

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**

JACIARA DOS SANTOS SANTANA

**DEGRADAÇÃO DA FARINHA DE PENAS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO ISOLADOS FÚNGICOS DA
RESTINGA DE GUAIBIM, BA**

Cruz das Almas

2020

JACIARA DOS SANTOS SANTANA

**DEGRADAÇÃO DA FARINHA DE PENAS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO ISOLADOS FÚNGICOS DA
RESTINGA DE GUAIBIM, BA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado do curso de Graduação em Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Luciana Cazetta

Co-orientador: Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach

Cruz das Almas

Novembro-2020

JACIARA DOS SANTOS SANTANA

**DEGRADAÇÃO DA FARINHA DE PENAS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO ISOLADOS FÚNGICOS DA
RESTINGA DE GUAIBIM, BA**

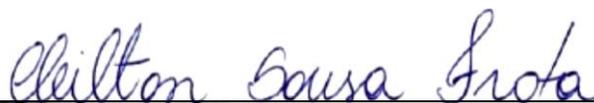
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO**



Profa. Dra. Marcia Luciana Cazetta

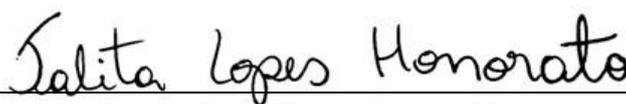
orientadora

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Prof. Ms. Cleilton Sousa Frota

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Profa. Dra. Talita Lopes Honorato

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Cruz das Almas

Novembro-2020

*Aos meus pais, Angela Maria e Félix Santana,
por todo apoio, incentivo e esforço a mim
dedicados.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as experiências que passei, e por todas as conquistas que consegui, pois nos momentos mais difíceis a minha crença foi o meu refúgio e força para que eu pudesse seguir em frente.

Aos meus pais Félix Santana (em memória) e Angela Maria dos Santos, que sempre se esforçaram para me apoiar; para que eu tentasse ter um futuro melhor que o deles. Aos meus irmãos Angélica (Baby) e Júnior (Dum), por ficarem ao meu lado no momento mais difícil de minha vida, e por me incentivarem a continuar.

Sou grata pelas amizades que formei após o ingresso na UFRB, em especial Caroline, Manoela e Marta que sempre estiveram apoiando e incentivando umas às outras durante o curso. À Gabriel, amigo e companheiro de experimentos no laboratório, que sempre se aventurava comigo nas idas ao laboratório aos finais de semana. A Cleilton, Robert e Rafael, que me ajudaram nas análises estatísticas; a Samantha, por me ajudar no início do estágio, me ensinando tudo que eu precisava para desenvolver meus experimentos. Às minhas amigas Carol, Niele e Paula, que conviveram por mais de dois anos na mesma casa comigo e, me acompanhavam para analisar meus experimentos quando eu tinha que ir para o laboratório durante à noite aos finais de semana.

Quero agradecer a minha orientadora Marcia Luciana Cazetta pela paciência, incentivo, carinho e compreensão que ela sempre teve comigo. Aos meus colegas que fazem parte do Laboratório de Bioquímica, pelo companheirismo e animação nos dias de partilha do laboratório. Ao professor Phellippe Marbach, que cedeu alguns isolados fúngicos da coleção do Labev para que eu pudesse desenvolver meus experimentos, e pela sua co-orientação no meu trabalho. Ao professor Thomas V. Gloaguen, que me orientou em um programa de extensão universitária, contribuindo positivamente para a expansão do meu conhecimento.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por todo suporte técnico. Ao corpo docente da UFRB, principalmente aqueles que fizeram parte do minha formação contribuindo de alguma forma para o meu aprendizado.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

SANTANA, Jaciara dos Santos. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, julho de 2020. **Degradação da farinha de penas da indústria avícola por fermentação submersa utilizando isolados fúngicos da restinga de Guaibim, BA.** Orientadora: Marcia Luciana Cazetta. Co-orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach

Os resíduos e subprodutos da indústria avícola têm sido destinados para diversas aplicações, como a produção de rações, adubação orgânica, produção de biodiesel, entre outros. Entretanto, o alto teor de queratina presente em alguns desses subprodutos, como na farinha de penas, torna esse material difícil de ser digerido. Objetivou-se com este trabalho avaliar os principais fatores que influenciam na degradação da farinha de penas por fermentação submersa utilizando fungos filamentosos. Os isolados foram cultivados durante um período de 7 (sete) dias sob temperatura de 25 °C, utilizando como inóculo discos de cultura de 1,0 cm de diâmetro em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 0,6 g de farinha de penas e 60 mL de solução mineral. Em seguida, os ensaios foram autoclavados e realizou-se uma filtração simples para a extração do caldo, com papel de filtro previamente seco, e secagem da biomassa em estufa a 65 °C por 24 horas e, posteriormente, pesagem. A taxa de degradação foi determinada através da diferença entre a massa dos filtros vazios e com a biomassa seca. Para se determinar as melhores condições para degradação da farinha de penas foram estudados os fatores agitação e temperatura, utilizando o método one-factor-at-a-time, onde os fatores escolhidos foram variados um de cada vez. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. De acordo com a análise dos resultados não houve diferença significativa entre as agitações, porém, o isolado *Metarhizium* IS15 apresentou taxa de degradação cerca de 50% maior que o isolado *P. guaibinense* IS25.2. A temperatura na qual os isolados apresentaram maior taxa de degradação foi a de 30 °C, sendo cerca de 80% para o *Metarhizium* IS15, e 42% para o *P. guaibinense* IS25.2. Após o período fermentativo, observou-se um aumento no pH dos cultivos fermentados, de 6,5 para cerca de 8,0. O isolado *Metarhizium* IS15 foi o que apresentou melhor potencial para a degradação da farinha de penas, e a temperatura foi o principal fator que interferiu na atividade dos microrganismos.

Palavras-chave: Biotecnologia, processos fermentativos, substratos queratinosos.

ABSTRACT

SANTANA, Jaciara dos Santos. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, julho de 2020. **Degradation of the poultry industry feather meal by submerged fermentation using fungal isolates from Guaibim restinga, BA.** Adviser: Marcia Luciana Cazetta. Co-adviser: Phellippe Arthur Santos Marbach

The poultry industry residues and by-products have been solutions for several applications, such as feed production, organic fertilization, biodiesel production, among others. However, the high content of keratin present in a few by-products, such as feather meal, makes this material difficult to digest. The objective of this work was to evaluate the main factors that influence the degradation of feather meal by submerged fermentation using filamentous fungi. The isolates were cultured for a period of 7 days at a temperature of 25 °C, using as inoculum 1.0 cm diameter culture discs in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 0.6 g of feather meal and 60 ml of solution mineral. Then, the tests were autoclaved and a simple filtration was performed to extract the juice with filter paper previously, drying the biomass in an oven at 65 ° C for 24 hours and, later, weighing. The rate of degradation was determined by the difference between the mass of the empty filters and the dry biomass. In order to determine the best conditions for degradation of feather meal, the factors of agitation and temperature were studied, using the one-factor-at-a-time method, where the chosen factors were varied one at a time. All tests were performed in triplicate. According to the analysis of the results there was no significant difference between the agitations, however, the isolate *Metarhizium* IS15 presented a degradation rate about 50% higher than the isolate *P. guaibinense* IS25.2. The temperature at which the isolates showed the highest rate of degradation was 30 ° C, about 80% for *Metarhizium* IS15, and 42% for *P. guaibinense* IS25.2. After the fermentation period, an increase in the pH of the fermented crops was observed, changing from 6.5 to about 8.0. O isolado *Metarhizium* IS15 foi o que apresentou melhor potencial para a degradação da farinha de penas, e a temperatura foi o principal fator que interferiu na atividade dos microrganismos.

Key-words: Biotechnology, fermentative processes, keratinous substrates.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Isolados Fúngicos.....	10
2.2. Resíduos da Indústria Avícola.....	12
2.2.1. Vísceras	13
2.2.2. Penas.....	14
2.2.3. Farinha de penas	15
2.3. Queratina.....	16
2.4. Microrganismos produtores de enzimas queratinolíticas e suas aplicações	18
2.5. Fatores que influenciam na degradação e produção enzimática	20
2.5.1. Agitação.....	20
2.5.2. Temperatura e pH.....	20
2.5.3. Tempo de cultivo	22
2.5.4. Concentração do inóculo	22
2.5.5. Tipo de substrato	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Local de realização das atividades do trabalho	24
4.2. Microrganismos	24
4.3. Avaliação da quantidade de esporos por disco retirado da cultura	24

4.4. Obtenção da farinha de penas	25
4.5. Condições de cultivo	25
4.6. Análise dos dados.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. ATIVIDADES PLANEJADAS E NÃO EXECUTADAS	31
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos, uni ou pluricelulares, que estão presentes nos mais diversificados habitats/ substratos onde se encontra matéria orgânica em decomposição (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; OLIVEIRA, 2014). São seres heterótrofos, com parede celular composta por quitina e que realizam reprodução assexuada ou sexuada (MALAJOVICH, 2012).

