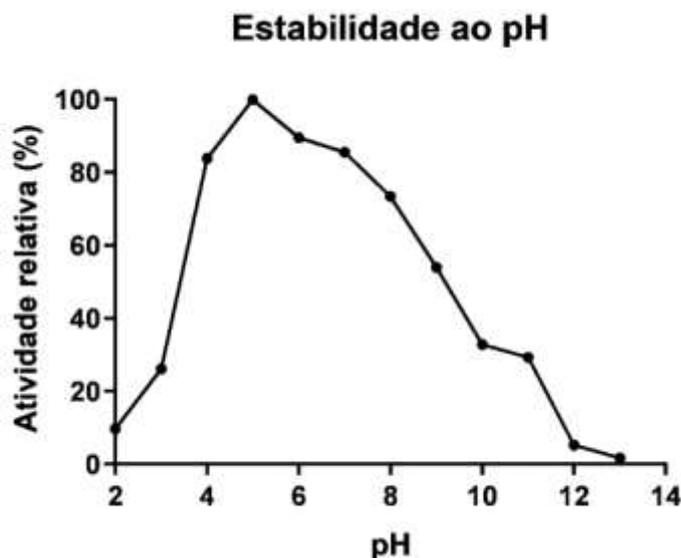
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Vale ressaltar que tanto a endoglucanase de *Botrytis ricini* URM quanto a de

Aspergillus niger apresentaram seus pH ótimos em 5,0, conforme relatado nos estudos de Liang, Xue et al. (2018) e Santos et al. (2018), respectivamente. Por outro lado, Patel e Shah (2021) descreveram que o pH ótimo para a atividade da endoglucanase isolada de *Fomitopsis meliae* CFA 2 foi de 4,8. Pode-se inferir que diversas endoglucanases fúngicas exibem suas maiores atividades enzimáticas em pHs situados entre 4 e 5 (DING et al.2006).

A avaliação da estabilidade ao pH foi conduzida em uma ampla faixa de pH, abrangendo de 2 a 13, durante um período de 1 hora (Figura 32). Os resultados revelaram que a endoglucanase manteve sua estabilidade ao longo dos pHs 3,0 a 11,0. Em detalhes, nos pHs 4 e 7, a enzima pura preservou cerca de 85 % de sua atividade. Nos pHs 8,0 e 9,0, a atividade ainda permaneceu significativa, mantendo-se em torno de 75 % e 55 %, respectivamente. Entretanto, nos pHs 4,0, 10,0 e 11,0, o percentual de atividade reduziu para aproximadamente 30%, e a inativação ocorreu em pHs acima de 12,0.

Figura 32- Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

É relevante observar que Patel e Shah (2021) relataram que a endoglucanase isolada de *Fomitopsis meliae* CFA 2 demonstrou estabilidade em pHs 4,0 e 5,0. Além disso, a endoglucanase isolada de *P. sanguineus* manteve mais de 50 % de sua atividade enzimática na faixa de pH 5,0 a 8,0. Dhar et al. (2015) isolaram uma endoglucanase de *Paenibacillus sp.* e enfatizaram sua estabilidade alcalina, destacando-a como uma candidata promissora para uso em detergentes, com a enzima mantendo mais de 60 % de sua atividade entre pH 6,0 e 9,0.

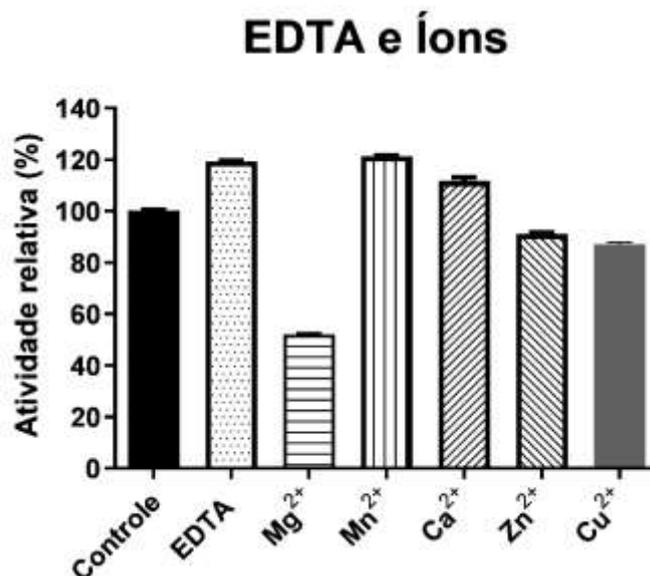
É importante descrever que as endoglucanases que exibem estabilidade em pH 8,0 podem ser categorizadas como endoglucanases neutras e ligeiramente alcalinas, e são amplamente empregadas nas indústrias de detergentes e têxteis, conforme mencionado por Dhar et al. (2015). A endoglucanase isolada neste estudo demonstrou manter 55 % de sua atividade em pH 8,0, conforme ilustrado na Figura 40, o que a torna uma candidata para aplicação nas indústrias de detergentes e têxteis.

2.12.9.3 Efeito da adição de sais

O efeito do EDTA e de diferentes íons metálicos na atividade da endoglucanase pode ser visualizado na Figura 33. Da mesma forma que ocorreu com a atividade endoglucanásica do extrato bruto, o EDTA ativou a atividade da endoglucanase pura em aproximadamente 20 %. Como mencionado anteriormente, o EDTA, sendo um agente quelante, provavelmente se ligou a íons metálicos, estabilizando a enzima e criando um ambiente mais propício para sua atividade enzimática. É importante salientar que o EDTA também é um aditivo em sabões e detergentes (WOLF; GILBERT, 1992).

É crucial destacar que, devido às características individuais de cada enzima, o EDTA pode afetar sua atividade de maneira positiva ou negativa. Em um estudo conduzido por Pham, Quyen e Nghiem (2012), foi observado um aumento de 35 % na atividade da endoglucanase purificada de *Aspergillus niger* VTCC-F021 na presença de EDTA. Da mesma forma, a atividade da endoglucanase de *Aspergillus aculeatus* aumentou na presença de EDTA (NAIKA; TIKU, 2011). Por outro lado, Marques e colaboradores (2018) demonstraram que o EDTA inibiu a atividade das endoglucanases presentes no extrato bruto obtido a partir da FES de resíduos de casca de arroz com o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

Figura 33- Atividade da endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo frente a diferentes sais metálicos (a atividade obtida utilizando a enzima sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivo: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Entre os íons metálicos analisados, o Mn²⁺ teve a maior influência sobre a atividade da endoglucanase pura, com um aumento de cerca de 20 %, seguido do Ca²⁺, que promoveu uma ativação de aproximadamente 15 %. Por outro lado, na presença de íons de Mg²⁺, observou-se uma inibição da atividade enzimática em torno de 40 %. Zn²⁺ e Cu²⁺ não interferiram na atividade da enzima pura. Silva e colaboradores (2018) também relataram que a endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 foi inibida por Mg²⁺, enquanto o Mn²⁺ ativou sua atividade.

Esses resultados destacam a complexidade das interações entre enzimas e íons metálicos, mostrando como a presença de diferentes íons pode afetar de maneira distinta a atividade das enzimas, dependendo de suas características específicas e do ambiente em que estão inseridas.

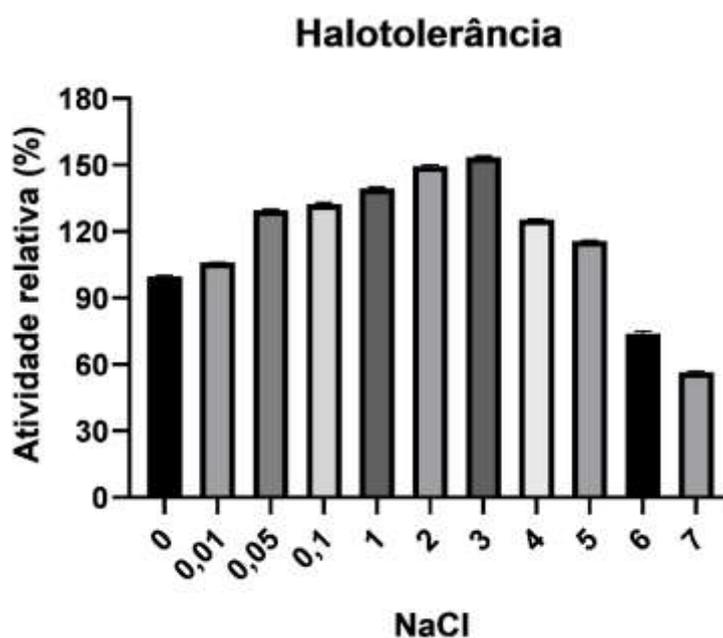
2.12.9.4 Halotolerância

A atividade da endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 foi investigada em diversas concentrações de NaCl (variando de 0,01 a 7 M). Em comparação com um controle nas condições padrão, observamos que a enzima manteve sua estabilidade em todas as concentrações de sal testadas. De modo que notamos um aumento na atividade enzimática à medida que a concentração de sal aumentava, conforme evidenciado na Figura 34.

A endoglucanase estudada alcançou seu pico de atividade em 3 M de NaCl,

apresentando um aumento de aproximadamente 60 % em relação ao controle das condições padrão. Somente na concentração de 6 M observou-se uma perda de aproximadamente 25 % de sua atividade. Com base nesses resultados, podemos classificar a enzima como halofílica, uma vez que exibiu um aumento na atividade enzimática quando comparada às condições padrão. Santos et al. (2023) também descreveram a endoglucanase de *P. sanguineus* como halotolerante e halofílica até 5 M de NaCl, corroborando nossos achados. Resultados semelhantes foram descritos por Santos e colaboradores (2018) ao descreverem a halotolerância da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627, que suportou 4 M de NaCl sem perda significativa de atividade enzimática.

Figura 34- Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da da endoglucanase pura de *P. djamor* PLO13 em FES cultivado em farelo de trigo. A atividade da CMCase foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima purificada sem NaCl foi tomada como 100% - controle).



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

As enzimas que apresentam aumento na atividade em elevadas concentrações salinas são denominadas como halofílicas. Normalmente, essas enzimas resistentes a grandes quantidades de sal são encontradas principalmente em microrganismos halofílicos, principalmente bactérias, embora também sejam observadas em fungos, ainda que de forma menos comum (GUNDE-CIMERMAN, et al., 2000; GUNDE-CIMERMAN, et al., 2014).

A capacidade de endoglucanases de manterem sua estabilidade em altas

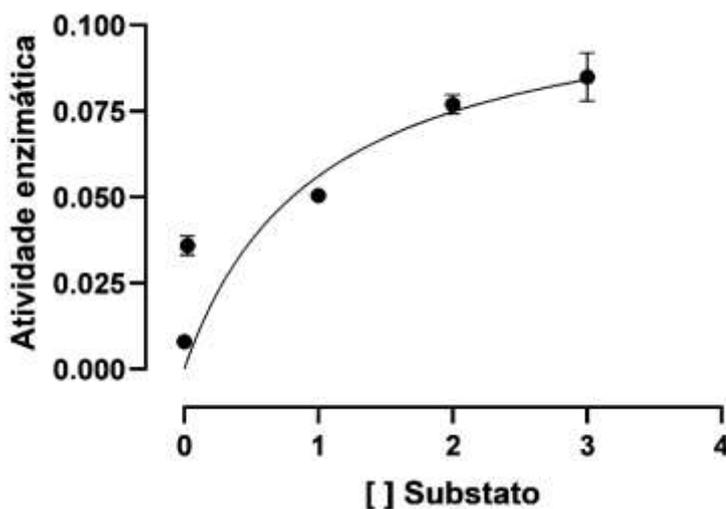
concentrações de sal, conhecida como halotolerância, é uma característica de extrema importância e amplamente utilizada em diversos processos industriais (SANTOS et al., 2023). É crucial ressaltar que a concentração máxima de sal suportada por essas enzimas varia de acordo com suas características intrínsecas.

É evidente a relevância de investigar essa característica, pois seu potencial biotecnológico se destaca, conferindo uma vantagem competitiva em relação a outras endoglucanases. Isso representa uma nova propriedade dentro dessa classe de enzimas (LIANG et al., 2011; XU, et al., 2014).

2.12.9.5 Determinação das constantes cinéticas

É importante destacar que o valor de K_m representa a quantidade de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima inicial da enzima, sendo também uma medida da afinidade aparente da enzima pelo seu substrato. A atividade da endoglucanase do *P. djamor* PLO13 foi influenciada pela concentração de substrato, o que resultou em um baixo valor de K_m . Ao analisar um gráfico de Lineweaver-Burk para essa atividade, determinou-se que o valor de K_m da enzima para a endoglucanase pura foi de $0,0997 \pm 0,0063$ mg/ml. O V_{max} desta enzima foi de $0,1122 \pm 0,00109$ mol/min/mL (Figura 35). Um K_m menor para a carboximetilcelulose indica uma afinidade mais forte da endoglucanase por esse substrato.

Figura 35-Análise da curva de Michaelis-Menten da endoglucanase isolada do *P. Djamor* PLO13



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Comparando com outros valores de K_m relatados na literatura, podemos observar que foram encontrados valores de $3,18 \pm 0,100$ mg/mL para a endoglucanase de *P.*

sanguineus (SANTOS et al., 2023) e $0,1299 \pm 0,0096$ mg/ml para a endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 (SILVA et al., 2018). Bettache e colaboradores (2020) relataram que o valor de Km da endoglucanase de *Streptomyces sp* para a carboximetilcelulose foi de 6,37 mg/mL, enquanto o Vmax dessa enzima foi de 0,056 $\mu\text{mol mn}^{-1}$. Essas comparações destacam a eficiência da endoglucanase isolada do *P. djamor* PLO13, com um Km significativamente menor, indicando sua forte afinidade pelo substrato, o que a torna uma enzima promissora para aplicações industriais e biotecnológica.

CAPITULO 03

Elastase 2 símile

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e preparo do resíduo agroindustrial: Farelo de trigo

O resíduo agroindustrial, farelo de trigo, utilizado nessa pesquisa foi obtido de uma empresa localizada em Maceió/ AL, Brasil. Inicialmente, procedeu-se à secagem do material em uma estufa com circulação de ar da marca TECNAL a uma temperatura de 50°C, durante um período de 24 horas. Em seguida, o resíduo foi submetido a uma trituração em um moinho de lâminas do tipo Wiley da marca ACB LABOR®, até que alcançasse um tamanho de partícula de 2,0 mm. Posteriormente, foi armazenado em recipientes plásticos para uso futuro. O farelo de trigo foi analisado quanto ao teor de proteína bruta, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, celulose e hemicelulose, utilizando o protocolo da Association of Official Analytical Chemists.

3.2 Preparo do inóculo

A linhagem *Pleurotus djamor* PLO13 foi originalmente adquirida da Micoteca da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada em Minas Gerais, Brasil. O cultivo do fungo seguiu o protocolo conforme descrito por Velez et al. (2019), com algumas modificações, 20 mL de ágar batata dextrose (PDA) foi mantida a uma temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Para o estabelecimento de culturas, um fragmento de micélio foi transferido para uma placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA. Essa placa foi então incubada em uma estufa bacteriológica (modelo SL 222, Solab) a uma temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por um período de 10 dias. Posteriormente, as culturas foram armazenadas em refrigeração a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, como ilustrado na Figura 36.

Figura 36- Aspectos das colônias de *P. djamor* PLO 13 crescidas em cultura no interior de placa de Petri em meio BDA.



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

Para o processo de FES utilizou-se a metodologia proposta por Patel e Shah (2021), com adaptações. Para tanto, após o crescimento micelial, quatro discos de ágar (1,0 cm de diâmetro) do micélio *P. djamor* PLO13, foram inoculados em cada um dos 3,0 erlenmeyers de 100 mL, contendo 5 g de resíduo (FT) umedecidos com água destilada estéril até atingir umidade desejada, previamente submetida à esterilização em autoclave vertical a 121 °C por 20 min. Os erlenmeyers foram mantidos em câmara de germinação (SL 222, Solab) com temperatura controlada de 27 °C por 10 dias. Todo o processo de inoculação do disco de micélio no resíduo foi realizado em capela de fluxo laminar.

3.4 Extração enzimática

Após a fase de fermentação, procedeu-se à adição de 5 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5) a cada 1,0 g de resíduo. Essa mistura foi deixada em contato com o resíduo macerado por 10 minutos a 25°C. Em seguida, o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi submetido a um processo de filtração e centrifugação a 9000 xg, durante 15 minutos, a 25°C, resultando na separação do sobrenadante e do precipitado. O sobrenadante, obtido após a centrifugação e filtração, foi denominado de extrato bruto, enquanto o precipitado foi descartado.

3.5 Ensaios realizados com a protease coagulante

3.5.1 Atividade Proteolítica (caseinolítica)

Para determinar a atividade caseinolítica no extrato, um ensaio foi conduzido utilizando o substrato azocaseína (Sigma–Aldrich, EUA) a uma concentração de 0,6%, seguindo o método descrito por Azeez, Sane, Bhatnagar e Nath (2007), com adaptações. Neste ensaio, 8 µL de extrato bruto (EB) contendo uma concentração de 1,875 mg/mL de proteína foram adicionados a 392 µL de solução de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, contendo 0,6 % (p/v) de azocaseína e 100 µL de Triton X-100 a 0,1 % (v/v). A mistura resultante foi incubada a 37 °C por 60 minutos. A reação foi então interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (p/v), seguida de uma nova incubação por 30 minutos a 4 °C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 9.000 xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado e sua absorbância medida a 366 nm. Essas reações foram realizadas em triplicata. Para a condição de controle, o TCA foi adicionado no início da reação para inibir a atividade da enzima.

3.5.2 Avaliação da atividade proteolítica para elastase 2 símile, quimiotripsina e tripsina

As atividades da elastase 2, quimiotripsina e tripsina foram determinadas pela hidrólise dos substrato N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida (elastase), N-succinil-ala-ala-pro-Phe-p-nitroanilida (quimiotripsina) e Benzoil-arginina-paranitroanilida (tripsina). Nos ensaios enzimáticos, os substratos foram utilizados na concentração de 50 M em tampão Tris- HCl (50 mmol. Lµ⁻¹, pH 8,0) e 20 µL de extrato bruto enzimático (EBE). Após incubação a 37 °C por 1 h, o produto cromogênico da reação foi quantificado a 410 nm. Para o branco da reação, não houve adição do EBE, e todos os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se a seguinte equação (1):

$$AE (Um L^{-1}) = \frac{(A - A0) \times V_f (mL) \times 1000}{8800 \times T (min) \times 0,2}$$

Onde EA = atividade enzimática; A e A0 = valores de absorbância obtidos a 410 nm para as amostras e para as amostras em branco, respectivamente; Vf = volume final; T = tempo; e 8800 (M⁻¹⁰ cm⁻¹) é o coeficiente de extinção do p-nitroanilide.

3.5.3 Inibição da protease presente no extrato

Foi investigado o impacto dos inibidores de protease, a saber: PMSF, β-mercaptoetanol, benzamidina (1 mmol/L) e EDTA (5 mmol/L), sobre a atividade

enzimática. Esses inibidores foram adicionados antes da introdução do substrato e submetidos a uma pré-incubação de 30 minutos antes da realização do ensaio enzimático, conforme descrito na seção 2.5.2. A atividade enzimática na ausência de qualquer inibidor foi considerada como 100%.

3.5.4 Zimografia com caseína e gelatina

A hidrólise da caseína e da gelatina foi analisada por meio de eletroforese sob condições nativas, conforme o método de Laemmli (1970). Para preparar o gel de poliacrilamida, utilizou-se uma concentração de 8% de poliacrilamida, e no gel inferior, a água foi substituída por uma solução de 4% de caseína e 2% de gelatina, respectivamente. Foi aplicada uma mistura contendo 40 μ L de EBE e 10 μ L de tampão de amostra Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8), SDS (2%), glicerol (10%), 2-mercaptoetanol (5%) e azul de bromofenol (0,001%). As eletroforeses foram conduzidas a uma voltagem constante de 120 mV, e ao final da corrida, o gel foi lavado duas vezes em tampão Tris-HCl (50 M, pH 8,0) contendo Triton X-100 (2,5%), por 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8) a uma temperatura de 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, o gel foi corado com uma solução de Comassie Blue G-250 a 4% e, posteriormente, submetido a um banho em uma solução descorante composta por 10% de ácido acético, 40% de metanol e 50% de água.

3.5.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi quantificada seguindo o método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Para isso, 10 μ L das amostras foram misturados com 190 μ L do reagente de Bradford. Após uma incubação de 5 minutos, a absorbância foi medida a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL de proteína.

3.6 Aplicação enzimática da protease na coagulação do leite e estudo das condições de coagulação

3.6.1 Ensaio de coagulação e de atividade de coagulação

Os ensaios de coagulação foram conduzidos utilizando leite desnatado reconstituído (LDR), conforme o procedimento descrito por Cavalcanti et al. (2004). Todos os ensaios foram executados em triplicata para garantir resultados consistentes. No controle, o EBE foi substituído por tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0).

A atividade coagulante do leite foi quantificada com base na quantidade de enzima necessária para coagular 10 mL de leite em um período de 40 minutos sob condições de teste. Essa atividade foi calculada utilizando a seguinte fórmula: ACM (Unidades por mL) = $[(2400 \times V) / t] \times v$, onde "V" representa o volume de leite em mL, "t" é o tempo de coagulação em segundos e "v" é o volume de EBE utilizado por mL.

Essa avaliação da atividade coagulante é fundamental para compreender a capacidade da enzima em coagular o leite, o que é relevante em várias aplicações industriais, como na produção de queijos e laticínios.

3.6.2 Análise da concentração proteica utilizada na coagulação

Com o objetivo de determinar a concentração mínima de proteína no extrato bruto enzimático (EBE) necessária para coagular o leite, uma curva de concentração proteica foi elaborada, abrangendo seis concentrações distintas (60; 30; 15; 7,5; 3,75; e 1,875 mg mL⁻¹). Para isso, uma série de diluições seriadas do EBE foi preparada em tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0). Subsequentemente, ensaios de coagulação foram conduzidos para cada uma das diluições, utilizando 10 µL de cada diluição e 500 µL de leite desnatado reconstituído (LDR) (conforme a seção 3.6.1). A incubação ocorreu por 120 minutos a uma temperatura de 37 °C. Todos os ensaios foram executados em triplicata e comparados com um controle, no qual o EBE foi substituído por tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8).

3.6.3 Análise do tempo e da temperatura de coagulação

Após determinar a concentração proteica mínima necessária para o processo de coagulação, procedeu-se à avaliação do tempo e da temperatura ótimos para o ensaio enzimático. Os testes de coagulação foram realizados de acordo com a metodologia descrita na seção 3.6.1, abrangendo seis intervalos de tempo (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) e três faixas de temperatura (25, 37 e 50 °C). Esses ensaios foram conduzidos em triplicata e comparados com um controle, no qual o EBE foi substituído por tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8).

3.6.4 Verificação da hidrólise de caseína do leite desnatado por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis

Através de eletroforese, avaliou-se a hidrólise da caseína solúvel pela ação das proteases séricas presentes no extrato. Para isso, foram carregadas alíquotas de 25 µL de soro de leite, obtidas a partir da curva de tempo de coagulação, em géis de poliacrilamida

(15%) com SDS, conforme descrito por Laemmli (1970). Para validar o método, foi verificada a concentração de proteínas solúveis residuais e os peptídeos liberados no soro como produtos da ação proteolítica. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford, com albumina de soro bovino como padrão (BRAFFORD, 1976).

3.6.5 Ensaio de desnaturação térmica

O extrato bruto enzimático (EBE) foi submetido a um aquecimento a 100 °C por 15 minutos. Em seguida, alíquotas de 10 µL foram utilizadas nos ensaios de coagulação com leite desnatado reconstituído (LDR), realizados a 37 °C e 50 °C por 120 minutos, conforme descrito na seção 3.6.1. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e comparados com o controle (EBE nas condições nativas, sem aquecimento).

3.6.6 Estudo do efeito da concentração de cálcio sobre a coagulação do leite

Os ensaios de coagulação com LDR foram realizados utilizando concentrações crescentes de cálcio (0, 0,01, 0,1, 0,25, 0,5, 2, 4, 6, 8 e 10 mmol L⁻¹) no meio reacional. Utilizou-se um volume de 10 µL de EBE e as amostras foram incubadas de acordo com os procedimentos descritos na seção 3.6.1. Os ensaios foram realizados em triplicata e comparados com o controle (substituição do EBE por tampão Tris HCl, 0,5 M, pH 8).

3.6.7 Utilização de EBE na coagulação do leite integral pasteurizado (LIP)

Para comparar a ação do extrato enzimático, também avaliamos o efeito das proteases na coagulação do leite integral bovino pasteurizado, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para o leite em pó desnatado. Adicionamos CaCl₂ ao leite a uma concentração de 10 mM e ajustamos o pH para 6,5. As amostras foram incubadas a 37 °C por um período de tempo variando de 30 a 150 minutos. Essa análise foi conduzida em triplicata, e para o controle, substituímos o extrato enzimático bruto (EBE) por tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0). Após os respectivos períodos de incubação, cada triplicata foi centrifugada, juntamente com seu controle correspondente, para avaliar a formação do coágulo.

3.7 Resultados e Discussões

Os resultados obtidos na produção, caracterização e aplicação de uma protease coagulante de leite, derivada da FES com o fungo *P. djamor* PLO13, culminaram no depósito de uma patente e na submissão de um artigo científico (ANEXO 1 e 2). Os detalhes dessas pesquisas serão apresentados a seguir.

3.7.1 Caracterização estrutural do farelo de trigo

O método de cultivo sólido de *P. djamor* PLO13 em farelo de trigo mostrou-se eficaz para a obtenção da protease. Neste contexto, o potencial nutritivo (*in natura*) foi investigado através de análises físico-químicas, a fim de determinar seu uso como fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultivo microbiano. Os percentuais (% , g / 100 g de matéria seca) obtidos *in natura* foram expressos na tabela 10.

Tabela 10- Composição química do farelo de trigo *in natura*.

Componentes	% (g / 100 g)
Proteína bruta	19,46 ± 0.53
FDN	51,93 ± 1.94
FDA	13,32 ± 0,89
Lignina	3,37 ± 0.46
Celulose	9,94 ± 0,98
Hemicelulose	38,86 ± 1.65

Abreviaturas: FDN- Fibra detergente neutra e FDA- fibra detergente ácida
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Duan et al. (2022) observaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para proteínas totais, fibra de detergente neutra e ácida (PB: 19,54 ± 6,1; FDN: 41,14 ± 1,0; FDA: 10,07 ± 1,7), no entanto, diferente do observado neste estudo, os autores não detectaram a presença de lignina na amostra analisada. O FT é caracterizado como uma biomassa lignocelulósica, por apresentar na sua constituição altos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina. Características como alto potencial de umidade e redução na perda da matéria seca, favorece sua utilização como substrato na FES, por ser constituído de um elevado percentual de fibra insolúvel e células de aleurona do gérmen, o que evita o processo de secagem fermentação em estado sólido (MAMO et al., 2020; ŠRAMKOVÁ; GREGOVÁ e ŠTURDÍK, 2009; SARFARAZ et al., 2017).

Os resíduos gerados da agroindústria são fortes candidatos a serem utilizados em processos de FES, pois são excelentes fontes de carbonos e nutricionais para crescimento de fungos e conseqüentemente, para a produção de produtos de valor agregado, como é o caso das enzimas. Sua produção pode ser afetada pela quantidade de nutrientes presentes no meio de cultivo e outros fatores como temperatura, pH, tempo de incubação e densidade do inóculo (MAMO et al., 2020; SANTOS et al., 2016). O método de FES tem sido bastante utilizado em pesquisas que buscam produzir enzimas, tais como proteases, por se tratar de um método ambientalmente sustentável. Contato et al. (2023), Da Silva et al. (2016), Mamo et al. (2020) e Alahmad Aljammal; Yazji; Azizieh (2022) utilizaram o farelo de trigo como substrato agroindustrial para a produção de protease na FES com os fungos *Pleurotus pulmonarius*, *Aspergillus tamaris* URM4634 e *Aspergillus oryzae* DRDFS13, *Rhizomucor miehei* Rm4, respectivamente.