O conhecimento sobre fungos foi um avanço muito importante na biotecnologia, pois esses organismos passaram a ser utilizados em diversos tipos de aplicações biológicas, como por exemplo, em processos fermentativos na produção de enzimas, polissacarídeos, antibióticos, entre outros (PEREIRA; OLIVEIRA, 2016; SOUZA et al., 2018).

Alguns tipos de processos fermentativos são utilizados para produzir substâncias fúngicas de interesse comercial e biotecnológico: fermentação submersa (FS), fermentação semi-sólida (FSS) e fermentação em estado sólido (FES). A fermentação sólida consiste em cultivar microrganismos em substratos sólidos que são umedecidos somente para promover o crescimento e o metabolismo microbiano. Já a fermentação submersa utiliza grande quantidade de água para que o substrato utilizado seja solubilizado. Na fermentação semi-sólida é utilizado um substrato poroso, há utilização de uma maior quantidade de água, quando comparada à FES (NAVEENAL et al., 2004).

A fermentação submersa é muito utilizada, preferencialmente pelas indústrias, devido à possibilidade de controlar melhor alguns parâmetros físicos e químicos, como a temperatura, níveis de oxigênio e pH, durante a realização deste processo. A produção de determinadas enzimas se deve ao fato de que, os fungos filamentosos quando em FS produzem alguns grânulos, tornando assim o processo mais vantajoso (GIBBS; SEVIOUR; SCHIMD, 2000; HANSEN et al., 2015; ABDULLAH et al., 2019).

Os fungos podem se adaptar bem ao processo de fermentação submersa, principalmente devido aos ajustes nas condições físico-químicas do cultivo, e diversos tipos de substratos podem ser utilizados como meio de cultivo. Dentre estes podem ser incluídos os substratos de origem agroindustrial como bagaços ou cascas de frutas, bem como suas fibras e sementes, geralmente provenientes do processamento para a produção de sucos ou polpas (HANSEN et al., 2015; ANDRADE et al. 2018).

O bagaço, melaço e até a vinhaça da cana-de-açúcar, oriundos do processamento para a produção de açúcar ou etanol, costumam ser muito utilizados em processos fermentativos (AHMED et al., 2018; CAMPANHOL et al., 2019; REIS et al., 2020)

Os subprodutos da indústria avícola mais utilizados são as farinhas de penas e farinha de vísceras. A primeira é obtida a partir de penas limpas e trituradas; já a segunda é oriunda da trituração das vísceras, pés e cabeça das aves após o abate, e ambas as farinhas são utilizadas na fabricação de ração. Entretanto, a farinha de penas possui uma baixa digestibilidade, ou seja, os animais que se alimentam de rações compostas por este tipo de subproduto absorvem poucos nutrientes, quando comparada à rações oriundas das farinhas de vísceras e de peixes (BELLAYER, 2005; DAROIT, 2011).

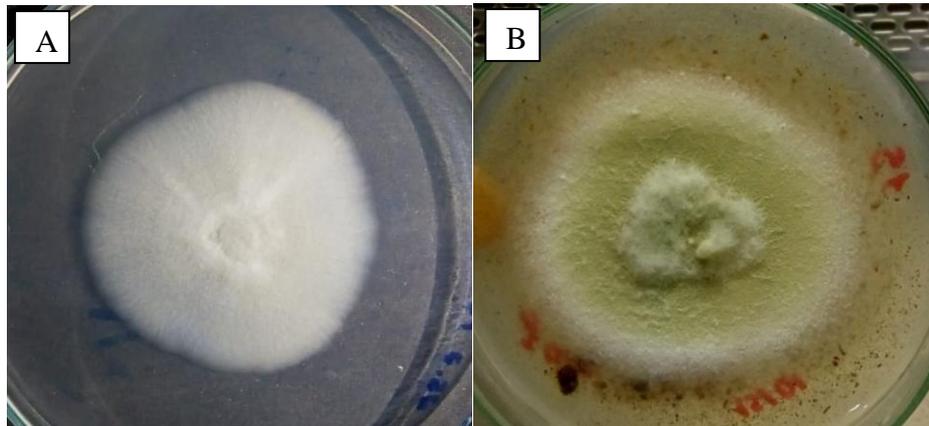
Os fungos quando são utilizados em processos fermentativos, tendo a farinha de penas como substrato, podem promover o aumento da disponibilidade de proteínas e outras biomoléculas, mas com o mesmo, as fibras podem chegar a ser reduzidas (BELEWU; ASAFA; OGUNLEKE, 2008; EYNG et al., 2010). Assim, hipotetizamos que com a realização do processo de fermentação submersa, utilizando fungos filamentosos, pode-se obter uma elevada taxa de degradação de subprodutos agroindustriais recalcitrantes e aumentar a disponibilidade das proteínas e aminoácidos desse material.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Isolados Fúngicos

Os isolados *Penicillium* sp. IS25.2 e *Metarhizium* sp. IS15 (Figura 1) são espécies novas descritas recentemente. O isolado *Penicillium* sp. IS25.2 é pertencente à espécie *Penicillium guaibinense* e, o fungo *Metarhizium* sp. IS15 é provavelmente uma nova espécie, pois forma um clado distinto de outras espécies analisadas, sendo este, próximo à espécie *Metarhizium anisopliae* (BOAVENTURA, 2019).

Figura 1 - Isolados fúngicos: A) *Penicillium guaibinense* IS25.2; B) *Metarhizium* sp. IS15



Fonte: Autoria própria.

Penicillium é um gênero fúngico produtor de pectinase, enzima responsável pela degradação da parede celular de plantas, além disso pode apresentar enzimas relacionadas com a de degradação de hidrocarbonetos presentes no petróleo (CHINCHILLA; ROJAS, 2017; AGBOR, ANTAI; EKPO, 2018). Este gênero também já foi utilizado em ensaios fermentativos visando a produção de enzimas, como a queratinase, estudando a temperatura e o pH como parâmetros influenciadores (EL-GENDY, 2009).

Por serem produtoras de uma proteína antifúngica muitas espécies de *Penicillium* são utilizadas na indústria alimentícia, como agentes de biocontrole, pois estas atuam na inibição ou retardo do crescimento de outros microrganismos que apresentam ação toxigênica ao organismo humano (DELGADO et al., 2019). Devido ao seu potencial como produtor de substâncias antimicrobianas, muitos estudos foram desenvolvidos com este gênero fúngico, sendo estes utilizados em muitas aplicações biológicas, como na produção de medicamentos (YANG et al, 2017). É o caso da penicilina, descoberta por Fleming na década de 1920, sendo o primeiro antibiótico produzido no mundo, como relatado em alguns artigos de revisão (OZCENGIZ; DEMAİN, 2013; ALHARBI et al., 2014; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019)

O gênero *Metarhizium* é muito utilizado como agente de biocontrole devido à produção de exoenzimas que são responsáveis pela penetração no tegumento do hospedeiro, como enzimas amilolíticas e proteolíticas (SILVA et al., 2018). Inclusive, muitas espécies de *Metarhizium* podem realizar associações com raízes de plantas, como o milho e feijão (MOONJELY; BIDOCHKA, 2019).

Várias espécies de *Metarhizium* são hospedeiras de insetos, sendo por isso, muito empregadas no controle biológico de pragas. São fungos que habitam solos, ambientes

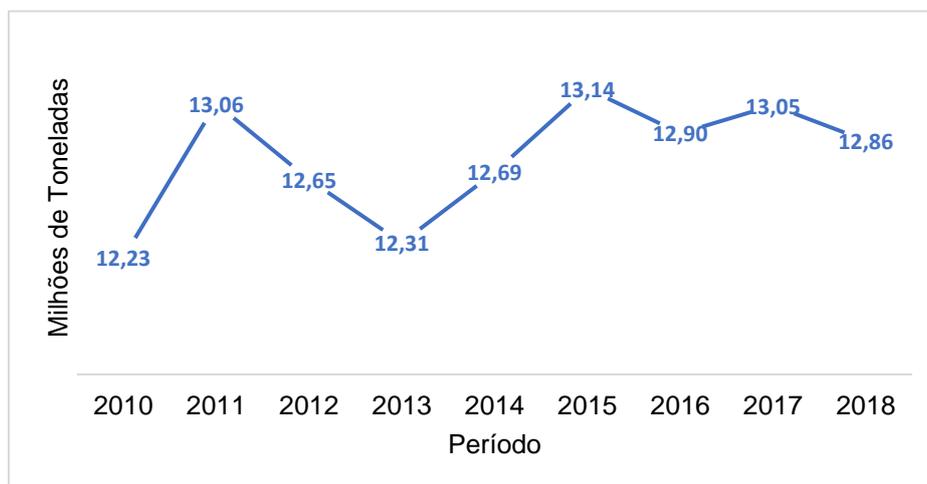
florestais e matéria orgânica em decomposição. Em um estudo realizado em uma província da China foram isolados 173 espécies entomopatogênicas de *Metarhizium*, mostrando a grande diversidade desse microrganismo no solo. Além disso, as proteases produzidas por esses fungos ajudam na degradação de cascas de ovos de nematoides (MASOUDI et al., 2020; THONGKAEWYUAN; CHAIRIN, 2018), sendo muito úteis na eliminação desse tipo de agente fitopatogênico.