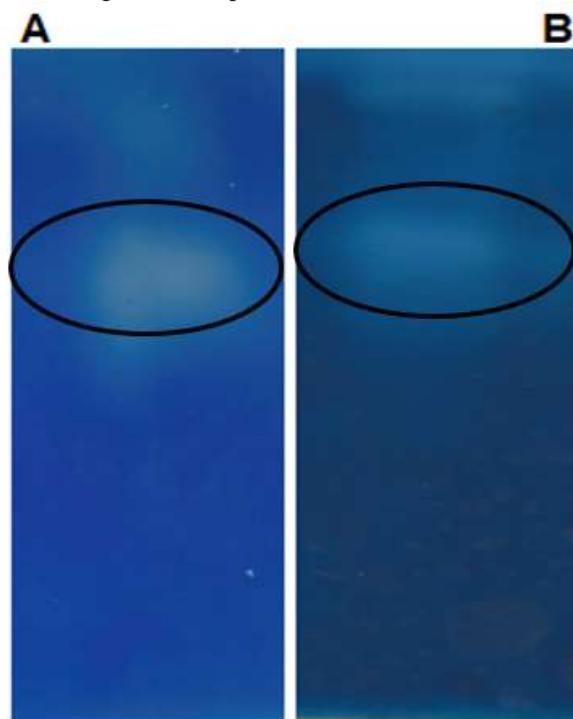
3.7.2 Preparo do extrato enzimático e verificação da atividade caseinolítica e dos inibidores

Inicialmente *P. djamor* PLO13 foi submetido a crescimento, através do processo de FES, observando que o melhor tempo de produção enzimática foi de 120 h de cultivo. O EBE do fungo *P. djamor* PLO13, cultivado em farelo de trigo apresentou 198,3 U equivalente a atividade proteolítica frente a azocaseína e 3.976 U.mg⁻¹ de atividade específica. Estes resultados foram superiores ao descrito por Ferreira e colaboradores (2023), ao descreverem que a protease produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*, por FES foi ativa frente ao substrato azocaseína, apresentando atividade específica de 741,3 U/mg, sendo capaz de hidrolisar a caseína presente no gel e poliacrilamida.

Os zimogramas mostrados na figura 37 demonstraram as hidrólises dos substratos, caseína (Figura 37A) e gelatina (Figura 37B), através de uma zona clara no gel após a coloração, confirmando que a protease em estudo se mostrou ativa em meio sólido, em ambos os substratos.

Uma nova protease com atividade específica de 10.500 U/mL foi purificada do *Pleurotus saior-caju* e hidrolizou a caseína presente no gel SDS-nativa (OMRANE BENMRAD et al., 2019). Afsharnejad; Shahangian; Sariri (2019) também observaram uma região branca na zimografia de gelatina, caracterizando-a como hidrólise. Em seu estudo, Majumder; Banik; Khowala (2015), utilizaram zimografia de gelatina para determinar a presença da protease coagulante obtida a partir da fermentação submersa com *Termitomyces clypeatus* MTCC5091.

Figura 37- Zimograma: A- substrato caseína e em B- substrato gelatina. As áreas claras indicam onde ocorreu a hidrólise da caseína e da gelatina, respectivamente.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.7.3 Verificação da atividade caseinolítica frente aos inibidores

A sensibilidade aos inibidores desempenha um papel crucial na classificação das proteases (MAJUMDER; BANIK; KHOWALA, 2015). Portanto, para identificar a classe de proteases à qual a enzima em estudo pertence, realizamos testes de inibição com inibidores específicos para serina, cisteína e metaloproteases (Tabela 11). Entre os inibidores testados, o EDTA, na concentração utilizada, apresentou a maior inibição da atividade caseinolítica (68,78%), seguido pelo PMSF e β -mercaptoetanol, com inibições de 44,86% e 29,6%, respectivamente. Os inibidores de tripsina, benzamidina e SBTI, não demonstraram inibição significativa.

Com base no perfil de inibição da atividade caseinolítica encontrada no EBE, sugerimos a presença de uma serinoprotease distinta da tripsina, pois SBTI e benzamidina, inibidores específicos para tal classe enzimática, não mostraram inibição da enzima, podendo ainda conter a presença de outras proteases pertencentes às classes de metaloproteases e cisteinaproteases, pois a atividade foi diminuída frente a EDTA e β -mercaptoetanol. Este resultado está em concordância com a pesquisa de Majumder; Banik; Khowala (2015), que identificaram uma inibição significativa da atividade caseinolítica da protease coagulante obtida a partir da fermentação submersa com *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091 na presença do agente complexante EDTA.

Para uma caracterização mais precisa da classe enzimática da protease, realizamos ensaios com os substratos da tripsina, quimiotripsina e elastase. Observamos que a protease presente no EBE demonstrou maior atividade com o substrato L-Leu-pNA (específico para elastase), com uma atividade de $4,3 \times 10^{-3}$ mU.mL⁻¹, e menor atividade com o substrato SAAPFpNA, $1,496 \times 10^{-4}$ mU.mL⁻¹ (específico para quimiotripsina), não apresentando atividade contra o substrato BapNA (específico para tripsina). Esses resultados corroboram os dados obtidos nos ensaios de inibição.

Com o objetivo de confirmar a classe enzimática da protease, testamos os inibidores que reduziram a atividade caseinolítica quanto à atividade da elastase (Tabela 11). Observou-se que o PMSF aboliu completamente a atividade proteolítica da elastase, enquanto o EDTA (5 mmol/L) reduziu parcialmente essa atividade (74,85%). Isso sugere que a protease coagulante do leite, descrita neste estudo, pertence à classe das elastase 2 símile é dependente de íons metálicos.

Tabela 11- Porcentagem de inibição das atividades caseinolítica e elastolítica na presença de diferentes inibidores de protease.

Inibidores	Inibição da atividade caseinolítica (%)	Inibição da atividade da elastase 2 símile (%)
PMSF	44,86	100
β-mercaptoetanol	29,6	-
EDTA	68,78	74,85
Benzamidina	-	-
SBTI	-	-

Abreviaturas: PMSF- fluoreto de fenilmetanosulfonila , EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético, SBTI- inibidor de tripsina de soja

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Esse resultado está em consonância com as conclusões do estudo de Alici e Arabaci (2018), que investigaram a inibição da atividade de uma serinoprotease de morango (*Fragaria ananassa*). Eles observaram a inibição da atividade enzimática na presença de PMSF, e uma redução significativa na presença de EDTA, em uma concentração de 5,0 mM.

Além disso, outros estudos também corroboram esses achados. Zhang et al. (2019) e Suwannaphan et al. (2017) descreveram a presença de serinoproteases derivadas de *Bacillus licheniformis* BL312MCE e *Bacillus sp.*, respectivamente, que foram fortemente inibidas por PMSF e EDTA.

Um exemplo adicional é uma protease alcalina isolada de *Micrococcus sp.* do Mar da China Meridional, que foi inibida na presença de inibidores de serino e metaloprotease, mesmo sendo classificada como uma serinoprotease (HOU et al., 2017). Esses estudos destacam a sensibilidade dessas enzimas a esses inibidores específicos e contribuem para uma melhor compreensão das características das proteases em diferentes contextos biológicos.

3.7.4 Aplicação da enzima elastase 2 símile na coagulação do leite e no estudo das condições de coagulação

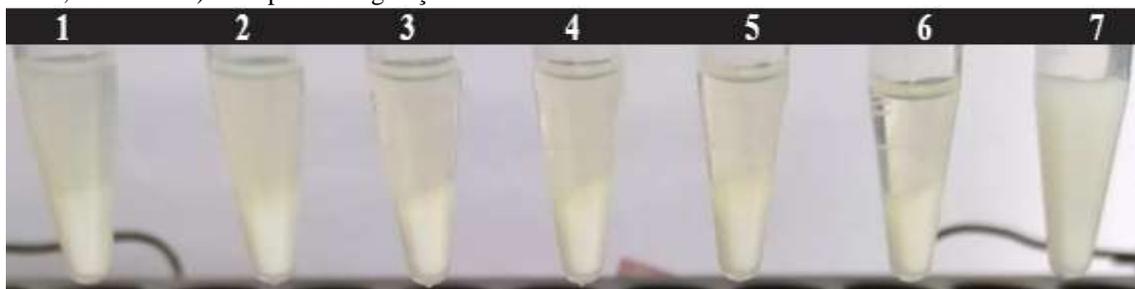
3.7.4.1 Análise da concentração de proteínas no EBE utilizadas na coagulação

Foram realizados testes de coagulação do leite com diferentes concentrações de proteínas do EBE (60; 30; 15; 7,5; 3,75; e 1,875 mg. mL⁻¹), conforme representado na Figura 38. Os resultados da curva de concentração indicam que a protease presente no EBE demonstrou eficiência na coagulação do LDR a partir de uma concentração de 1,875 mg. mL⁻¹ de proteína, mantendo a coagulação eficaz por um período de 120 minutos. O aumento da concentração proteica acelerou o processo de coagulação do leite.

Portanto, nos ensaios subsequentes de coagulação do leite, optou-se por utilizar a menor concentração proteica capaz de promover a coagulação eficaz. É importante destacar que a etapa de coagulação do leite desempenha um papel crucial na produção de queijo (SILVA et al., 2021). Esse processo ocorre em duas etapas: inicialmente, na presença do coalho ou coagulantes, ocorre a hidrólise enzimática da ligação peptídica Phe¹⁰⁵ e Met¹⁰⁶ nos resíduos de k-caseína, resultando na formação de para-k-caseína e glicomacropéptido (GMP). Em seguida, a k-caseína precipita na presença de cálcio, formando um coágulo denso e pouco solúvel (DA SILVA et al., 2017).

É importante mencionar que fatores como variações de temperatura, concentração de íons de cálcio e quantidade de coagulantes podem influenciar significativamente o processo de coagulação (FERREIRA et al., 2023). Portanto, entender e controlar esses fatores é essencial para garantir a qualidade e consistência na produção de queijo.

Figura 38- Curva de concentrações de proteínas do EBE (1- 1,875; 2- 60; 3- 30; 4- 15; 5- 7,5; 6- 3,75 mg/mL⁻¹; e 7- branco). Tempo de coagulação



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.7.4.2 Estudo do tempo e da temperatura de coagulação

Na concentração proteica de 1,875 mg. mL⁻¹, a protease demonstrou sua capacidade de coagular o LDR em diferentes temperaturas. A 37 °C, o processo de coagulação começou rapidamente, observando-se o início da coagulação após apenas 30 minutos de reação. Após 45 minutos, houve uma coagulação parcial, e em 60 minutos, a atividade coagulante alcançou seu pico (Figura 39A). Os tempos subsequentes (90 e 120 minutos) não apresentaram diferenças visuais na formação do coágulo formado após a centrifugação.

Por outro lado, a 50 °C, a coagulação começou ainda mais rapidamente, já aos 15 minutos de reação. Aos 45 minutos, a atividade de coagulação atingiu seu máximo (Figura 39B). Portanto, conclui-se que o melhor tempo e temperatura para a atuação da protease no processo de coagulação do leite foram de 60 minutos e 50 °C, com uma atividade de coagulação de $1,33 \times 10^{-2}$ mU. mL⁻¹.

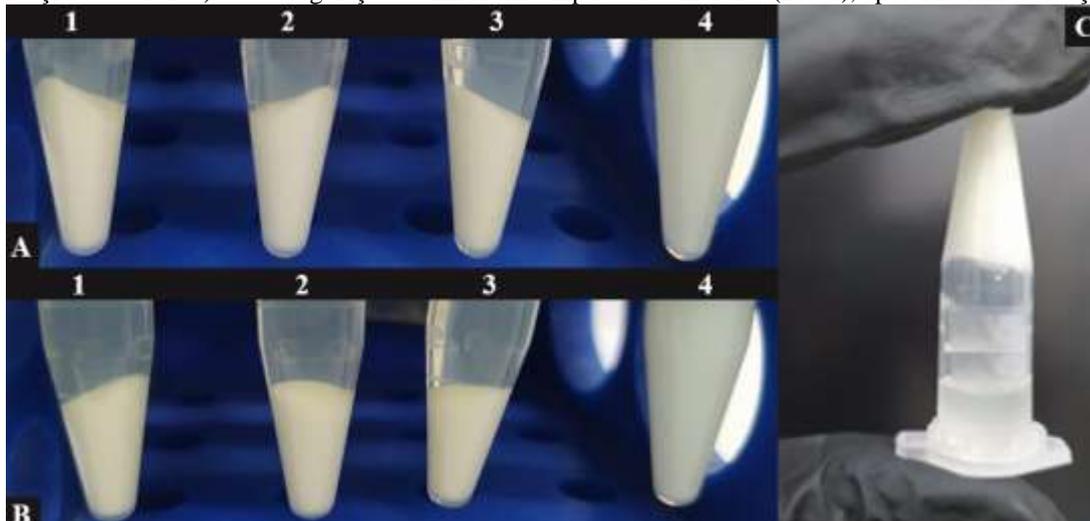
É importante notar que os estudos de Ferreira et al. (2023) e Nogueira et al. (2022) que analisaram a atividade coagulante de proteases presentes em extratos enzimáticos de fungos *P. sanguineus* e *P. Roqueforti*, respectivamente, obtiveram valores comparáveis a 4,17 mU. mL⁻¹ e $1,8 \times 10^{-2}$ U. mL⁻¹, demonstrando a eficácia da protease de *P. djamor PLO13*.

Além disso, é relevante destacar que a protease presente no EBE de *P. djamor PLO13* mostrou-se capaz de coagular o LDR em temperatura ambiente (25 °C) após 120 minutos de reação (Figura 39C). Isso é particularmente vantajoso para processos industriais, pois elimina a necessidade de controle de temperatura durante o processo.

Além disso, para confirmar esses resultados, o EBE foi submetido a aquecimento a 100 °C por 15 minutos, resultando na completa inativação da atividade enzimática. Isso confirma que a atividade coagulante está diretamente relacionada à ação das proteases presentes no EBE, uma vez que a característica enzimática é a perda total ou parcial da

atividade catalítica quando exposta ao aquecimento. Portanto, os resultados indicam que essa protease é altamente promissora para aplicações industriais de coagulação de leite, oferecendo flexibilidade em relação à temperatura e mantendo uma alta eficiência coagulante.

Figura 39- A- Reação de coagulação do LDR em 37 °C, após 60 min de reação (1,2 e 3- triplicata da reação e 4- branco). B- Reação de coagulação do LDR em 50 °C, após 45 min de reação (1,2 e 3- triplicata da reação e 4- branco). C- Coagulação do LDR em temperatura ambiente (25 °C), após 120 min de reação



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

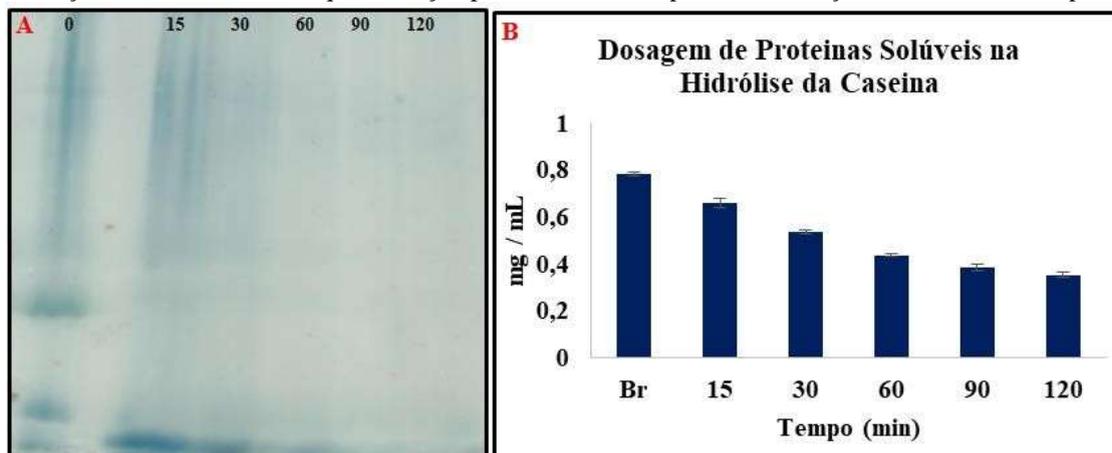
3.7.4.3 Verificação da hidrólise de caseína do leite desnatado por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis

Através da análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foi evidente que o Leite Desnatado Reconstituído (LDR) apresenta um amplo conteúdo proteico, conforme destacado na canaleta 1 (Figura 40A), marcada como "tempo inicial de coagulação". À medida que o tempo de reação progrediu de 0 a 120 minutos, foi observada uma clara evolução no processo, marcado pela redução nas proteínas presentes no soro.

Ficou claro que, após 30 minutos de reação, houve uma considerável diminuição na concentração proteica, e a partir dos 45 minutos, não foram observadas diferenças significativas no perfil de bandas do gel. Isso destaca e reforça os resultados obtidos nos ensaios de coagulação, conforme detalhado na seção 3.7.2 deste estudo.

Esses resultados estão em consonância com os obtidos por Santos (2020) e Ferreira et al. (2023) em suas investigações sobre o potencial de novos coagulantes extraídos das sementes de *C. stipularia* e do extrato aquoso do fungo *P. sanguineus*, respectivamente. A consistência desses achados em estudos anteriores destaca a eficácia da protease presente no EBE de *P. djamor PLO13* como um agente coagulante promissor com amplas aplicações industriais.

Figura 40- Verificação de atividade coagulante por meio de eletroforese em SDS-PAGE e quantificação de proteínas: Em A mostra-se o perfil de proteína do leite reconstituído no início e durante o tempo de incubação; em B observa-se a quantificação proteica durante o processo. A reação foi realizada em triplicata



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Considerando que durante o processo de coagulação, a caseína se precipita e forma um coágulo denso, é esperado que a concentração proteica no soro diminua. Portanto, para avaliar a eficiência do novo agente coagulante, foi monitorada a concentração de proteínas no soro do leite ao longo dos diferentes períodos de coagulação (Figura 40B).

A análise dos dados do perfil proteico exibido no gel, juntamente com a quantificação das proteínas totais no soro do leite, permitiu concluir que o extrato bruto obtido a partir da fermentação em estado sólido com o fungo *P. djamor* PLO13 mostrou-se eficiente nos testes de coagulação. Este agente coagulante é altamente ativo e capaz de promover a coagulação completa das proteínas da caseína presentes no leite. Esses resultados ressaltam a promissora aplicação industrial da protease obtida deste fungo.

3.7.4.4 Estudo do efeito da concentração de cálcio na coagulação

Neste estudo, observamos que a menor concentração (1,875 mg/mL) de proteínas presente no EBE foi capaz de coagular o leite desnatado reconstituído (LDR), independentemente da ausência ou adição de CaCl_2 , em três diferentes temperaturas testadas (25, 37 e 50 °C), variando apenas no tempo necessário para a coagulação completa. Na ausência de adição de cálcio, notou-se a hidrólise da caseína e, conseqüentemente, a formação de um coágulo gelatinoso após 120 minutos de reação a

25 °C. No entanto, esse resultado foi aprimorado com a suplementação de cálcio em diferentes concentrações, pois o aumento da quantidade de CaCl_2 resultou na redução do tempo necessário para a coagulação completa, em ambas as temperaturas.

Esses resultados estão em consonância com o ensaio de temperatura, onde foi necessário menos tempo para a coagulação na temperatura ótima (50 °C), em comparação com as temperaturas de 37 e 25 °C. Portanto, podemos concluir que a protease presente no EBE de *P. djamor* PLO13 demonstrou alta eficiência na coagulação do leite em todas as condições testadas, incluindo a ausência de cálcio, com sua atividade aumentando proporcionalmente à concentração de cálcio adicionado à mistura. Isso é semelhante ao comportamento observado com a enzima coagulante do leite de *A. oryzae*, que também respondeu positivamente à adição de cálcio, resultando em um processo de coagulação mais rápido (VISHWANATHA; APPU RAO; SINGH, 2010).

De acordo com Da Silva et al. (2019), que analisaram a atividade coagulante das peptidases produzidas através da FES usando farelo de trigo como substrato do fungo *A. leucospermi* LB86, houve um aumento progressivo na eficiência da hidrólise da caseína à medida que as concentrações de cloreto de cálcio aumentaram. Lizardi-Jiménez et al. (2019) também relataram que as proteases presentes nos extratos brutos produzidos por meio da FES com *R. microsporus* var. obtiveram uma maior atividade de coagulação do leite quando CaCl_2 foi adicionado.

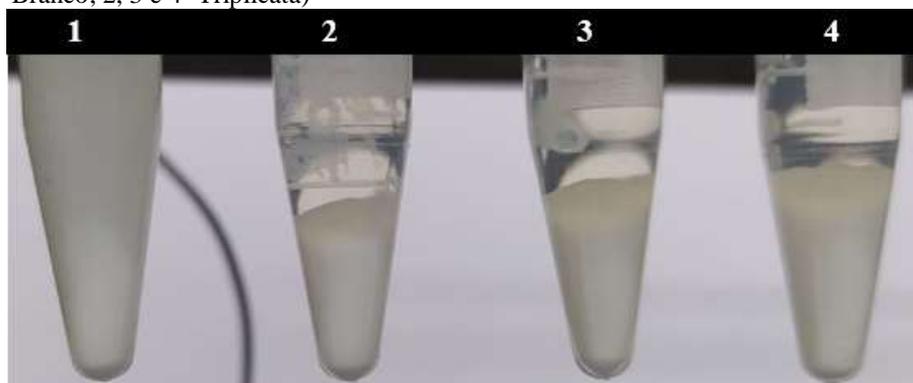
A adição de cloreto de cálcio no processo de hidrólise da caseína é uma prática comum nas etapas de produção de queijos, uma vez que compensa a perda de cálcio precipitado, além de superar as variações no tempo de coagulação, acelerando o processo e melhorando a textura e o rendimento do produto (BAIG et al., 2022; ARANGO; TRUJILLO; CASTILLO, 2018). Essa adição de cálcio ao leite altera o equilíbrio do fosfato de cálcio de solúvel para coloidal, resultando na produção de H^+ e em uma pequena redução no pH do leite. Esses processos favorecem a remoção de caseinomacropéptido (CMP) e para- κ -caseína, tornando as micelas de caseína instáveis, o que promove a coagulação do leite (FOX et al., 2015). A hidrólise da caseína, realizada por enzimas coagulantes, é influenciada pela concentração de íons de sódio e cálcio, pois sua presença possibilita a modificação conformacional da estrutura dessa proteína, além de favorecer a saída do soro e a formação do coágulo gelatinoso (MCMAHON et al., 2014; AFSHARNEZHAD; SHAHANGIAN; SARIRI, 2019).

2.1.1.1 Aplicação na coagulação Leite integral pasteurizado- LIP

Após verificar a eficiência das proteases presentes no extrato fúngico na hidrólise da caseína do leite em pó bovino desnatado, decidimos realizar o mesmo ensaio de coagulação com leite integral bovino pasteurizado. A Figura 41 exibe a coagulação do leite integral pasteurizado, na qual fica evidente que a protease presente no EBE de *P. djamor* PLO13 também demonstrou eficácia na produção do coágulo no LIP. Independentemente das condições de temperatura, tempo e concentração de cálcio, o processo reacional ocorreu de maneira mais eficaz e em um tempo inferior ao observado com o leite em pó.

Na temperatura ótima da enzima (50 °C) e com a adição de 10 mmol/L de cálcio, a coagulação do leite integral pasteurizado ocorreu em apenas 30 minutos. Esse resultado indica que a protease do EBE de *P. djamor* PLO13 é altamente eficiente na coagulação do LIP, demonstrando seu potencial para aplicações na produção de queijos de forma mais rápida e eficaz.

Figura 41- Reação de coagulação do leite integral pasteurizado na temperatura de 50 °C, após 30 min de reação (1- Branco; 2, 3 e 4- Triplicata)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Esse resultado é de extrema relevância para o estudo, uma vez que demonstra a eficácia da protease em condições que simulam a produção real de queijo. Vale ressaltar que a composição do leite exerce um impacto direto no rendimento e na composição do queijo. O leite integral pasteurizado contém uma proporção maior de gordura em comparação com o leite desnatado, o que contribui para a melhoria das características texturais, funcionais e sensoriais dos produtos lácteos (MOUDRÁ et al., 2017). Durante a fabricação do queijo, a gordura e a caseína são concentradas, enquanto outros componentes do leite, como a água, são eliminados no soro (TROCH et al., 2017). Tais resultados demonstram a capacidade de coagulação da protease presente no EBE de *P. djamor* PLO13 atuar nas condições padrões para produção de queijo.

2. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

4.1 Conclusões em relação a atividade endoglucanásica

- Entre os resíduos testados, o farelo de trigo mostrou ser o mais eficiente para o crescimento microbiano nas condições utilizadas.
- O tempo ótimo de produção da endoglucanase pelo fungo *P. djamor* PLO13 foi de 120 horas de cultivo.
- Foi purificada uma endoglucanase halotolerante e halofílica, com massa molecular aproximada de 26 kDa utilizando precipitação orgânica, seguida de cromatografia de troca aniônica (DEAE-SEPHAROSE), com 110 % de recuperação.
- A endoglucanase pura apresentou temperatura e pH ótimo de 50 °C e 5,0, respectivamente e se manteve estável em uma ampla faixa de temperatura e pH.
- EDTA, Mn^{2+} e Ca^{2+} ativaram a atividade enzimática, enquanto Mg^{2+} inibiu.
- Em termos de cinética enzimática, a enzima exibiu um K_m de $0,0997 \pm 0,0063$ mg/ml e um V_{max} de $0,1122 \pm 0,00109$ mol/min/mL, indicando sua eficácia na hidrólise de substratos específicos.

4.2 Conclusões em relação aos estudos da atividade proteolítica:

- O EBE do fungo *P. djamor* PLO13 exibiu uma atividade proteolítica de 198,3 U contra azocaseína e atividade específica de 3.976 U. mg^{-1} .
- A protease do *P. djamor* PLO13 foi classificada como uma serinoprotease semelhante à elastase 2 símile, dependente de íons metálicos.
- Na concentração proteica de 1,875 mg/ mL, a elastase 2 símile demonstrou atividade coagulante para LPD e LIP, na presença ou ausência de adição de cálcio.
- A temperatura ótima para a coagulação de LPD foi de 50 °C, no tempo ótimo de 45 minutos.
- A protease coagulante do *P. djamor* PLO13 é um produto de baixo custo, com características que a tornam apropriada para uso industriais.

4.3 Perspectivas

- Analisar a ação da elastase 2 símile presente no extrato bruto de *P. djamor* PLO13 em detergentes e cosméticos.
- Aplicar a endoglucanase no extrato bruto de *P. djamor* PLO13 e a ela pura no processo de sacarificação.
- Publicar os resultados referente as endoglucanases.

5 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, Bawadi et al. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 107, p. 37-50, 2019.

ADAMS, Joseph P. et al. Biocatalysis: A pharma perspective. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 361, n. 11, p. 2421-2432, 2019.

AFSHARNEZHAD, Moslem; SHAHANGIAN, S. Shirin; SARIRI, Reyhaneh. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 173-182, 2019.

AHMED, Shams Forruque et al. Pathways of lignocellulosic biomass deconstruction for biofuel and value-added products production. **Fuel**, v. 318, p. 123618, 2022.

AHMED, Amer; BIBI, Aasia. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **International Journal of Health and Life-Sciences**, v. 4, n. 1, p. 19-36, 2018.

AHMED, Samia A. et al. Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences** v. 4, n. 5, p. 434-446, 2008.

AIN, Qurat Ul et al. Production, Purification and Characterization of Endoglucanase from Locally Isolated *Aspergillus flavus*: Production of Endoglucanase by *Aspergillus flavus*. **Biological Sciences-PJSIR**, v. 65, n. 3, p. 235-245, 2022.

AJAYI, Abayomi M. et al. Ananas comosus (L) Merrill (pineapple) fruit peel extract demonstrates antimalarial, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities in experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 282, p. 114576, 2022.

AKRAM, Fatima et al. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: a review. **Renewable Energy**, v. 122, p. 225-238, 2018.

ALAHMAD ALJAMMAS, Houthail; YAZJI, Sabah; AZIZIEH, Abdulhakim. Optimization of protease production from *Rhizomucor miehei* Rm4 isolate under solid-state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2022

ALECRIM, Mircella Marialva et al. *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-

clotting protease production in submerged and solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 7, p. 312-318, 2017.

ALGHANIMI, Ali AJ; ALEBADI, Suroor MA; AL-ETHARI, Aziz YH. Partial purification and characterization of protease from local isolate of *Beuveria bassiana*. **Scientific Journal of medical Research**. v. 4, n.13, p. 17-22, 2020.

ALI, Nasir et al. Correction to: Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. **Applied microbiology and biotechnology**, 2020.

ALICI, Esmá Hande; ARABACI, Gulnur. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.

AMINI, Elahe; VALLS, Cristina; RONCERO, M. Blanca. Ionic liquid-assisted bioconversion of lignocellulosic biomass for the development of value-added products. **Journal of Cleaner Production**, v. 326, p. 129275, 2021.

ANANDHARAJ, Marimuthu et al. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 8, p. 1666-1686, 2016.

ARANGO, Oscar; TRUJILLO, Antonio José; CASTILLO, Manuel. Monitoring the effect of inulin, protein, and calcium on milk coagulation phases using a fibre optic sensor. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 80-86, 2018.

ARBIGE, Michael V.; SHETTY, Jay K.; CHOTANI, Gopal K. Industrial enzymology: the next chapter. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1355-1366, 2019.