Quando testados em processo fermentativo utilizando substratos oriundos de resíduos agroindustriais, como as penas, os isolados *Metarhizium* sp. IS15 e *Penicillium guaibinense* IS25.2 demonstraram taxa significativas na degradação destes compostos. Diante do aparato enzimático descrito para estes fungos, observa-se que eles apresentam elevado potencial para aplicação na degradação de subprodutos agroindustriais proteicos (BOAVENTURA, 2019).

2.2. Resíduos da Indústria Avícola

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Paraná foi o estado brasileiro que mais exportou carne de frango em 2018, totalizando 37,51% das exportações realizadas no país. Na última década a produção de frango variou cerca de 1,11% ao ano, sendo que de 2016 a 2018 o aumento na produção foi quase nulo (Figura 2).

Figura 2 - Produção brasileira de carne de frango (milhões de toneladas)

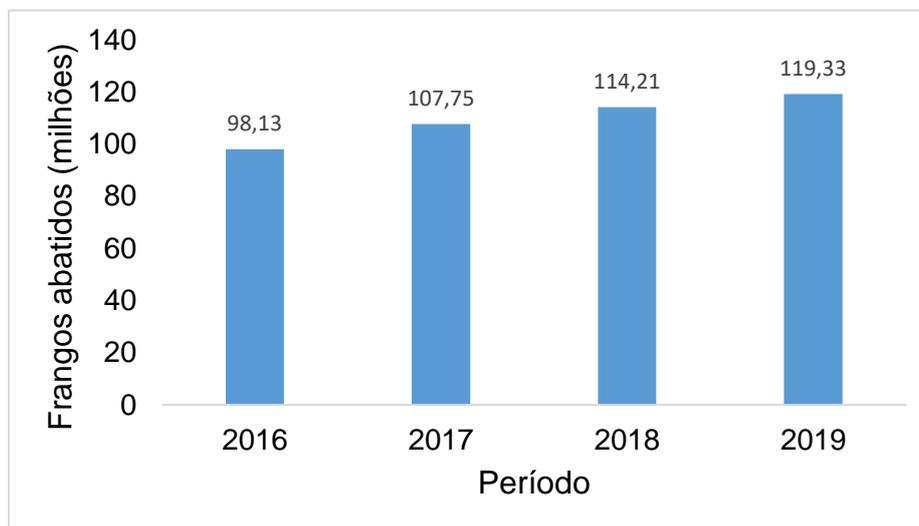


Fonte: Adaptado de ABPA (2018).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019) o número de abate de frangos na Bahia tem aumentado nos últimos quatro anos. Em 2019 o estado baiano realizou cerca de 119,33 milhões de abates de frangos, sendo 21,60% maior que

em 2016 e 4,48% maior que em 2018 (Figura 3). A Bahia ocupa a nona posição no ranking nacional de produção e abate de frangos, sendo que, a região do Recôncavo se destaca por sua grande produtividade (IBGE, 2019).

Figura 3 - Número de abate de frangos na Bahia (milhões)



Fonte: IBGE (2019).

Entretanto, em nível nacional, as exportações de carne de frango chegaram a um total de 348,4 mil toneladas em fevereiro de 2020, sendo cerca de 10% maior quando comparado ao mesmo período de 2019 (ABPA, 2020).

A produção avícola no Brasil aumenta cada vez mais, sendo um grande sistema de produção de resíduos. Com o abate das aves o que sobra são suas penas, sangue e vísceras, que por apresentarem alto teor de proteínas e energia, podem ser utilizados para a produção de farinhas, as quais geralmente são empregadas na composição de rações para a nutrição de animais (HOLANDA et al., 2009; ABPA, 2020). Entretanto, rações compostas por farinhas de penas são consideradas de baixa qualidade nutricional, por causa da baixa digestibilidade e absorção das proteínas presentes nesse sub-produto.

2.2.1. Vísceras

As vísceras são restos animais que não são consumidos por humanos, tais como intestinos e outros órgãos, e que geralmente são processadas para produzir a farinha de vísceras, e é destinada à fabricação de rações para diferentes tipos de animais, incluindo as próprias aves. A farinha de vísceras (FV) é produzida por meio de um processo de cocção e trituração das vísceras de aves, incluindo outras partes do corpo como os pés e a cabeça. Para

a obtenção de um subproduto sem adulterações não pode ser adicionado outros elementos como as penas (BELLAVÉR, 2005).

Alguns parâmetros físicos e químicos observados na composição da farinha de vísceras são a umidade, proteína, gordura e energia bruta. Segundo Sales, Furuya e Romanelli (2012) a farinha de vísceras de avestruz apresenta 5,81% de umidade, 71,08% de proteína, 16,54 % de gordura, e 5,115 kcal/kg⁻¹ de energia bruta. Os valores de digestibilidade da farinha de vísceras foram relatados pelos mesmos autores, sendo que a energia bruta apresentou valor de digestibilidade igual a 3,721,80 kcal/kg⁻¹, e a proteína de 64,26%.

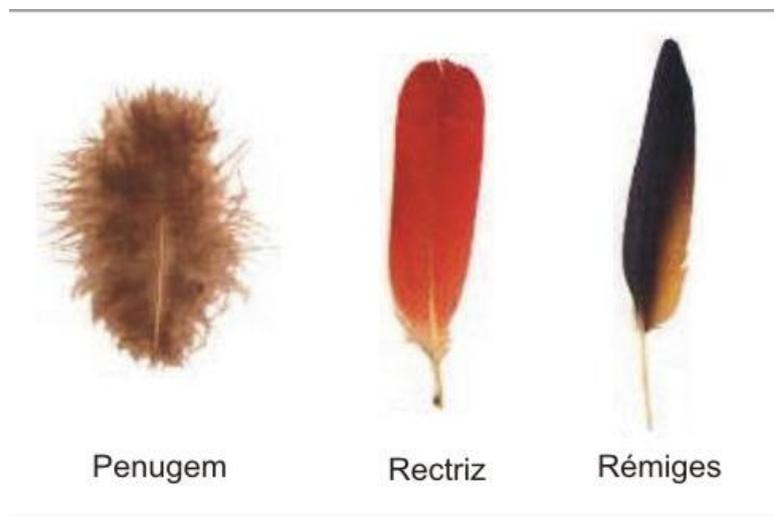
Segundo Singnor et al. (2008), rações contendo até 5% de farinha de vísceras melhora o desenvolvimento corporal de peixes, atuando no seu comprimento e quantidade de proteína da carcaça. O óleo de vísceras é outro tipo de subproduto que pode ser utilizado na formulação de rações. Sanches, Pamplin e Hayashi (2020) realizaram estudos com inserção do óleo de vísceras em rações de alevinos, e demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na massa corporal dos alevinos, quando comparados os tratamentos com os controles.

De acordo com Bolu e Adakeja (2008) o ganho de peso em frangos de corte está inversamente relacionado com a quantidade de farinha de vísceras inseridas na dieta, pois esta possui uma grande quantidade de gordura e um alto nível de energia, e isso faz com que estas aves atinjam à saciedade de forma mais rápida.

2.2.2. Penas

As penas são estruturas que promovem o revestimento do corpo das aves, atuando na proteção e vôo para algumas espécies. A plumagem das aves varia durante seu período de vida, pois muitas passam pelo processo de muda de penas mais finas, como a penugem, para penas mais resistentes, como as rêmiges (penas presentes nas asas) e as rectrizes que são as penas da cauda (Figura 4) (AZEVEDO JÚNIOR; DIAS FILHO; LARRAZÁBAL, 2001).

Figura 4 - Tipos de penas de aves



Fonte: Site Trinca-ferro verdadeiro (2020).

Este tipo de resíduo é gerado principalmente após o abate de aves de corte, ou estão presentes na cama aviária juntamente com resto de alimento e fragmentos de cascas de ovos. As penas podem ser utilizadas, quando sozinhas, para a produção de farinhas destinadas à formulação de rações, ou quando presente na cama aviária, podem ser utilizadas como resíduos para compostagem (SIVAKUMAR; RAVEENDRAN, 2015; SUNADA et al., 2015).

2.2.3. Farinha de penas

A farinha de penas hidrolisada é obtida através do cozimento de penas limpas, as quais são submetidas a alta pressão e temperatura durante esse processo. Em geral, a farinha de penas é vista como um produto recalcitrante (de baixa digestibilidade), pois, devido à grande quantidade de queratina existente em sua composição e ao seu arranjo molecular, esse material se torna mais resistente. Por serem submetidas à altas temperaturas ocorre a perda de alguns aminoácidos, reduzindo o teor proteico (DAROIT, 2011).