ARJA, Miettinen-Oinonen. Cellulases in the textile industry. In: **Industrial enzymes**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 51-63.

ARORA, Sushrut; SAXENA, Vikas; AYYAR, B. Vijayalakshmi. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, v. 116, p. 84-94, 2017.

ARRUDA, Heder Jobbins de. Produção industrial de enzimas e aplicações no processo cervejeiro: uma revisão da literatura. Congresso Brasileiro de Engenharia de Produção. 2017.

ASHA, P.; DIVYA, Jose; SINGH, IS Bright. Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. **Bioresource technology**, v. 213, p. 245-248, 2016.

ASKER, Mohsen MS et al. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 103-109, 2013.

ÁZAR, Rafaela IS Ladeira et al. Impact of protein blocking on enzymatic saccharification of bagasse from sugarcane clones. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 7, p. 1584-1593, 2019.

BADGUJAR, Shamkant B.; MAHAJAN, Raghunath T. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 391-398, 2014.

BAIG, Davuddin et al. Technological challenges in production of camel milk cheese and ways to overcome them—A review. **International Dairy Journal**, p. 105344, 2022.

BAJAJ, Priyanka; MAHAJAN, Ritu. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 21, p. 8711-8724, 2019.

BALA, Anju; SINGH, Bijender. Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and their applicability in bread making. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-10, 2017.

BAKKER, Christiane Maria Christina Nóbrega. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE. 2017.

BANIK, Rathindra Mohan; PRAKASH, Monika. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiological research**, v. 159, n. 2, p. 135-140, 2004.

BANO, S. et al. Characterization of crude protease produced by *Pleurotus eryngii* ATCC 90888. **Pak. J. Biotechnol**, v. 13, p. 193-198, 2019.

BARBOSA, Elliza Emily Perrone et al. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 92475-92485, 2020.

BARBOSA, Kledson Lopes et al. Bacterial cellulase from the intestinal tract of the sugarcane borer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 441-448, 2020.

BARBOSA, Fernando Cesar; SILVELLO, Maria Augusta; GOLDBECK, Rosana. Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. **Biotechnology letters**, v. 42, n. 6, p. 875-884, 2020.

BASHIROVA, Anna et al. Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to improve its thermostability. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1602, 2019.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases–Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197-210, 2017.

BETTACHE, Azzeddine et al. Purification and characterization of an endoglucanase produced from streptomyces sp. strainbpng23. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 10, n. 2, p. 284-288, 2020.

BEZERRA, César da Silva et al. **Estudo do potencial inseticida de um inibidor de proteinase de sementes de Inga vera sobre o desenvolvimento de Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae): aspectos fisiológicos e bioquímicos**. Dissertação (mestrado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 2014.

BHARATHIRAJA, Subramaniyan et al. Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, 2017. p. 125-148.

BEHERA, Sudhanshu S.; RAY, Ramesh C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International journal of biological macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.

BENMRAD, Maroua Omrane et al. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. **International journal of biological**

macromolecules, v. 119, p. 1002-1016, 2018.

BILAL, Muhammad et al. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. **Environment international**, v. 124, p. 336-353, 2019.

BKHAIRIA, Intidhar et al. Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. **Food chemistry**, v. 196, p. 1346-1354, 2016.

BOUACEM, Khelifa et al. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 299-307, 2015.

BRADFORD M. M. Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. **Bioquímica Analista**, 1976;72:248–254.

BRANDELLI, Adriano; DAROIT, Daniel J.; RIFFEL, Alessandro. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735-1750, 2010.

BURGESS, Richard R. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein expression and purification**, v. 150, p. 81-85, 2018.

CAGNONE, Maddalena et al. A pilot study to investigate the balance between proteases and α 1-antitrypsin in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant recipients. **High-throughput**, v. 8, n. 1, p. 5, 2019.

CAMARA, Marcela Candido. **Cultivo do cogumelo comestível pleurotus djamor em diferentes misturas de caroço de algodão e bagaço de cevada**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Grande Dourados, MS. 2014.

CAVALCANTE, Paula Acioly Wanderley et al. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018.

CAVALCANTI, M. T. H. et al. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 29-35, 2004.

CARVALHO, Cristiane Suely Melo de et al. Applicability of the use of waste from different banana cultivars for the cultivation of the oyster mushroom. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 819-826, 2012.

CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA JR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHAUDHARY, Nidhee; GROVER, Monendra. Bioindustrial applications of thermostable Endoglucanase purified from *Trichoderma viride* towards the conversion of agrowastes to value-added products. **Protein Expression and Purification**, p. 106324, 2023

CHATURVEDI, Venkatesh; VERMA, Pradeep. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 415-431, 2013.

CHAWALITSAKUNCHAI, W. et al. Properties of natural rubber reinforced with nano cellulose from pineapple leaf agricultural waste. **Materials Today Communications**, v. 28, p. 102594, 2021.

CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.

CHYLENSKI, Piotr et al. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of biotechnology**, v. 246, p. 16-23, 2017.

CIPOLATTI, Eliane Pereira et al. Enzymes in green chemistry: The state of the art in chemical transformations. **Advances in Enzyme Technology**, p. 137-151, 2019.

COELHO, Glauciane Danusa et al. Production and characterization of cellulase (CMCase) by fungus isolated from the thermophilic phase of a process of composting in fermentation in solid state with coconut bagasse green as a substrate. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 323–338, 2018.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582-594, 2002.

COLARES, Carla JG et al. Exploratory analysis of the distribution of lignin and cellulose in woods by raman imaging and chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 1297-1305, 2015.

COLLADOS, Ana et al. Applying food enzymes in the kitchen. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, p. 100212, 2020.

CONAB | acompanhamento da safra brasileira de grãos | v.9 – safra 2021/22, nº4 – Quarto levantamento | janeiro 2022. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acessado em 31 jan de 2022.

CONTATO, Alex Graça et al. Pleurotus pulmonarius: A protease-producing white rot fungus in lignocellulosic residues. **International Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 43-50, 2023.

CORRÊA, Rafaela Francini. **Produção recombinante e caracterização da endoglucanase IV de Trichoderma harzianum**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Genética evolutiva e Biologia molecular). Universidade Federal de São Carlos. 2014.

COSKUN, Ozlem. Separation techniques: chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

COSTA, Ricardo Bezerra. **Purificação, caracterização, avaliação de atividade antifúngica e citotóxica da lectina de casca de Genipa americana (JENIPAPO)**. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal de Alagoas- UFAL. 2018.

COSTA, Ricardo Bezerra. **Purificação, caracterização e avaliação de atividades antitumoral, antimicrobiana e sobre parâmetros hemostáticos das lectinas de Genipa americana L. (jenipapo), Rhizophora mangle L. (mangue vermelho) e da Própolis vermelha de Alagoas**. Tese de doutorado (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal de Alagoas- UFAL. 2022.

COUTO, Susana Rodriguez; SANROMÁN, Ma Angeles. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

DA FONSECA, Tamiris Rio Branco et al. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p. 1814-1822, 2015.

DARONCH, N. A. et al. Produção de Celulase por *Penicillium Sp.* Utilizando Resíduo Agroindustrial Em Fermentação Em Estado Sólido. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1215-1220, 2015.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues et al. Milk clotting and storage-tolerant peptidase from *Aureobasidium leucospermi* LB86. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 206-212, 2019.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food chemistry**, v. 225, p. 45-54, 2017.

DA SILVA, Osmar Soares et al. Novel protease from *Aspergillus tamaris* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, n. 04, p. 125, 2016.

DAVE, Bhaumik R. et al. Enhancement of cellulase activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 108-115, 2013.

DAVID, Aditi et al. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 1176-1184,

DAYANANDAN, A. et al. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 11, n. 5, p. 533-536, 2003.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food chemistry**, v. 225, p. 45-54, 2017.

DAWOUD, M. E. A.; EWEIS, M. Phytochemical control of edible mushrooms pathogenic bacteria. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 4, n. 1, p. 321, 2006.

DE ALMEIDA, Maíra N. et al. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource technology**, v. 143, p. 413-422, 2013.

DE AZEVEDO, Afonso RG et al. Possibilities for the application of agro-industrial wastes in cementitious materials: A brief review of the Brazilian perspective. **Cleaner Materials**, v. 3, p. 100040, 2022.

DE BRITO, Aila Riany et al. Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 10, p. 977-985, 2017.

DE CARVALHO, Marise Silva et al. Aplicação de métodos quimiométricos para otimização da secreção de xilanase por *Aspergillus oryzae* em fermentação em estado sólido e sua aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais. **Valorização de Resíduos e Biomassa**, v. 14, n. 10, pág. 3183-3193, 2023.

DE CASTRO, R. J. S. et al. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 199–207, 2015.

DE ALMEIDA, Maíra N. et al. Characteristics of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource technology**, v. 143, p. 413-422, 2013.

DE LA CRUZ QUIROZ, Reynaldo et al. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 326-333, 2015.

DE LIMA, Emmly Ernesto et al. Biochemical characterization of a partially purified protease from *Aspergillus terreus* 7461 and its application as an environmentally friendly dehairing agent for leather industry. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 320-330, 2021.

DE OLIVEIRA MELO, Amanda Moreira et al. New Protease Produced by Solid State Fermentation of *Penicillium camemberti* 0798400075 Using Coffee Hull Applied in Milk Coagulation. 2023.

DESWAL, Deepa; KHASA, Yogender Pal; KUHAD, Ramesh Chander. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 6065-6072, 2011.

DE SOUZA, D. D. et al. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds. **South African Journal of Botany**, v. 104,

p. 30-34, 2016.

DE SOUZA MOREIRA, Leonora Rios; SCIUTO, Débora Lo; FERREIRA FILHO, Edivaldo Ximenes. An Overview of Cellulose-Degrading Enzymes and Their Applications in Textile Industry. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 165-175, 2016.

DE SOUZA, Thaiza SP; KAWAGUTI, Haroldo Yukio. Celulases, Hemicelulases e Pectinases: Aplicações na Indústria de Alimentos e Bebidas. **Tecnologia de Alimentos e Bioprocessos**, p. 1-32, 2021.

DETTMER, Aline et al. Environmentally friendly hide unhairing: enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and delimidig. **Journal of cleaner production**, v. 47, p. 11-18, 2013.

DEVI, M. Kalpana et al. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian journal of science and technology**, v. 1, n. 7, p. 1-6, 2008.

DHAR, Hena; KASANA, Ramesh C.; GULATI, Arvind. Heterologous expression and characterization of detergent stable endoglucanase EG5B from *Paenibacillus* sp. IHB B 3084. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 9-15, 2015.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**. v. 61, n.5, p.510-515, 2009.

DING, Shaojun; GE, Wei; BUSWELL, John A. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvarella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. **FEMS microbiology letters**, v. 263, n. 2, p. 207-213, 2006.

DONG, Zixing; YANG, Shuangshuang; LEE, Byong H. Bioinformatic mapping of a more precise *Aspergillus niger* degradome. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 693, 2021.

DOS SANTOS, Dávida Maria Ribeiro Cardoso et al. Production, Purification, Characterization, and Application of Halotolerant and Thermostable Endoglucanase Isolated from *Pycnoporus sanguineus*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-12, 2023.

DOS SANTOS, Tamires Carvalho et al. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the purple mombin (*Spondias purpurea* L.) Residue. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-7,

2013.

DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; SATO, Hélia Harumi. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

DOS REIS, Eduardo Echer; SCHENKEL, Paulo Cavalheiro; CAMASSOLA, Marli. Effects of bioactive compounds from Pleurotus mushrooms on COVID-19 risk factors associated with the cardiovascular system. **Journal of Integrative Medicine**, 2022.

DUAN, Yajie et al. Production, purification and characterization of a novel antithrombotic and anticoagulant serine protease from food grade microorganism *Neurospora crassa*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 1-11, 2022.

DUNAEVSKY, Ya E. et al. Extracellular alkaline proteinase of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 3, p. 345-350, 2007.

DURMAZ, Ekrem et al. Bionanomateriais lignocelulósicos para aplicações em biossensores. **Micromáquinas**, v. 14, n. 7, pág. 1450, 2023.

DUTTA, Kasturi; DAVEREY, Achlesh; LIN, Jih-Gaw. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. **Renewable energy**, v. 69, p. 114-122, 2014.

EIRA, AF da. Cultivo do “cogumelo-do-sol”(Agaricus blazei (Murrill) ss.Heinemann). **Viçosa: Aprenda Fácil**, 2003.

EJAZ, Uroosa; SOHAIL, Maomé; GHANEMI, Abdelaziz. Celulases: Da bioatividade a uma variedade de aplicações industriais. **Biomimética**, v. 6, n. 3, pág. 44, 2021.

ELGAMMAL, Eman W. et al. Enhanced production, partial purification, and characterization of alkaline thermophilic protease from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 338, 2020.

EZEJIOFOR, Tobias I. Ndubuisi et al. Waste to wealth: Production of oxytetracycline using streptomyces species from household kitchen wastes of agricultural produce. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 43, p. 10115-10124, 2012.

FARINAS, C. Scarpelini et al. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011.

FAYAD, Syntia; MORIN, Philippe; NEHMÉ, Reine. Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1529, p. 1-28, 2017.

FAZILAT, A. Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from *Aspergillus niger*. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 32-38, 2016.

FEDATTO, Luciana Maria. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

FEKETE, Szabolcs et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 43-55, 2015.

FERREIRA, Alexsandra Nascimento. **Produção de lipase e protease fúngica em meio de baixo custo: Purificação, caracterização e aplicação biotecnológica**. Tese de doutorado (Doutorado em Química e Biotecnologia). 2022. Universidade Federal de Alagoas.

FERREIRA, Alexsandra Nascimento et al. Production, characterization, and application of a new chymotrypsin-like protease from *Pycnoporus sanguineus*. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-10, 2023.

FILIFE, Diogo et al. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, n. 1, p. 78-91, 2020.

FOX, P. F. et al. Chemistry and biochemistry of cheese. **Dairy chemistry and biochemistry**, p. 499-546, 2015.

FRANÇA, Renata Cristina da Penha. **Caracterização bioquímica e molecular da tripsina dos cecos pilóricos do *Bijupirá* (*Rachycentron canadum*) e a sua compatibilidade com formulações de detergentes**. Tese de doutorado (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) Universidade Federal de Pernambuco- UFPE- 2013.

FRANCESCHINA, Carolina Schell. Digestibilidade da proteína e proteína solúvel de coprodutos de trigo para suínos em crescimento. Trabalho de Conclusão de Curso.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013.

GAMA, Aline Rodrigues et al. *Streptomyces thermocerradoensis* I3 secretes a novel bifunctional xylanase/endoglucanase under solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 2, p. e2934, 2020.