Os aminoácidos que aparecem em maior quantidade na composição da farinha de penas são: ácido glutâmico + glutamina, prolina, serina, leucina e glicina, respectivamente. Com base na composição química este subproduto apresenta cerca de 84,2% de proteína bruta, 10,4% de gordura bruta, energia bruta igual a 23,2 (kJ/g⁻¹), por isso, vem sendo utilizado por muitos microrganismos como única fonte de carbono e nitrogênio (CAMPOS et al., 2017).

De acordo com Graeff e Mondardo (2006) a farinha de penas hidrolisada pode ser utilizada na alimentação de carpa, devido à sua capacidade nutricional, em substituição de até 66% à farinha de peixe, e esse processo de substituição não afeta o desempenho do animal quanto ao seu crescimento e desenvolvimento metabólico. Entretanto, a inserção da farinha de penas não-hidrolisada pode causar um decréscimo no ganho de peso de codornas, conforme relatado por Diana et al. (2020).

Pan et al. (2016) relatam em seu trabalho que, a degradação enzimática da farinha de penas promove um aumento da digestibilidade de proteína bruta e aminoácidos, promovendo uma maior disponibilidade de nutrientes. Eles ainda relatam que a utilização deste subproduto em rações para leitões, em fase de crescimento, pode melhorar o desempenho e condições morfológicas intestinais.

A farinha de penas também pode ser utilizada para a produção de biocombustível, pois em sua composição estão presentes diversos tipos de ácidos graxos, principalmente o ácido oleico, palmítico, linolênico e esteárico. Essa produção ocorre através do processo de extração de gordura presente na farinha de penas, sendo posteriormente convertido em biodiesel (GAMEIRO et al., 2015; PURANDARADAS et al., 2018).

2.3. Queratina

A principal proteína presente nos resíduos avícolas, penas e farinha de penas, é a queratina. A queratina faz parte do grupo das proteínas fibrosas, caracterizada por sua insolubilidade e capacidade de promover revestimento da epiderme de alguns animais vertebrados, fazendo parte da constituição de penas, unhas, cabelos, bicos, entre outros (BLYSKAL, 2009; DIPANKAR; BHAN, 2019). Esta proteína possui pontes dissulfeto intermoleculares ou intramoleculares e, de acordo com o arranjo tridimensional de suas fibras, a queratina pode apresentar conformação rígida ou persistente (MOORE et al., 2006).

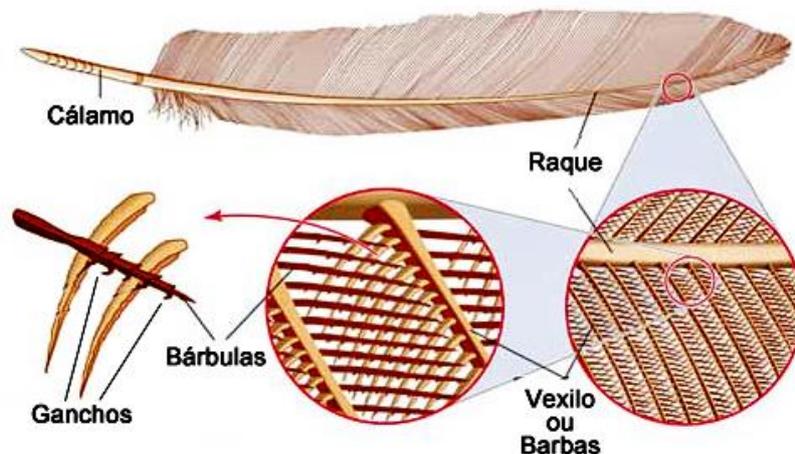
Existem 2 tipos de queratinas (Figura 5), a alfa-queratina, geralmente formada quando duas ou mais cadeias em formato alfa-hélice que se associam de forma lateral originando fibras alongadas. Os aminoácidos hidrofóbicos presentes em suas cadeias são os responsáveis por sua característica insolúvel, sendo que os principais são cisteína, alanina, glicina e serina. A beta-queratina é formada por agrupamentos polipeptídicos com estrutura de folha beta-pregueada. Suas cadeias ficam bem próximas devido ao tamanho pequeno da cadeia lateral de aminoácidos presentes em sua estrutura (NELSON; COX, 2014).

2.4. Microrganismos produtores de enzimas queratinolíticas e suas aplicações

Muitos microrganismos podem ser utilizados como produtores de queratinases, dentre eles estão as bactérias e fungos, sendo estas enzimas produzidas por indução de substrato ou não. Estudos realizados com *Bacillus* sp. demonstram que estes têm alto potencial para degradar penas, e que estas podem ser utilizadas em cultivos fermentativos como única fonte de carbono, nitrogênio e outros compostos essenciais para a atividade metabólica microbiana. Este gênero se mostra bastante eficiente, pois apresentou produção de queratinases e outras proteases em apenas dois dias de cultivo (DAROINT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009; DAROINT, 2011).

A Figura 6 descreve a estrutura das penas e alguns microrganismos, como por exemplo, *Klebsiella oxytoca* degradam com mais facilidade as bárbulas, já outros como, *Bacillus aerius*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* conseguem realizar a degradação completa das penas (BHARI et al., 2018). Segundo Santha Kalaikumari et al. (2018) os aminoácidos que aparecem em maiores concentrações após a hidrólise das penas são: cisteína, fenilalanina, glutamato e glicina, respectivamente.

Figura 6 - Estrutura das penas



Fonte: <http://www.ornithos.com.br/> (2020).

A produção de dissulfeto redutase auxilia na hidrólise da queratina, e microrganismos como bactérias Gram-negativas do gênero *Bacillus* podem atuar na produção desta enzima, promovendo a hidrólise de pontes dissulfeto que estão presentes na estrutura molecular da queratina (DAROINT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009).

A bactéria *Amycolatopsis* sp. MBRL 40 é uma cepa queratinolítica que pode ser utilizada tanto como biocontrole quanto biofertilizante, pois, durante o processo de fermentação (utilizando penas hidrolisadas como um dos substratos) ocorre a produção de

amônia, que atua como agente antifúngico, e a hidrólise das penas pode promover a produção do ácido indolacético (AIA) que estimula a germinação/crescimento de plantas, sendo o caldo fermentado utilizado para a imersão de sementes e o resíduo filtrado para tratamento de solo (TAMREIHAO et al., 2017). A produção de AIA por *Bacillus licheniformis* ASU também pode ser observada, apresentando alto potencial de uso como biofertilizante (NAFADY et al., 2018).

Muitos fungos filamentosos apresentam potencial de degradação de resíduos queratinolíticos e/ou produção de queratinases. Dentre eles podemos citar: *Trichophyton* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Microsporium* sp., *Phytophthora* sp., *Chrysosporium* sp. (CĂLIN et al., 2017). *Aspergillus niger* (OLIVEIRA; SOUZA; CASTRO, 2019); *Trichoderma harzianum* HZN12 (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018), além de *Aphanoascus keratinophilus* e *Chrysosporium tropicum* (BOHACZ et al., 2020).

O gênero *Aspergillus* é muito utilizado para a produção de queratinases. Suas enzimas queratinolíticas podem ser utilizadas em processos de bioconversão de substratos recalcitrantes, como as penas, em subprodutos que atuam como suplemento em dieta animal, pois ocorre um aumento no teor de proteínas e aminoácidos deste composto (SIVAKUMAR; RAVEENDRAN, 2015; OLIVEIRA; SOUZA; CASTRO, 2019).

Muitos fungos do gênero *Paecilomyces* foram estudados na degradação de escamas de peixes, também ricas em queratina, e apresentaram grande potencial de bioconversão deste substrato. O estudo relata que este tipo de substrato pode ser utilizado como meio de isolamento de enzimas secretadas por estes microrganismos durante o processo fermentativo (CREPALDI et al., 2018).

As enzimas são biocatalizadores mais utilizados nas indústrias e também em aplicações biomédicas. Estas são bastante atraentes às indústrias por possuírem uma ação eficiente e seletiva (BAPTISTA et al., 2012). A produção de enzimas é uma característica muito importante de microrganismos como os fungos, pois são substâncias envolvidas em muitos processos bioquímicos, como por exemplo na decomposição de moléculas complexas em unidades menores (TAUK, 1990; OLIVEIRA; MULLER; SEGATO, 2004; SOARES et al. 2010).

As enzimas são responsáveis por tornar cada vez mais eficiente a ação de um determinado microrganismo. Muitas delas estão envolvidas em processos de degradação, como da parede celular de plantas, as pectinases, ou mesmo as proteases, que ajudam na penetração do fungo no tecido do hospedeiro (AGBOR; ANTAI; EKPO, 2018; SOUZA et al. 2018). As proteases são um grupo de enzimas capazes de degradar proteínas. Cada protease

pode apresentar uma condição ótima de temperatura, pH e concentração de substrato, assim como as demais enzimas (WALK et al., 2019).

2.5. Fatores que influenciam na degradação e produção enzimática

2.5.1. Agitação

A agitação é um fator importante, pois auxilia na distribuição e homogeneização de nutrientes e oxigênio no meio de cultivo (WANG et al., 2018). Estudos realizados recentemente, para a degradação de substratos queratinolíticos e produção de queratinase, têm utilizado faixas de agitações entre 100 e 200 rpm (Tabela 1), variando entre os tipos de microrganismos. Agitações acima e abaixo da ideal pode reduzir a taxa de degradação de substratos queratinolíticos pelos microrganismos, como descrito para bactérias do gênero *Bacillus* (SINGH et al., 2017).

Alguns fungos apresentam maior atividade queratinolítica em agitações mais baixas, em torno de 100 rpm, como o *Microsporum* sp., (CĂLIN et al., 2017) e 120 rpm *Aspergillus sulphureus* e *Trichoderma aureoviride* (SOUSA et al., 2015); outros como *Paecilomyce farinosus* e *Fusarium* sp. apresentam maior produção de enzima queratinolítica em agitação de 180 rpm (SOUSA, 2008). Já a espécie *Purpureocillium lilacinum* degrada bem cabelo humano em agitação de 200 rpm (CAVELLO et al., 2013).

2.5.2. Temperatura e pH

A temperatura e o pH são variáveis que influenciam diretamente no metabolismo do microrganismo, podendo interferir no crescimento, atividade enzimática e produção de metabólitos secundários (CAMPOS et al., 2010; ABDEL-FATTAH et al., 2018). Microrganismos como os fungos apresentam melhor atividade enzimática ou capacidade de degradação na faixa mesófila de temperatura, entre 25 °C e 30 °C (Tabela 1). Entretanto, muitas bactérias apresentam temperatura ótima de produção de queratinase entre 30 °C e 45 °C, tais como *Bacillus thuringiensis* (HASSAN et al., 2020), *Bacillus pumilus* (RAMAKRISHNA REDDY et al., 2017), *Bacillus lechaniformis* (ADETUNJI e ADEJUMO, 2018).

Conforme relatado por Alahyaribeik et al. (2020) o pH influencia tanto a produção de protease quanto em outros processos celulares, como o transporte de nutrientes através da membrana celular de microrganismos. O pH ótimo para a degradação de substratos queratinolíticos varia entre as muitas espécies de fungos e bactérias, sendo que alguns se adaptam à valores de pH levemente ácido, em torno de 6,0, e outros à faixas mais alcalinas, entre 7,5 e 10 (Tabela 1). Para fungos como o *Trichoderma harzianum*, o pH ótimo em que

deve ser inserido para a degradação de substratos queratinolíticos é o 6,0 (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018), *Purpureocillium lilacinum* apresenta ótima degradação quando inserido em pH 7,0 (CAVELLO et al., 2013), já o pH 7,5 é ótimo para o cultivo de *Fusarium* sp. (CĂLIN et al. (2017).

Tabela 1: Microrganismos e condições de cultivo para a produção de queratinase/ degradação de substratos queratinolíticos

Microrganismos	pH	T °C	Agitação (rpm)	Tempo (h)	Tipo de substrato	Autor
<i>Bacillus thuringiensis</i>	7	30	200	72	Pêlo de equino	HASSAN et al., (2020)
<i>B. lechaniformis</i>	7	45	100	48	Penas de galinha	ADETUNJI e ADEJUMO, (2018)
<i>B. tequilensis</i> Q7	8	45	200	22	Farinha de penas	ZARAÍ JAOUADI et al. (2015)
<i>B. pumilus</i> GRK	10	40	200	24	Penas	RAMAKRISHNA REDDY et al. (2017)
<i>Trichoderma harzianum</i> HZN12	6	30	150	96	Farinha de penas	BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR (2018)
<i>Metarhizium</i> sp. IS15	6,7	30	150	168	Farinha de penas/ Farinha de vísceras	BOAVENTURA (2019)
<i>Penicillium guaibinense</i> IS25.2	6,7	30	150	168	Farinha de penas/ Farinha de vísceras	BOAVENTURA (2019)
<i>Fusarium</i> sp.	7,5	27	100	504	Pêlo de equino	CĂLIN et al. (2017)
<i>Microsporium</i> sp.	7,5	27	100	504	Pêlo de equino	CĂLIN et al. (2017)
<i>Chrysosporium</i> sp.	7,5	27	100	504	Pêlo de equino	CĂLIN et al. (2017)
<i>Purpureocillium lilacinum</i> LPS # 876	7,0	28	200	117	Cabelo	CAVELLO et al. (2013)

Fonte: Compilação da autora.

2.5.3. Tempo de cultivo

As bactérias apresentam crescimento acelerado, com produção enzimática em pelo menos 22 horas de cultivo, podendo atingir a fase estacionária de crescimento a partir de 48 h (ZARAÍ JAOUADI et al., 2015). Por outro lado, alguns fungos filamentosos apresentam crescimento máximo e produção de metabólitos secundários em pelo menos 4 dias de cultivo, embora a maioria seja cultivada por períodos de 7 a 10 dias (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018).

O tempo de cultivo varia muito entre os tipos de microrganismos, sendo que bactérias podem apresentar produção máxima de queratinase entre 22 e 72 horas de cultivo (ZARAÍ JAOUADI et al., 2015). Porém, os fungos filamentosos apresentam melhor atividade de degradação e produção de enzimas entre 96 e 504 horas de cultivo (CĂLIN et al., 2017; BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018). O crescimento mais lento é uma das poucas desvantagens do uso de fungos filamentosos quando comparados com bactérias em processos fermentativos.

2.5.4. Concentração do inóculo

De acordo com Abdel-Fattah et al. (2018), a produção enzimática é influenciada pela densidade de células, pois quando o inóculo apresenta baixa densidade celular pode haver poucas células viáveis durante a fase de produção da enzima; já em concentrações maiores o meio fica mais viscoso, facilitando a produção enzimática.

A concentração de inóculo utilizada em estudos com leveduras indicam cerca de 10^8 unidades formadoras de colônias por mL (DE MEDEIROS et al., 2016). Fungos filamentosos são utilizados em concentrações entre 10^6 e 10^9 conídios por mL (CAVELLO et al., 2013; BOHACZ et al., 2020). Já bactérias do gênero *Bacillus* são utilizadas em concentrações de 5%, sendo a concentração ótima de inóculo para a produção de queratinase por esse tipo de microrganismo (ABDEL-FATTAH et al., 2018; EMRAN; ISMAIL; ABDEL-FATTAH, 2020).

2.5.5. Tipo de substrato

Alguns microrganismos conseguem degradar melhor substratos específicos, por exemplo, *Bacillus lechaniformis* ALW1 quando testado com diferentes substratos queratínolíticos, apresentou maior indução de queratinase com penas de frango que quando comparados à fios de cabelo e chifre (ABDEL-FATTAH et al., 2018).

A levedura *Trichosporum loubieri* RC-S6 é uma cepa com capacidade de degradar substratos queratinolíticos. No estudo de De Medeiros et al. (2016) ela apresentou maior capacidade de degradação de unhas de humanos, cerca de 61%, e a menor degradação observada foi observada com farinha de penas, com apenas 8,9%, quando cultivada em pH 5,5, 28 °C durante 7 dias. Isso mostra que cada tipo de microrganismo pode ter afinidade em degradar tipos de substratos queratinolíticos diferentes.

De acordo com Abdel-Fattah et al. (2018) a concentração do substrato também é muito importante para a atividade enzimática, pois em quantidades elevadas pode ocorrer a inibição pelo substrato, diminuindo a hidrólise, devido à repressão catabólica.

Alahyaribeik et al. (2020) relatam em seu trabalho, que o aumento da concentração de penas proporcionou um aumento no crescimento do microrganismo e na produção de protease queratinolítica. Porém, a maior taxa de hidrólise das penas ocorreu de forma inversamente relacionada com a concentração desse substrato.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os principais fatores que influenciam na degradação da farinha de penas por fermentação submersa utilizando fungos filamentosos.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a melhor agitação para a degradação da farinha de penas
- Determinar a melhor temperatura para a degradação da farinha de penas
- Avaliar o pH final
- Determinar o melhor pH para a degradação da farinha de penas
- Otimizar o processo de fermentação após a determinação das variáveis mais favoráveis
- Avaliar qual o melhor isolado fúngico para o processo de degradação da farinha de penas

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização das atividades do trabalho

As atividades referentes a este trabalho foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da UFRB, situado na unidade de laboratórios do Bloco L, localizado no campus de Cruz das Almas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

4.2. Microrganismos

Foram estudados os fungos *Metarhizium* sp. IS15 e *Penicillium guaibinense* IS25.2, ambos isolados da restinga de Guaibim e pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Biologia Evolutiva da UFRB (Labev).