GEEM, Kyoung Rok et al. Production of *Gloeophyllum trabeum* endoglucanase Cell12A in *Nicotiana benthamiana* for cellulose degradation. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

GERACE, Alessandro et al. X-ray structural study of human neutrophil elastase inhibition with a series of azaindoles, azaindazoles and isoxazolones. **Journal of Molecular Structure**, v. 1274, p. 134595, 2023.

Global Market Insights, **Tamanho do mercado de enzimas**. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market>.

GOMES, Marta Maria et al. Production, characterization and application in the saccharification of agro-industrial wastes of a thermostable and halotolerant endoglucanase. **Research Square**. Doi: : <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2724090/v1>. 2023.

GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ, Daniel A. et al. Exploring milk coagulation and proteolytic activities in different tissues of *Vallesia glabra*: a new source of plant proteolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 193, no. 2, p. 389-404, 2021.

GMOSER R; SINTCA C; TAHERZADEH M; LENNARTSSON P. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus. **Waste Management**, v. 97, n. 2019, p. 63–70, 2019.

GUERRAND, David. Economics of food and feed enzymes: status and perspectives. In: **Enzymes in human and animal nutrition**. Academic Press, 2018. p. 487-514.

GUNDE-CIMERMAN, Nina et al. Hypersaline waters in salterns—natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS microbiology Ecology**, v. 32, n. 3, p. 235-240, 2000.

GUNDE-CIMERMAN, Nina; ZALAR, Polona. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 170-179, 2014.

GURUMALLESH, Poorani et al. A systematic reconsideration on proteases. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 254- 267, 2019.

GURUNG, Neelam et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

HAMADA, Shigeki; KUBOTA, Keisuke; SAGISAKA, Masanobu. Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 51-57, 2017.

HAN, Xuewang et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into hydrocarbons: a mini review. **Catalysis Today**, v. 319, p. 2-13, 2019.

HAQ, Ikram ul et al. CenC, a multidomain thermostable GH9 processive endoglucanase from *Clostridium thermocellum*: cloning, characterization and saccharification studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1699-1710, 2015.

HMAD, Ines Ben et al. A novel ionic liquid-stable halophilic endoglucanase from *Stachybotrys microspora*. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 59-66, 2017.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HOU, Enling et al. Purification and characterization of an alkaline protease from *Micrococcus* sp. isolated from the South China Sea. **Journal of Ocean University of China**, v. 16, p. 319-325, 2017.

HUY, Nguyen Duc et al. Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 154-159, 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2022. Produção de Abacaxi no Brasil. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/abacaxi/br>. Acessado em 13 de set. De 2023.

IDRIS, Ayman Salih Omer et al. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**,

v. 242, p. 265-271, 2017.

IGWE, J. C.; ABIA, A. A. Studies on the effects of temperature and particle size on bioremediation of AS (III) from aqueous solution using modified and unmodified coconut fiber. **Global Journal of Environmental Research**, v. 1, n. 1, p. 22-26, 2007.

ISIKGOR, Furkan H.; BECER, C. Remzi. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.

JACKSON, Patricia L. et al. Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction. **Molecular medicine**, v. 16, n. 5, p. 159-166, 2010.

JASWAL, Anurag; SINGH, Piyush Pratap; MONDAL, Tarak. Furfural—a versatile, biomass-derived platform chemical for the production of renewable chemicals. **Green Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 510-551, 2022.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; NIELSEN, Per Henning. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. **Journal of cleaner production**, v. 42, p. 228-240, 2013. 2018.

JESWANI, Harish K.; CHILVERS, Andrew; AZAPAGIC, Adisa. Environmental sustainability of biofuels: a review. **Proceedings of the Royal Society A**, v. 476, n. 2243, p. 20200351, 2020.

KAINOOR, Pushpalata S.; NAIK, G. R. Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus* sp. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 384-390. 2010.

KAPAJ, Ana; DECI, Eda. World milk production and socio-economic factors effecting its consumption. In: **Dairy in human health and disease across the lifespan**. Academic Press, 2017. p. 107-115.

KARMAKAR, Moumita; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41, 2011.

KARNCHANATAT, Aphichart et al. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 5, p. 404-413, 2008.

KARTHIKEYAN, M.; KRISHNAMOORTHY, S. Theoretical analysis of de-inking methodology and process improvement initiatives in paper industry. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 1924-1927, 2021.

KEE, Seng Hon et al. Bioconversion of agro-industry sourced biowaste into biomaterials via microbial factories—a viable domain of circular economy. **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116311, 2021.

KOUR, Divjot et al. Extremophiles for hydrolytic enzymes productions: biodiversity and potential biotechnological applications. **Bioprocessing for biomolecules production**, p. 321-372, 2019.

KUHAD, Ramesh Chander; GUPTA, Rishi; SINGH, Ajay. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

KUMAR, Dinesh et al. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. **Revist Journal Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 661-672, 2008.

KUMAR, A.; DUHAN, J. S. Production and characterization of amylase enzyme isolated from *Aspergillus niger* MTCC-104 employing solid state fermentation. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 250-258, 2011.

KUMAR, Lakhan; JAIN, Sudhir Kumar. Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 5, p. 4, 2018.

KUMAR, Gopalakrishnan et al. Recent developments on alternative fuels, energy and environment for sustainability. **Bioresource technology**, p. 124010, 2020.

KUMAR, Mannu. Industrial applications of protease: A review. **Journal of Natural Remedies**, v. 20, n. 4, p. 01-06, 2020.

KUMAR, Deepak et al. Application of enzymes for an eco-friendly approach to textile processing. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2021.

KUMAR, Anil et al. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 564-582, 2021.

KUMARI, Moni; SHARMA, Anurag; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1295-1303, 2012.

KUMLA, Jaturong et al. Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2811, 2020.

LAEMMLI, Ulrich Karl. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMEIRA, S. A. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de *Bacillus* sp.** Tese (doutorado em produção vegetal) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, campos dos goytacazes-RJ. 123p. 2013.

LAMMERS, Tamy Cristina Gonçalves de Lima. **Efeito do processamento químico e térmico do farelo de trigo na solubilização de polissacarídeos benéficos para a saúde humana.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.

LASKAR, A et al. Three-dimensional molecular modeling of a diverse range of SC clan serine proteases. **Molecular biology international**, v. 2012, 2012.

LEÃO, Daniela Pereira. **Avaliação comparativa do potencial de farelo de trigo comercial e pericarpo de pequi como substratos na produção de fibras com capacidade antioxidante.** 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)– Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2013.

LEE, Wen-Chien; LEE, Kelvin H. Applications of affinity chromatography in proteomics. **Analytical biochemistry**, v. 324, n. 1, p. 1-10, 2004.

LEE, Chang-Ro et al. Expression and characterization of the processive exo- β -1, 4-cellobiohydrolase SCO6546 from *Streptomyces coelicolor* A (3). **Journal of basic microbiology**, v. 58, n. 4, p. 310-321, 2018.

LEITE, Paulina et al. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.

LEITE, Paulina et al. Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 315-322, 2019.

LEITE, Paulina et al. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.

LEMES, Ailton Cesar et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 217-224, 2016.

LI, Zhao et al. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food chemistry**, v. 256, p. 228-234, 2018

LIANG, Longyuan; XUE, Dongsheng. Kinetics of cellulose hydrolysis by halostable cellulase from a marine *Aspergillus niger* at different salinities. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 163-168, 2017.

LIN, Ling et al. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 2-2, 2012.

LINI, Fibrillian Zata et al. The effect of organosolv pretreatment on optimization of hydrolysis process to produce the reducing sugar. In: **MATEC Web of Conferences**. EDP Sciences, 2018. p. 01022.

LIU, Xiangyang; KOKARE, Chandrakant. Microbial enzymes of use in industry. In: **Biotechnology of microbial enzymes**. Academic Press, 2023. p. 405-444.

LIU, Yuzhong et al. Biofuels for a sustainable future. **Cell**, 2021.

LIU, Hao et al. Engineering microbes for direct fermentation of cellulose to bioethanol. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 1089-1105, 2018.

LIU, Dongyang et al. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. **Protein expression and purification**, v. 79, n. 2, p. 176-186, 2011.

LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A. et al. Fungal strain selection for protease production by solid-state fermentation using agro-industrial waste as substrates. **Chemical Papers**, v. 73, n. 10, p. 2603-2610, 2019

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. **Food chemistry**, v. 159, p. 55-63, 2014.

LOAIZA, Alexandra; GARCIA, Edwin; COLORADO, Henry-A. Evaluación de asfalto mezclado con polvo de corteza y fibras residuales de coco para aplicaciones estructurales. **Revista de la construcción**, v. 17, n. 3, p. 542-554, 2018.

LOPES, Leandro S. et al. Production of fungal enzymes in Macaúba coconut and enzymatic degradation of textile dye. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101651, 2020.

LU, Yan et al. The Characteristic of a Novel Metalloproteinase from *Puccinia Helianthi*. **Research Article**. Doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1172215/v1>. 2022.

LUCAS, Susana D. et al. Targeting COPD: advances on low-molecular-weight inhibitors of human neutrophil elastase. **Medicinal research reviews**, v. 33, n. S1, p. E73-E101, 2013.

MADHU, Amit; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of cleaner production**, v. 145, p. 114-133, 2017.

MAHALAKSHMI, N.; JAYALAKSHMI, S. Amylase, cellulase and xylanase production from a novel bacterial isolate *Achromobacter xylosoxidans* isolated from marine environment. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 230-233, 2016.

MAIJALA, Pekka et al. Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rotfungus *Physisporinus rivulosus*. **Enzyme and microbial technology**, v. 43, n. 2, p. 169-177, 2008.

MAJUMDER, Rajib; BANIK, Samudra Prosad; KHOWALA, Suman. Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food chemistry**, v. 173, p. 441-448, 2015.

MANAVALAN, Tamilvendan et al. Identification of a novel thermostable alkaline protease from *Bacillus megaterium*-TK1 for the detergent and leather industry. **Biology**, v. 9, n. 12, p. 472, 2020.

MAMO, Jermen et al. Application of Milk-Clotting Protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo Cheese Production. **Journal of Food Quality**, v. 2020, 2020.

MARATHE, Sarika Kedar et al. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 2018.

MARIAM, SH Sharifah et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and purification technology**, v. 144, p. 133-138, 2015.

MARQUES, George Lima et al. Production and characterisation of xylanase and endoglucanases produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through the solid-state fermentation of rice husk residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 2061-2069, 2018.

MARQUES, Natália Paganini et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.

MARTIM, Salomão Rocha et al. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 17, p. 660-667, 2017.

MATKAWALA, Fatema et al. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 1-12, 2021.

MAURER, Karl-Heinz. Detergent proteases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330-334, 2004.

MCMAHON, D. J. et al. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4780-4798, 2014.

MEHRNOUSH, Amid et al. Optimisation of freeze drying conditions for purified serine protease from mango (*Mangifera indica* Cv. Chokanan) peel. **Food chemistry**, v. 128, n. 1, p. 158-164, 2011.

MELANOURI, Eirini-Maria; DEDOUSI, Mariana; DIAMANTOPOULOU, Panagiota. Cultivo de cepas de cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii* em resíduos agroindustriais em fermentação em estado sólido. Parte I: Triagem de crescimento, endoglucanase, lacase e produção de biomassa na fase de colonização. **Conversão de Recursos de Carbono**, v. 5, n. 1, pág. 61-70, 2022.

MENESES, João PC et al. Exploratory study on the addition of sugarcane bagasse fibers to permeable friction course mixtures. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 33, n. 9, p. 04021241, 2021.

MOJISOV, Kiro et al. Production and application of α -amylase enzyme in textile industry. **Tekstilna industrija**, v. 66, n. 1, p. 23-28, 2018.

MONDAL, Saradmoni; SWAMY, Musti J. Purification, biochemical/biophysical characterization and chitooligosaccharide binding to BGL24, a new PP2-type phloem exudate lectin from bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3656-3666, 2020.

MONTEIRO, N. V.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI**, Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan/jun 2009.

MORENO RUIZ, L. et al. Biotechnological potential of ten *Pleurotus djamor* strains. In: Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), New Delhi, India, 19-22 November 2014. Volume I & II. **ICAR-Directorate of Mushroom Research**, p. 262-270. 2014.

MORIDSHAHI, Roghyeh et al. Biochemical characterization of an alkaline surfactant-stable keratinase from a new keratinase producer, *Bacillus zhangzhouensis*. **Extremophiles**, v. 24, n. 5, p. 693-704, 2020.

MÓTYÁN, János András; TÓTH, Ferenc; TŐZSÉR, József. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923-942, 2013.

MOUDRÁ, Kateřina et al. The combined effects of fat content, calcium chloride, and coagulant concentration on the development of cheese curd structure. **International**

Dairy Journal, v. 73, p. 92-97, 2017

MOURA, J. M. et al. **Análise da Eficiência Energética em Segmentos Industriais Selecionados**: segmento celulose e papel.[Brasília]: MME , 2018. Disponível em: http://www.mme.gov.br/documents/10584/105176754/PRODUTO+4_Vpublicacao.pdf/f48424df-30ef-464e-ac90-e30d97f41936 Acesso em: 15 maio 2019.

MURASHIMA, Koichiro et al. Purification and characterization of new endo-1, 4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 319-326, 2002.

NADEEM, Fareeha et al. Protease production from *Cheotomium globusum* through central composite design using agricultural wastes and its immobilization for industrial exploitation. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-11, 2019.

NAEEM, Aabgeena; FATIMA, Sadaf; HASAN KHAN, Rizwan. Characterization of partially folded intermediates of papain in presence of cationic, anionic, and nonionic detergents at low pH. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 83, n. 1, p. 1-10, 2006.

NAIKA, Gajendra S.; TIKU, Purnima Kaul. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the structural stability of endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7341-7345, 2011.

NANDY, Gargi et al. Gut microbiota from lower groups of animals: an upcoming source for cellulolytic enzymes with industrial potentials. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, p. 13614-13637, 2021.

NARAYANA, V. Lakshmi; RAO, L. Bhaskara. A brief review on the effect of alkali treatment on mechanical properties of various natural fiber reinforced polymer composites. **Materials Today: Proceedings**, v. 44, p. 1988-1994, 2021.

NARGOTRA, Parushi et al. Purification of an ionic liquid stable cellulase from *Aspergillus aculeatus* PN14 with potential for biomass refining. **Environmental Sustainability**, v. 5, n. 3, p. 313-323, 2022

NARRA, Madhuri et al. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 150-161, 2014.