4.3. Avaliação da quantidade de esporos por disco retirado da cultura

Após o período de incubação de 7 dias sob 25 °C em Meio Mineral de Farinha de Penas (g/L): farinha de penas 10, cloreto de sódio (NaCl) 0,5, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,3 e fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4, foram retirados discos de 1 cm das culturas fúngicas. Posteriormente, os discos foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo solução mineral composta por (g/L): cloreto de sódio (NaCl) 0,5, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,3 e fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4, mais uma gota de Tween 20 %, sendo agitados por 30 segundos antes de serem transferidos para a câmara de Neubauer para contagem de esporos. Para a avaliação da quantidade de esporos foram transferidos 100 µl da suspensão de esporos para a câmara de Neubauer, cobrindo-a com lamínula e levando-a ao microscópio óptico para realizar a contagem. Foi utilizada a objetiva de 40x para auxiliar a contagem.

Para determinar a quantidade de esporos foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Esporos (mL)} = N \times 10 \times 2,5 \times 10^6$$

Onde:

N = número de esporos obtidos na contagem

10 = fator de diluição dos esporos

2,5 x 10⁵ = fator de correção da câmara de Neubauer

4.4. Obtenção da farinha de penas

A farinha de penas foi cedida pela agroindústria Avigro Avícola Agroindustrial, localizada na Vila dos Coqueiros nº 520, BR 111 – Km 193, Conceição de Feira - BA. A amostra foi acondicionada em recipiente estéril e armazenada em câmara fria com temperatura de 8 °C.

4.5. Condições de cultivo

A degradação da farinha de penas foi avaliada por fermentação submersa para cada isolado. Inicialmente foi feita a inoculação dos isolados em placas de Petri contendo Meio Mineral de Farinha de Penas (g/L): farinha de penas 10, cloreto de sódio (NaCl) 0,5, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,3 e fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4. Após 7 dias de crescimento, discos de cultura de 1,0 cm de diâmetro foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 0,6 g de farinha de penas e 60 mL de solução mineral composta por (g/L): cloreto de sódio (NaCl) 0,5, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,3 e fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4. Os discos de inóculo continham, em média, 5,8 x 10⁶ esporos/ mL de *P. guaibinense* e 3,8 x 10⁶ esporos/ mL de *Metharizium* sp. Os experimentos do controle foram submetidos às mesmas condições e cultivo, entretanto sem inóculo fúngico.

Posteriormente, os frascos foram colocados em câmara agitadora (shaker) com temperatura controlada a 30 °C sob diferentes agitações por 7 dias. Em seguida, os ensaios foram autoclavados e realizou-se uma filtração simples para a extração do caldo com papel de filtro previamente seco em estufa a 65 °C por 24 horas e, posteriormente, pesados. Após a filtração a biomassa foi levada à estufa onde permaneceu por cerca de 24 horas a 65 °C. A taxa de degradação foi determinada através da diferença entre a massa dos filtros vazios e com a biomassa seca, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Degradação (\%)} = (\text{peso da biomassa} - \text{peso do filtro seco}) / 0,6 \times 100 - 100$$

Para se determinar as melhores condições de degradação da farinha de penas foram estudados os seguintes fatores: agitação (100, 150 e 200 rpm) e temperaturas (25, 30, 35, 40 e 45 °C). Também foi avaliado o pH inicial e final dos cultivos, utilizando o método one-factor-at-a-time (OFAT), onde os fatores escolhidos foram variados uma de cada vez.

4.6. Análise dos dados

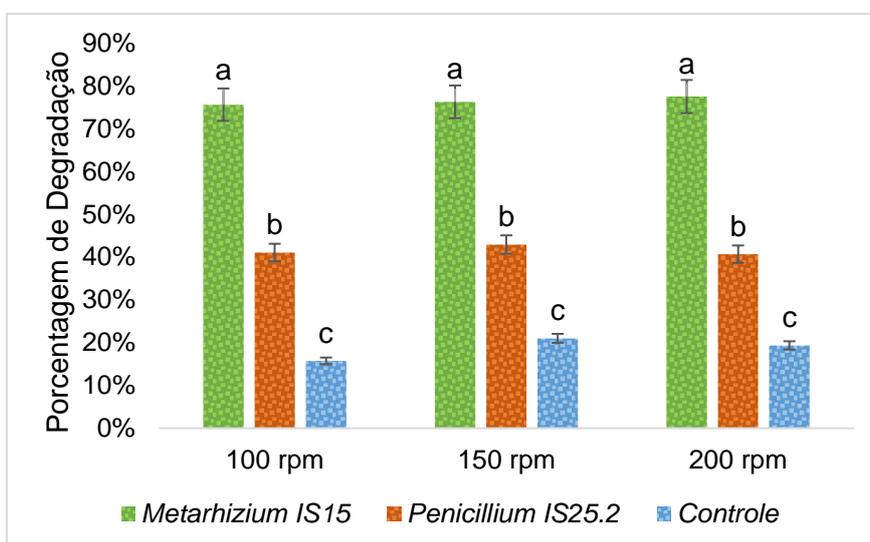
Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as análises dos dados foram realizadas utilizando a metodologia estatística de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Rstudio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fatores físico-químicos como pH, temperatura e aeração/ agitação afetam diretamente na eficiência dos processos fermentativos e, por isso, é importante determinar sua condição ótima (ABDEL-FATTAH et al., 2018; WANG et al., 2018).

Para os isolados da restinga de Guaibim, após a fermentação foi possível observar que ambos, *Metarhizium* sp.15 e *P. guaibinense* 25,2, não apresentaram alteração na taxa de degradação com o aumento da agitação de 100 para 200 rpm. A análise estatística indicou que as médias obtidas nas diferentes agitações utilizadas não podem ser consideradas diferentes e sua variância pode ser considerada homogênea (Figura 7).

Figura 7 - Porcentagem de degradação nas diferentes agitações



As letras minúsculas acima representam a diferença estatística entre as ~~os grupos de~~ médias, onde os grupos que apresentam as mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Entretanto, a diferença nas taxas de degradação entre os isolados foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo cerca de 50% maior para *Metarhizium* sp. IS15 nas mesmas condições de cultivo, com taxas de degradação acima de 70%.

Para ambos os isolados a taxa de degradação foi significativamente maior do que nos controles, sendo 76% maior para o isolado *Metarhizium* sp. IS15 e cerca de 50% maior para o *P. guaibinense* IS25.2. Os experimentos dos controles, submetidos às mesmas condições de cultivo, apresentaram taxa de degradação em torno de 20%, que pode ser atribuída à agitação, pois o atrito pode contribuir para quebrar as moléculas da farinha de penas.

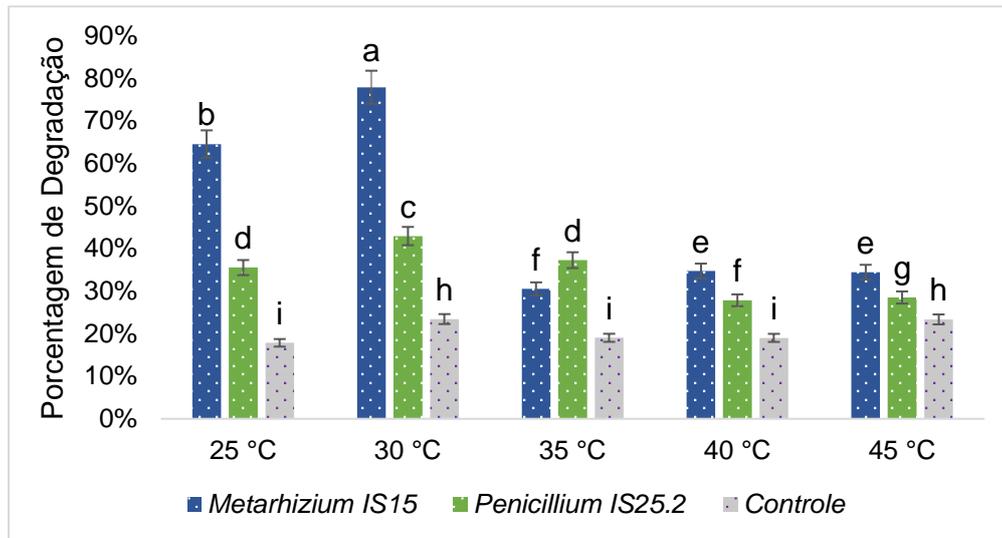
A agitação é um fator importante, pois auxilia na distribuição e homogeneização de nutrientes e oxigênio no meio de cultivo, podendo influenciar no crescimento celular e no

metabolismo do microrganismo, durante o processo de fermentação (WANG et al., 2018; ABDELLA; SEGATO; WILKINS, 2020). Para degradação de queratina Singh et al. (2017) observaram que microrganismos, como bactérias, quando submetidas à diferentes agitações apresentaram maior produção de queratinase em 150 rpm, sendo que acima e abaixo a produção diminuiu, mostrando a influência da agitação para este microrganismo. Sousa et al. (2015) mostraram que fungos queratinolíticos apresentaram maior atividade de queratinase a 30 °C e 120 rpm e 10 dias de cultivo. Entretanto, para os isolados fúngicos estudados neste trabalho não correu influência estatisticamente significativa da agitação na taxa de degradação da farinha de penas. Então, foi definida a agitação de 150 rpm para os experimentos.

Com relação ao pH, após o período de fermentação foi observado que o pH dos cultivos fermentados ficaram alcalinos, subindo de 6,5 (pH inicial) para cerca de 8,0, em média. Boaventura (2019) em seu estudo utilizando os isolados *Metarhizium* sp. IS15 e *Penicillium guaibinense* IS25.2 na degradação de penas de frangos, também observou um aumento no pH final após o período de fermentação, mudando de 6,7 para 9,27 para o isolado o IS15 e 6,7 para 7,71 para o isolado IS25.2.

Isso corrobora com os resultados de Sivakumar e Raveendran (2015), que observaram o aumento da alcalinidade do cultivo fermentado após três semanas de incubação em meio contendo penas, tendo como base o pH inicial do meio igual a 6,8, próximo à neutralidade. No estudo da degradação de queratina utilizando bactérias também foi observado que o pH dos cultivos aumentaram de 5,0 para 7,0 - 8,0, quando utilizaram farinha de penas ou penas de frango (BACH; LOPES; BRANDELLI, 2015). Isso provavelmente ocorre porque a hidrólise da queratina libera compostos nitrogenados, como aminas, que alcalinizam o meio de cultivo. Portanto, a elevação do pH sugere que está ocorrendo o processo de hidrólise das queratinas.

Nos ensaios seguintes, os isolados foram submetidos à diferentes temperaturas, mantendo-se a agitação de 150 rpm e pH inicial igual a 6,5. Dentre as cinco temperaturas estudadas a que apresentou as maiores taxas de degradação foi 30 °C para ambos os isolados (Figura 8), sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 8 - Porcentagem de degradação em temperaturas diferentes

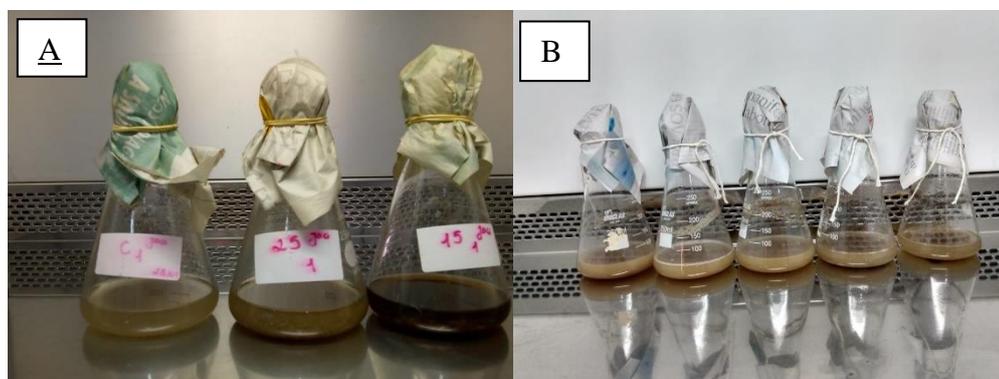
As letras minúsculas acima representam a diferença estatística entre os grupos de médias, onde os grupos que apresentam as mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste Skott-Knott a 5% de probabilidade.

O isolado *Metarhizium* sp. IS15 atingiu cerca de 80% de degradação da farinha de penas a 30 °C, resultado 20% maior que a 25 °C, a segunda melhor temperatura. Entretanto, quando os valores de temperatura aumentaram, a taxa de degradação, para este isolado, caiu bruscamente para cerca de 35% entre 40 °C e 45 °C. Já o isolado *Penicillium* sp. IS25.2 obteve sua maior taxa de degradação na temperatura 30 °C, valor cerca de 20% maior do que a 25 °C e 15% maior que a 35 °C, ocorrendo a diminuição da taxa de degradação em temperaturas superiores a estas.

O pH dos ensaios fermentativos submetidos a 25 e 30 °C tenderam a aumentar após o período de fermentação indicando que houve alta atividade hidrolítica. Contudo, quando nas temperaturas 35 °C, 40 °C e 45 °C os pH permaneceram próximos a 6,50, comprovando o comprometimento da atividade enzimática, provavelmente por desnaturação das enzimas.

Outro fator que provavelmente indicou a atividade queratinolítica nos ensaios fermentativos foi a coloração do meio de cultivo, pois nas temperaturas de 25 °C e 30 °C os cultivos fúngicos adquiriram coloração um pouco mais escura que a dos controles e a textura se tornou um pouco mais viscosa após o período de fermentação (Figura 9).

Figura 9 - Coloração dos ensaios fermentativos: A) Ensaios fermentativos com alta taxa de degradação; B) Ensaios fermentativos com baixa taxa de degradação



Os valores de degradação apresentados são percentuais subestimados, pois durante o processo fermentativo ocorre o crescimento micelial do microrganismo, e conseqüentemente esta biomassa se mistura com o resíduo no momento da filtragem (não sendo separados), e isso pode influenciar no valor final da massa dos resíduos, conforme também relatado por Boaventura (2019). Isso sugere que a taxa de degradação da farinha de penas é ainda maior do que apresentada pelos resultados, indicando uma elevada eficiência dos fungos.

A temperatura e o pH são algumas das variáveis que mais influenciam na atividade enzimática e, conseqüentemente na degradação de resíduos, uma vez que são fatores que atuam diretamente na atividade das enzimas hidrolíticas microbianas. Por isso, determinar a temperatura ótima do cultivo é tão importante. De acordo com Wang et al. (2017), uma temperatura ideal é muito importante durante o processo de fermentação, pois pode melhorar as atividades dos microrganismos, como o crescimento e metabolismo.

O pH, por sua vez, pode afetar tanto o crescimento microbiano e a produção de metabólitos quanto o transporte de nutrientes através da membrana celular (DE GIOANNIS et al., 2014; ALAHYARIBEIK et al., 2020). Diferentes estudos apontam que estes fatores variam e são específicos para cada espécie. De acordo com Singh et al. (2017) e Adetunji e Adejumo (2018), a produção de queratinase por microrganismos, como *Bacillus*, ocorre principalmente entre o pH 3 a 7, atingindo seu máximo em pH 7 e sua diminuição em pH 10. A bactéria *Bacillus pumilis* atingiu um nível ótimo de produção de queratinase, utilizando penas de frangos como substrato, em pH 7,0 e 37 °C, com elevação do pH para próximo de 9,0 após 4 dias de cultivo (ALAHYARIBEIK et al., 2020).

Entretanto, para a bactéria *Bacillus licheniformis* a maior produção de enzima foi alcançada quando cultivada em pH inicial igual a 10,0, e após 48 h de cultivo

(ALAHYARIBEIK et al. 2020). Para *Paecilomyces farinosus*, quanto menor a temperatura de cultivo e mais alcalino o meio, maior foi sua produção de queratinase utilizando penas de frango como substrato (SOUSA, 2015).

Segundo Sousa (2008), a maior atividade das proteases para o fungo *Paecilomyces farinosus* também ocorreu quando os ensaios foram submetidos a condições de 30 °C, pH 6,2 em 2% de penas de frango. Em pH ácido, geralmente, as proteases apresentam baixa atividade lítica, entretanto sua atividade aumenta em pH alcalino (SILVA, 2011). Para os isolados fúngicos deste trabalho, *Metarhizium* sp. IS15 quanto o *Penicillium* sp. IS25.2, aparentemente, a elevação do pH ao longo do tempo não afetou a taxa de degradação, indicando que as enzimas queratinolíticas destes fungos são alcalofílicas. Entretanto, estes resultados deverão ser confirmados em experimentos futuros.

A alta taxa de degradação está relacionada com a alta atividade queratinolítica, uma vez que, este é um tipo de enzima capaz de degradar o substrato utilizado neste trabalho (FONSECA, 2010). Estudos realizados com *Bacillus haynesii* ALW2 demonstraram que enzimas queratinolíticas são potencialmente capazes de degradar resíduos de penas, chegando a 60% de degradação total, após 24 horas de cultivo. Este processo faz com a farinha de penas se torne um produto rico em nutrientes, podendo ser empregado em dietas animais (EMRAM; ISMAIL; ABDEL-FATTAH, 2020).

A cepa bacteriana *Bacillus tequilensis* Q7 apresentou cerca de 100% de degradação da farinha de penas e 85% das penas de frangos quando cultivadas em pH 8, 45 °C, e 22 horas de cultivo (ZARAÍ JAOUADI et al., 2015). Isso comprova que a farinha de penas é mais fácil de ser degradada que a pena inteira, devido ao processo de produção da farinha, que envolve altas temperaturas e pressão. Além disso, segundo Bach; Lopes e Brandelli (2015) queratinases microbianas degradam com mais facilidade resíduos compostos por beta-queratina, como as penas de aves e seus derivados, quando comparados com resíduos com alfa-queratina (cabelo e lã), devido sua conformação mais rígida.