NASCIMENTO, A. K. C. et al. Produção simultânea de-fructofuranosidase e fructo-oligossacarídeos por *Penicillium citreonigrum* URM 4459. **ENZITEC 2016-XXII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, p. 1-4, 2016.

NASCIMENTO, Thiago Pajeú et al. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 3, n. 03, p. 81-91, 2015.

NAVEED, Muhammad et al. Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 2, p. 307-323, 2021.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2013.

NGOC, Duan Pham et al. Characterization of immunogenic *Clonorchis sinensis* protein fractions by gel filtration chromatography. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 284-288, 2015.

NOGUEIRA, Laísa Santana et al. Thermostable trypsin-like protease by *Penicillium roqueforti* secreted in cocoa shell fermentation: Production optimization, characterization, and application in milk clotting. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 5, p. 2069-2080, 2022.

NOREEN, Saima et al. Protease production and purification from agro industrial waste by utilizing *Penicillium digitatum*. **Int. J. Appl. Biol. Forensic**, v. 1, p. 119-129, 2017.

ODDEPALLY, Rajender; SRIRAM, Gopi; GURUPRASAD, Lalitha. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry**, v. 96, p. 26-36, 2013.

OGUNYEWU, Olusola A. et al. Accessory enzymes of hypercellulolytic *Penicillium funiculosum* facilitate complete saccharification of sugarcane bagasse. **Biotechnology for biofuels**, v. 14, p. 1-17, 2021.

OLIVEIRA, Vagne de Melo. Obtenção de proteases a partir do trato digestivo de peixes neotropicais para aplicação na produção de peptídeos de colágeno. 2015.

OLIVEIRA, Polyany Cabral. **Produção e caracterização física e química de endoglucanase de *Penicillium roqueforti* atcc 10110 a partir de fermentação em**

estado sólido da casca da amêndoa do cacau. Dissertação de mestrado. 2018. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

OLIVEIRA, P. C. et al. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 3, p. 777-787, 2019.

ONI, Oyewole Daniel; OKE, Mushafau Adebayo; SANI, Alhassan. Mixing of *Prosopis africana* pods and corn cob exerts contrasting effects on the production and quality of *Bacillus thuringiensis* crude endoglucanase. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 50, n. 7, p. 735-744, 2020.

ONIPE, Oluwatoyin O.; JIDEANI, Afam IO; BESWA, Daniso. Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 12, p. 2509-2518, 2015.

ONUMA, Hiroki et al. Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Tricholoma matsutake* grown on barley based solid-state medium. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 669-676, 2019.

OMRANE BENMRAD, Maroua et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC biotechnology**, v. 19, p. 1-18, 2019.

ORJI, F. et al. Properties of *Aspergillus flavus* Cellulase Produced from Solid State Fermentation of Brewers' Spent Grain (BSG) as Substrate. **British Biotechnology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2016.

PABBATHI, Ninian Prem Prashanth et al. Role of metagenomics in prospecting novel endoglucanases, accentuating functional metagenomics approach in second-generation biofuel production: a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-28, 2021.

PAGE, Michael J.; DI CERA, Enrico. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PAGNUSSATT, Fernanda Arnhold et al. Property of protein fraction of rice, oat and wheat cultivars. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 70, n. 2, p. 185-192, 2011.

PALOMAR, L. Toscano et al. Partial characterization of the cellulolytic enzyme produced by filamentous fungi. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 411, 2016.

FRANCIS, Febe et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, n. 2, p. 107-115, 2003.

PATEL, Yashvant; NARAIAN, Ram; SINGH, V. K. Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2012.

PATEL, Amisha; SHAH, Amita. Purification and characterization of novel, thermostable and non-processive GH5 family endoglucanase from *Fomitopsis meliae* CFA 2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1161-1169, 2021.

PATEL, Anil Kumar et al. Production, purification, and application of microbial enzymes. In: **Biotechnology of microbial enzymes**. Academic Press, 2023. p. 25-57.

PAUL, Tanmay et al. Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 8-22, 2016.

PELIZER, Lucia Helena et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of food engineering**, v. 56, n. 4, p. 371-375, 2003.

PESSOA JR, A; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. 2005.

PHADTARE, Priya; JOSHI, Swati; SATYANARAYANA, T. Recombinant thermo-alkali-stable endoglucanase of *Myceliophthora thermophila* BJA (rMt-egl): biochemical characteristics and applicability in enzymatic saccharification of agro-residues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 107-116, 2017.

PHAM, Thi Hoa; QUYEN, Dinh Thi; NGHIEM, Ngoc Minh. Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. **Turkish journal of biology**, v. 36, n. 6, p. 694-701, 2012.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of**

Chemical Engineering, v. 30, n. 1, p. 117-123, 2013.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PRADO, Fabiano Brito et al. Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16356-16373, 2021.

PRASAD, B. R.; PADHI, R. K.; GHOSH, G. A review on key pretreatment approaches for lignocellulosic biomass to produce biofuel and value-added products. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 6, p. 6929-6944, 2023.

RAHARDJO, Yovita SP; TRAMPER, Johannes; RINZEMA, Arjen. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 161-179, 2006.

RAHMAN, Khadijah Hanim Abdul; YUSOF, Siti Jamilah Hanim Mohd; ZAKARIA, Zarina. Bioproteins production from palm oil agro-industrial wastes by *Aspergillus terreus* UniMAP AA-1. **Pertanika Journal Tropical Agricultural Science**. v. 39 (1): p. 29 -39. 2016.

RAMPINELLI, Jamile Rosa. **Produção de Pleurotus djamor e avaliação de seu potencial nutricional**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

RAO, Mala B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAO, Kiranmayee; NARASU, M. Lakshmi. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 21, 2007.

RATURI, Atul K. "Renewables 2019 global status report." (2019).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. *Biologia da Célula Vegetal*. In: **Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 18-70.

RAVINDRAN, Rajeev et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

RAVINDRAN, Rajeev et al. A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. **Bioresource technology**, v. 248, p. 272-279, 2018.

RAWAT, Rekha et al. An acidothermophilic functionally active novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus niger* HO: purification, characterization and molecular interaction studies. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 103-117, 2015

RAWLINGS, Neil D.; MORTON, Fraser R.; BARRETT, Alan J. An introduction to peptidases and the MEROPS database. In: **Industrial enzymes: Structure, function and applications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 161-179.

REKIK, Hatem et al. Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma nova serina protease alcalina estável em detergente da cepa RH12 de *Bacillus safensis*. **Revista internacional de macromoléculas biológicas**, v. 121, p. 1227-1239, 2019.

RIBEIRO, Bruna Fernandes et al. **Purificação parcial e caracterização de uma celulase produzida por *Streptomyces* sp. S5 e sua aplicação em panificação**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. 2020.

RIGO, Diane et al. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

ROCHA, Felype TB et al. Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20200867, 2021.

ROCHA-MARTÍN J; MARTINEZ-BERNAL C; PÉREZ-COBAS Y; REYES-SOSA F; GARCIA B. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 48–56, 2017.

ROMÃO, Débora CF et al. Assessment of the economic and energetic potential of residues from the green coconut industry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, p. 938-947, 2022.

SADH, Pardeep Kumar; DUHAN, Surekha; DUHAN, Joginder Singh. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

SAISUWAN, Ravi. "**Biossensores à base de celulose de elastase de neutrófilos humanos (HNE) para diagnósticos no local de atendimento de feridas crônicas**". Tese de Doutorado. Universidade da Colúmbia Britânica. 2020.

SANTALA, Outi; NORDLUND, Emilia; POUTANEN, Kaisa. Use of an extruder for pre-mixing enhances xylanase action on wheat bran at low water content. **Bioresource technology**, v. 149, p. 191-199, 2013.

SANTOS, Elizângela Aparecida dos.; FORTINI, Rosimere Miranda. **Um novo retrato da agricultura familiar do estado de Alagoas: a partir dos dados do censo agropecuário 2017**. Viçosa, MG: IPPDS, UFV, 2021. Disponível em: www.aksaam.ufv.br. Acesso em: 13 de nov. de 2023.

SANTOS, José Felipe Duarte dos. **Estudo socioeconômico dos produtores de fumo no povoado Lagoa do Mel-Craíbas/AL**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia). Universidade Federal de Alagoas- AL. 2023.

SANTOS, S .S. **O cultivo da cana-de-açúcar no estado de Alagoas: uma análise comparativa dos efeitos da mecanização no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, 103 p., 2011.

SANTOS, TAMIRES CARVALHO DOS et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 222-233, 2016.

SAQIB, Abdul AN et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SARFARAZ, Amin et al. Physicochemical and functional characterization of wheat milling co-products: fine grinding to achieve high fiber antioxidant-rich fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 77, p. 228-234, 2017.

SAROJ, Paramjeet; P, Manasa; NARASIMHULU, Korrapati. Biochemical characterization of thermostable carboxymethyl cellulase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 6, p. 2503-2527, 2022.

SARWAN, Jyoti; BOSE, J. C. Importance of Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, p. 3568-3575, 2021.

SAROJ, Paramjeet; P, Manasa; NARASIMHULU, Korrapati. Biochemical characterization of thermostable carboxymethyl cellulase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 6, p. 2503-2527, 2022.

SAWANT, Riddhi; NAGENDRAN, Saraswathy. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 568-579, 2014.

SCHEUER, P.M. et al. Trigo: Características E Utilização Na Panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Brasil, v. 13, n. 2, p. 211–222, 2011.

SCHIFFER, Celia A.; DÖTSCH, Volker. The role of protein-solvent interactions in protein unfolding. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 428-432, 1996.

SCHNEIDER, Willian Daniel Hahn et al. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 162-170, 2018.

SCHOLZ, Jaqueline Ribeiro et al. COVID-19, renin-angiotensin system, angiotensin-converting enzyme 2, and nicotine: what is the interrelation?. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 115, p. 708-711, 2020.

SEN, Aparajita et al. Biotechnological Applications of Microbial Enzymes to Replace Chemicals in the Textile Industry-A Review. **TEXTILE Association**, v. 82, n. 2, p. 68-73, 2021.

ŞEN, A.; ERYILMAZ, M.; BAYRAKTAR, H.; ÖNAL, S. Purification of α galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. **Separation and purification technology**, v. 83, p. 130-136, 2011.

SHARMA, Amita et al. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1346-1380, 2016.

SHARMA, Mayuri et al. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2019.

SHARMA, Aparajita; SHARMA, Aditi; TRIPATHI, Astha. Biological activities of

Pleurotus spp. polysaccharides: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. e13748, 2021.

SHAMTSYAN, Mark et al. New milk clotting enzyme produced by the basidial mushroom *Coprinus lagopides*. **LWT-Food Science and Technology**, vol. 58, no. 2, p. 343-347, 2014.

SHENG XUE, Dong et al. Ethanol tolerant endoglucanase from *Aspergillus niger* isolated from wine fermentation cellar. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 15, p. 19-24, 2018.

SHIVAMATHI, Chellam Somasundarar et al. Process optimization and characterization of pectin derived from underexploited pineapple peel biowaste as a value-added product. **Food Hydrocolloids**, v. 123, p. 107141, 2022.

SHRINIVAS, D.; NAIK, G. R. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2011.

SHELDON, Roger A.; WOODLEY, John M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical reviews**, v. 118, n. 2, p. 801-838, 2018.

SHEN, Jinsong. Enzymatic treatment of wool and silk fibers. In: **Advances in textile biotechnology**. Woodhead Publishing, 2019. p. 77-105.

SIGMA-ALDRICH, **Sepharose Ion Exchange Media**, Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/dff100pis.pdf> Acesso em Janeiro de 2016.

SILVA, Elisangela Teixeira da et al. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais). 2013. Universidade Católica de Pernambuco. Recife.

SILVA, Gabriela Muricy de Souza et al. Artichoke leaf extracts: Proteolytic activity, coagulant and HPLC analysis. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.

SILVA, Monizy da Costa. **Identificação de um inibidor de tripsina e purificação de uma tripsina símile presente nas sementes da espécie vegetal *chamaecrista nictitans* (L.) Moench**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. 2019.

SILVA-LOPEZ, Raquel Elisa da. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 4, n. 01, p. 108-119, 2013.

SILVA, Raquel Nascimento da. **Otimização das condições de cultivo de Bacillus licheniformis BCLLNF-01 para produção de celulase**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2019.

SILVA, Tatielle P. et al. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM5627. **Bioresource technology**, v. 270, p. 263-269, 2018.

SILVA, Tatielle Pereira. **Purificação, caracterização e aplicação da endoglucanase de Botrytis ricini URM 5627**. Tese de doutorado (Doutorado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. 2020.

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

SINGH, Ashwina et al. Comparative interaction study of amylase and surfactants for potential detergent formulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 261, p. 397- 401, 2018.

SINGH, Poonam; KUMAR, Sanjay. Microbial enzyme in food biotechnology. In: **Enzymes in food biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 19-28.

SINGH, Shalini et al. Cellulase in pulp and paper industry. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2016. p. 152-162.

SINGH, Shalini; MANGLA, Jyoti; SINGH, Sanamdeep. Evaluation of *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 as a source of enzymes for detergent industry. **Resources, Environment and Sustainability**, v. 5, p. 100030, 2021.

SINGH, Anita et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, p. 100652, 2021.

SIQUEIRA, Germano A.; DIAS, Isabella KR; ARANTES, Valdeir. Exploring the action

of endoglucanases on bleached eucalyptus kraft pulp as potential catalyst for isolation of cellulose nanocrystals. **International journal of biological macromolecules**, v. 133, p. 1249-1259, 2019.

ŠRAMKOVÁ, Zuzana; GREGOVÁ, Edita; ŠTURDÍK, Ernest. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. **Acta chimica slovacica**, v. 2, n. 1, p. 115-138, 2009.

SRILAKSHMI, J. et al. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 218-234, 2015.

SRIVASTAVA, Neha et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

SOCCOL, Carlos R., et al. "Brazilian biofuel program: an overview." 2005. SOCCOL, Carlos Ricardo et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.

SOLANKI, Preeti et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, n. 10, p. 1-25, 2021.

SOUZA, C. B. de et al. **Isolamento e caracterização da tripsina do ceco pilórico da espécie *Scomberomorus brasiliensis* (Serra)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. AL. 2018.

STERNER, Reinhard; LIEBL, Wolfgang. Thermophilic adaptation of proteins. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 39-106, 2001.

SUGANTHI, R. et al. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1756-1763, 2011.

SYED, Dastager G. et al. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource technology**, v. 100, n. 5, p. 1868-1871, 2009.

SUMANTHA, Alagarsamy, CHRISTIAN Larroche and ASHOK, Pandey. "Industrial microbiology and biotechnology of food grade proteases: a perspective." **Food Technology and Biotechnology** vol. 44, no. 2, pag. 211, 2006.

SUWANNAPHAN, Sunisa et al. A serine protease from newly isolated *Bacillus* sp. for efficient silk degumming, sericin degrading and colour bleaching activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 141-149, 2017.

TAN, Chung Hong et al. Novel lipase purification methods—a review of the latest developments. **Biotechnology journal**, v. 10, n. 1, p. 31-44, 2015.

TANASKOVIĆ, Sonja Jakovetić et al. Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition. **Journal of Cereal Science**, v. 99, p. 103159, 2021.

TAPIA, María S.; ALZAMORA, Stella M.; CHIRIFE, Jorge. Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. **Water activity in foods: Fundamentals and applications**, p. 323-355, 2020.

TAVANO, Olga Luisa et al. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412-436, 2018.

THAPA, Santosh et al. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, p. 621-648, 2020.

TIAN, Mengmeng et al. Production of endoglucanase and xylanase using food waste by solid-state fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 12, p. 2391-2398, 2018.

TOLÊDO, Talles José Bernardo et al. **Potencial energético do biogás produzido a partir de esterco bovino e bagaço da cana-de-açúcar no estado de Alagoas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Energia). Universidade Federal de Alagoas-UFAL, 2023.

TRACTZ, Gideã Taques et al. Uma alternativa sustentável: aplicação do resíduo do ácido 3, 5 dinitro salicílico em células solares. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 52909-52918, 2020.

TROCH, Thibault et al. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 21, 2017.

TU, Jie et al. Solid state fermentation by *Fomitopsis pinicola* improves physicochemical and functional properties of wheat bran and the bran-containing products. **Food Chemistry**, v. 328, p. 127046, 2020.

ULLAH, Inam et al. Purification, characterization and application of thermoalkaliphilic proteases from *Bacillus filamentosus*, *Lysinibacillus cresolivorans*, and *Bacillus subtilis*. **Research Square**. Doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-153220/v1>. 2021.

UZUNER, Sibel; CEKMECELIOGLU, Deniz. Enzymes in the beverage industry. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 29-43.

VAN BOEKEL, Martinus et al. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 9, p. 1215-1247, 2010.

VASCONCELOS, M. A. et al. Purification and primary structure of a novel mannospecific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

VEGA, Aracelly; FRANCO, Heriberto. Productividad y calidad de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* RN2 y *P. djamor* RN81 y RN82 cultivados sobre sustratos lignocelulósicos. **Información tecnológica**, v. 24, n. 1, p. 69-78, 2013.

VELEZ, Maria Elizabeth Vásconez et al. Production of bioactive compounds by the mycelial growth of *Pleurotus djamor* in whey powder enriched with selenium. **LWT**, v. 114, p. 108376, 2019.

VELIOGLU, Zulfiye; UREK, Raziye Ozturk. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 526-531, 2015.

VERMA, Vartika et al. Enzymes in Textile Industries. In: *Bioprospecting of Enzymes in Industry, Healthcare and Sustainable Environment*. **Springer, Singapore**, p.383-394. 2021.

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. In: *Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 11, p. 273-287, 2008.

VIEIRA, Matheus Maitan. **Produção e caracterização de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2020.

VILELA, Elvia Denise de Souza. **Análise da Produção de Celulases e Beta glycosidase produzidas por *Streptomyces* sp.** Mestrado em Biologia. Universidade Federal de Goiás. 2013.

VISHWANATHA, Kurutahalli S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, Sridevi Annapurna. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, p. 1849-1859, 2010.

WAHAB, Walaa A. Abdel; AHMED, Samia 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.

WALKER, Brian; LYNAS, J. F. Strategies for the inhibition of serine proteases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, p. 596-624, 2001.

WANG Z; ZHANG T; LONG L; DING S. Biotechnology for Biofuels Altering the linker in processive GH5 endoglucanase 1 modulates lignin binding and catalytic properties. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 332, p. 1–11, 2018.

WANG, Quanfu et al. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1926-1931, 2008.

WARNER, Alden H. **Proteases and protease inhibitors in *Artemia* and their role in the developmental process.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.

WOLF, K.; GILBERT, P. A. EDTA—Ethylenediaminetetraacetic acid. In: Detergents. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 1992. p. 243-259.

XIU, Y. et al. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 603-611, 2015.

XU, Jiaying et al. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted

microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresource technology**, v. 157, p. 166-173, 2014.

XU, Senzheng et al. Characterization of the flavor and nutritional value of coconut water vinegar based on metabolomics. **Food Chemistry**, v. 369, p. 130872, 2022.

YADAV, Ravi Prakash; PATEL, Ashok Kumar; JAGANNADHAM, M. V. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.: Purification and biochemical characterisation. **Food chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1296-1304, 2012.

YADAV, Santosh Kumar et al. Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 43, p. 8630-8640, 2011.

YANG, Doudou et al. Tea waste: an effective and economic substrate for oyster mushroom cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 2, p. 680-684, 2016.

YAVUZ, Sevgi et al. Production, purification, and characterization of metalloprotease from *Candida kefyr* 41 PSB. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, p. 106-113, 2017.

YENNAMALLI, Ragothaman M. et al. Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. **Biocombustíveis**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2013.

YOON, Li Wan et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YOUNES, Islem et al. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 94, p. 453-462, 2015.

ZANELATO, A. I. et al. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. i-1d3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.

ZÁRATE-SALAZAR, Jhonatan Rafael et al. Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. **SN applied Sciences**, v. 2, p. 1-10, 2020.

ZHANG, Boqin et al. Effects of three indigenous non-Saccharomyces yeasts and their pairwise combinations in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* on volatile compounds of Petit Manseng wines. **Food Chemistry**, v. 368, p. 130807, 2022.

ZHANG, Yi; HE, Shudong; SIMPSON, Benjamin K. Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current opinion in food science**, v. 19, p. 30-35, 2018.

ZHAO, Xiao et al. Purification and characterization of a new milk coagulation enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1. **European Food Research and Technology**, vol. 245, no. 11, p. 2447-2457, 2019.

ZHAO, Hua. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 25-50, 2016.

ZHAO, et al. Ping. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated *Sus scrofa* cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 116, p. 120-126, 2015.

ZHENG, Qinheng et al. SuFEx-enabled, agnostic discovery of covalent inhibitors of human neutrophil elastase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 38, p. 18808-18814, 2019.

ZHOU, Cheng et al. A novel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2018.

ZHOU, Chun-Hui et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 11, p. 5588-5617, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1: PATENTE SOBRE A ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE LEITE

Obtenção de um novo agente coagulante de leite produzido pelo fungo *Pleurotus djamor* PLO13 através de fermentação em estado sólido.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 022819 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 13

Nome: MONIZY DA COSTA SILVA

CPF: 08479074493

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Hélio de Castro Reis

Cidade: Coruripe

Estado: AL

CEP: 57230-000

País: BRASIL

Telefone: (82) 999 638938

Fax:

Email: monizy.silva@iqb.ufal.br

Inventor 2 de 13

Nome: HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA

CPF: 05704009611

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dom Antônio Brandão, 384

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57051-190

País: BRASIL

Telefone: (82) 996 041333

Fax:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Obtenção de um novo agente coagulante de leite produzido pelo fungo *Pleurotus djamor* PLO13 através de fermentação em estado sólido

Resumo: A presente patente de invenção foi desenvolvida para a obtenção de

ANEXO 2: ARTIGO SOBRE SERINO PROTEASE ELASTASE 2 símile

Produção, caracterização e aplicação de uma nova serina protease semelhante à elastase 2 de *Pleurotus djamor* PLO13

World Journal of Microbiology and Biotechnology - Receipt of Manuscript 'Production, characterization, and...'   Externa Caixa de entrada x

World Journal of Microbiology and Biotechnology <sameer.ahamed@springernature.com>
para mim +

ter., 27 de jun., 11:57   

 inglês + > português = Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Ref: Submission ID c980662e-7964-43a4-ba7b-e6d1360331db

Dear Dr Costa Silva,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Production, characterization, and application of a new elastase 2-like serine protease from *Pleurotus djamor* PLO13", which was submitted to World Journal of Microbiology and Biotechnology on 27 June 2023 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Editorial Assistant
World Journal of Microbiology and Biotechnology

 Responder

 Encaminhar

ANEXO 3: PATENTE SOBRE A ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DA LECTINA GABL (COLABORAÇÃO).

Identificação de uma nova lectina da casca de Genipa americana com potencial terapêutico contra células cancerígenas



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 020978 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 24464109000148
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins
Cidade: Maceió
Estado: AL
CEP: 57072-070
País: Brasil
Telefone: 82-3214-1004
Fax: 82-3214-1035
Email: niij@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Identificação de uma nova lectina da casca de Genipa americana com potencial terapêutico contra células cancerígenas
Resumo: Lectinas são proteínas com alta especificidade a carboidratos e diversas atividades biológicas, como a ação antitumoral, por apresentarem elevada afinidade pelos carboidratos presentes nestas células. A lectina isolada das cascas de Genipa americana (GaBL) apresentou alta especificidade para lactose e fetoína. Esse resultado levou ao desenvolvimento dessa pesquisa que buscou avaliar sua atividade antitumoral frente as linhagens de câncer de pele (A431), melanoma (B16) e carcinoma epinocelular de língua (SCC9). Estas células foram tratadas com GaBL para avaliar a viabilidade celular, seguido de ensaios de migração e invasão celular, identificação de alterações de membrana celular e reação em cadeia da polimerase em tempo real para caspase-3 e expressão de mRNA de proteínas relacionadas à transição epitelial-mesengimal (E-caderina, Col1A1). GaBL diminuiu a proliferação celular e reduziu a migração celular contra todas as cepas avaliadas e diminuiu significativamente a invasão de células SCC9. O processo de apoptose e transcrição da caspase-3 foi significativamente maior nas células B16 e SCC9 tratadas com lectina. GaBL induziu upregulation de E-caderina e supressão de Col1A1 em todas as cepas testadas. Tais resultados mostram que o efeito antitumoral do GaBL indica que esta biomolécula pode ter potencial para tratamento futuro do câncer.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: RICARDO BEZERRA COSTA
CPF: 34576467832
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Fiscal: Outras ocupações não especificadas anteriormente
Endereço: Rua C
Cidade: Coruripe
Estado: AL
CEP: 57230-000
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: ricardobcosta10@gmail.com

ANEXO 4: CAPÍTULO NO LIVRO “A PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:Desafios atuais e perspectivas futuras ” (COLABORAÇÃO)

Aplicações biotecnológicas da enzima endoglucanase microbiana



Data de aceite: 21/09/2021

Marta Maria Oliveira dos Santos Gomes

Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/5925280745485828>

Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos

Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/8548200518407877>

Monizy da Costa Silva

Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Maceió – Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/0669155596988540>

Cledson Barros de Souza

Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/8206252182609269>

Alexsandra Nascimento Ferreira

Universidade Federal de Alagoas, Programa de

Hugo Juarez Vieira Pereira

Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/3682743268696668>

RESUMO: As endoglucanases pertencem ao grupo das celulasas, enzimas pertencentes a classe das hidrolases. Essas enzimas estão diretamente envolvidas na degradação da parede celular vegetal, e possuem uma vasta aplicação em diversos segmentos industriais. Neste contexto, o presente trabalho objetivou relatar os possíveis meios de obtenção microbianos, características e as principais aplicações nos segmentos industriais. A FES tem demonstrado ser o meio de obtenção mais promissor devido ao reduzido custo e o aproveitamento de biomassas lignocelulósica. A busca por enzimas industriais de origem microbiana tem aumentado graças às aplicações em uma ampla variedade de processos, maior estabilidade que as enzimas de origem animal e de plantas e facilidade em obtenção. As aplicações biotecnológicas utilizando catalisadores biológicos têm sido

ANEXO 5: CAPITULO NO LIVRO “PESQUISA E SOCIEDADE: OS DESAFIOS E AS CONTRIBUIÇÕES DA CIÊNCIA” (COLABORAÇÃO)

Investigação da obtenção, purificação e aplicação de lipases microbianas

Capítulo 9

INVESTIGAÇÃO DA OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

INVESTIGATION OF OBTAINING, PURIFYING AND APPLYING MICROBIAL LIPASES

Alexsandra Nascimento Ferreira¹

Tatielle Pereira Silva²

Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos³

Cledson Barros de Souza⁴

Marta Maria Oliveira dos Santos⁵

Monizy da Costa Silva⁶

Hugo Juarez Vieira Pereira⁷

RESUMO: Lipases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos. Em meios aquorrestritos, podem catalisar reações reversas de síntese como esterificação e transesterificação. Também podem ser classificadas como regio e enantiosseletivas. Essas enzimas estão entre as mais comercializadas nos processos industriais e entre os biocatalisadores mais valorizados no campo da biotecnologia. As lipases de origem microbiana são as de maior interesse para as aplicações biotecnológicas e industriais, devido a suas características bioquímicas e capacidade funcional em condições extremas. Nessa revisão abordamos as características funcionais e estruturais das lipases, as fontes microbianas e sistemas de produção, as rotas de purificação de lipases de diferentes micro-organismos e as aplicações que estão sendo desenvolvidas com essas enzimas.

Palavras-chave: Lipase. Micro-organismos. Bioprocessos. Purificação. Aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT: Lipases are enzymes that catalyze hydrolysis reactions of triacylglycerol to glycerol

ANEXO 6: ARTIGO SOBRE ENDOGLUCANASE (COLABORAÇÃO)

Otimização da sacarificação enzimática de resíduos industriais utilizando uma endoglucanase termoestável e halotolerante através de planejamento experimental de Box-Behnken

Research Article

Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design

Marta Maria Oliveira dos Santos Gomes, Izadora Santos Nicodemos, Monizy da Costa Silva, Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos, Floriatan Santos Costa, Marcelo Franco & ...show all

Published online: 18 Apr 2023

Cite this article: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>

 Check for updates

ANEXO 7: ARTIGO SOBRE PROTEASE (COLABORAÇÃO)

Produção, caracterização e aplicação de uma nova protease semelhante à quimotripsina de *Pycnopus sanguineus*

Research Article

Production, characterization, and application of a new chymotrypsin-like protease from *Pycnopus sanguineus*

Alexsandra Nascimento Ferreira, Antônio Thomás Da Silva, Josiel Santos do Nascimento, Cledson Barros de Souza, Monizy da Costa Silva, Luciano Aparecido Meireles Grillo, ...show all

Received 09 Jan 2023; Accepted 23 Mar 2023; Published online: 05 Apr 2023

Cite this article: <https://doi.org/10.1080/10242422.2023.2196362>

 Check for updates