Călin et al. (2017) relatam em seu estudo realizado com crina de cavalo, que as ligações dissulfeto foram as únicas afetadas pelos microrganismos, e as ligações peptídicas são rompidas após a secreção das enzimas microbianas. Além disso, foi relatado uma estratégia de degradação diferente para cada espécie fúngica, como formação de estruturas específicas (túneis, feixes de hifas, micélio ao redor do cabelo) para a penetração e degradação do substrato.

6. ATIVIDADES PLANEJADAS E NÃO EXECUTADAS

A realização de várias etapas do projeto estavam previstas para março, abril e maio de 2020, porém, devido à pandemia do COVID-19, os trabalhos de laboratório tiveram que ser interrompidos por recomendação da Comissão de Biossegurança da UFRB. Dentre as atividades previstas e não executadas estão:

- determinar o pH ótimo para a degradação da farinha de penas
- otimizar o processo de fermentação nas condições mais favoráveis de pH, temperatura e agitação
- determinar o melhor tempo de cultivo nas condições ótimas
- determinar a taxa de degradação utilizando o extrato enzimático bruto
- determinação de proteína bruta da biomassa fúngica.

7. CONCLUSÕES

O isolado *Metarhizium* sp. 15 apresentou taxa de degradação bastante superior ao do *P. guaibinense* 25.2, mostrando que tem alto potencial para degradação deste tipo de subproduto queratinoso.

Os resultados obtidos mostraram que a agitação não apresentou influência na taxa de degradação da farinha de penas para ambos os isolados. Por outro lado, a temperatura interferiu na atividade dos microrganismos, sendo, portanto, um dos fatores cruciais que devem ser bem controlados durante o processo fermentativo, de forma a manter elevada a taxa de degradação do substrato.

O pH sofreu grande alteração ao longo do processo de fermentação, ficando bastante alcalino. Se esse tipo de alteração influencia ou não na taxa de degradação, será objeto de estudo nas próximas etapas deste projeto.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, A. M.; EL-GAMAL, M. S.; ISMAIL, S. A.; EMRAN, M. A.; HASHEM, A. M. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018. doi:10.1016/j.jgeb.2018.05.005

ABDELLA, A.; SEGATO, F.; WILKINS, M. R. Optimization of process parameters and fermentation strategy for xylanase production in a stirred tank reactor using a mutant *Aspergillus nidulans* strain. **Biotechnology Reports**, 2020. doi:10.1016/j.btre.2020.e00457

ABDULLAH, R.; AKRAM, S.; IQTEDAR, T.; KALEEM, A.; SALEEM, F.; IFTIKHAR, T.

Application of synergistic phenomena for enhanced production of xylanase using fungal consortium underground submerged fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 3, p. 1223-1232, 2019.

doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Abdullah

ADETUNJI, C. O.; ADEJUMO, I. O. Efficacy of crude and immobilized enzymes from *Bacillus licheniformis* for production of biodegraded feather meal and their assessment on chickens. **Environmental Technology & Innovation**, v. 11, p. 116–124, 2018. doi:10.1016/j.eti.2018.05.002

AGBOR, R.B.; ANTAI, S.P.; EKPO, I.A. Phylogenetic relationship of hydrocarbon degrading fungi species in bioremediation. **Global Journal of Earth and Environmental Science**, v.3, n.2, p.8-15, 2018. doi.org/10.31248/GJEES2017.013

AHMED, P. M.; PAJOT, H. F.; DE FIGUEROA, L. I. C.; GUSILS, C. H. Sustainable bioremediation of sugarcane vinasse using autochthonous macrofungi. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 5177–5185, 2018. doi:10.1016/j.jece.2018.08.007

ALAHYARIBEIK, S.; SHARIFI, S. DAVOOD; TABANDEH, F.; HONARBAKHS, S.; GHAZANFARI, S. Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. **Process Safety and Environmental Protection**, 2020. doi:10.1016/j.psep.2020.01.014

ALHARBI, S. A.; WAINWRIGHT, M.; ALAHMADI, T. A.; SALLEEH, H. B.; FADEN, A. A.; CHINNATHAMBI, A. What if Fleming had not discovered penicillin? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 289–293, 2014. doi:10.1016/j.sjbs.2013.12.007

ANDRADE, A. S. A.; OLIVEIRA NETO, N. J.; DIAS, E. C.; GERVÁSIO, D. K. L.; LIMA, M. K. L.; SANTOS, S. F. M.; SOUSA, A. C. B.; ALMEIDA, A. F. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, 2018. 502 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório ABPA 2019**. Disponível em: <<http://abpa-br.org/relatorios/>> Acesso em: 24 de março de 2020.

AZEVEDO JÚNIOR, S. M.; DIAS FILHO, M. M.; LARRAZÁBAL, M. E. Plumagens e mudas de *Charadriiformes* (Aves) no litoral de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 3, p. 657-672, 2001.

BACH, E.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Biodegradation of α and β -keratins by Gram-negative bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 136–141, 2015. doi:10.1016/j.ibiod.2015.06.001

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 4828–4839, 2018. doi:10.1016/j.jece.2018.07.007

BAPTISTA, N.M.Q.; SANTOS, A.C.; ARRUDA, F.V.F.; GUSMÃO, N.B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n.1, 2012.

BELEWU, M.A.; ASAFA, R.A.; OGUNLEKE, F.O. Processing of feather meal by solid state fermentation. **Biotechnology**, v.7, n.3, p.589-591, 2008.

BELLAVER, C. Versão atualizada para o 2º Simpósio Brasileiro Alltech da Indústria de Alimentação Animal. Curitiba, Paraná, 28 a 30 de agosto de 2005. **Embrapa Suínos e Aves**. Concórdia, SC.

BHARI, R.; KAUR, M.; SINGH, R. S.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Bioconversion of chicken feathers by *Bacillus aerius* NSMk2: A potential approach in poultry waste management. **Bioresource Technology Reports**, 2018. doi:10.1016/j.biteb.2018.07.015

BLYSKAL, B. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 63, p. 631-653. 2009. doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.006

BOAVENTURA, S. C. **Degradação de resíduos e subprodutos da indústria avícola por fungos filamentosos isolados da restinga de Guaibim, BA**. 2019. 55f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biologia)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2018.

BOHACZ, J.; KORNIEŁOWICZ-KOWALSKA, T.; KITOWSKI, I.; CIESIELSKA, A. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 151, 2020. 104968. doi:10.1016/j.ibiod.2020.104968

BOLU, S. A.; ADAKEJA, A. Effects of poultry offal meal and soyabean meal mixtures on the performance and carcass quality of broiler chicks. **African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development**, v. 8, n. 4, 2008.

CĂLIN, M.; CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D.; ALEXANDRESCU, E.; RĂUT, I.; DONI, M. B.; ARSENE, M.-L.; OANCEA, F.; JECU, L.; LAZĂR, V. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 101–112, 2017. doi:10.1016/j.ejbt.2017.05.007

CAMPANHOL, B. S.; SILVEIRA, G. C.; CASTRO, M. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; BASTOS, R. G. Effect of the nutrient solution in the microbial production of citric acid from sugarcane bagasse and vinasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019. doi:10.1016/j.bcab.2019.101147

CAMPOS, C.; DIAS, D. C.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Produção de biomassa, protease e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoológicas da UNOPAR**, Umuarama, v.13, n.1, p. 19-24, 2010.

CAMPOS, I.; MATOS, E.; MARQUES, A.; VALENTE, L. M. P. Hydrolyzed feather meal as a partial fishmeal replacement in diets for *European seabass (Dicentrarchus labrax)* juveniles. **Aquaculture**, v. 476, p. 152–159, 2017. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.024

CAVELLO, I. A.; HOURS, R. A.; ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 972–978, 2013. doi:10.1016/j.procbio.2013.03.012

CREPALDI, A. L.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; GUEDES, C. S.; BOAVENTURA, S. C.; ANDRADE, J. P.; MARBACH, P. A. S. Degradação de escamas de peixe por fungos do gênero *Paecilomyces*. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v. 29, n.3/4, p. 346-355, 2018.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n.3, p. 358–363, 2009. doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.008

DAROIT, D. J. **Potencial queratinolítico e caracterização de uma queratinase extracelular de *Bacillus* sp. P45**/Daniel Joner Daroit, 2011, 167 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2011.

DE GIOANNIS, G.; FRIARGIU, M.; MASSI, E.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; SPIGA, D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 36, p. 20930–20941, 2014.

DE MEDEIROS, I. P., ROZENTAL, S., COSTA, A. S., MACRAE, A., HAGLER, A. N., RIBEIRO, J. R. A., & VERMELHO, A. B. Biodegradation of keratin by *Trichosporum loubieri* RC-S6 isolated from tannery/leather waste. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. p. 115, 199–204, 2016. doi:10.1016/j.ibiod.2016.08.006

DELGADO, J.; BALLESTER, A.-R.; NÚÑEZ, F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Evaluation of the activity of the antifungal PgAFP protein and its producer mould against *Penicillium* spp postharvest pathogens of citrus and pome fruits. **Food Microbiology**, v. 84, 103266, 2019. doi.org/10.1016/j.fm.2019.103266

DIANA, T. F.; PINHEIRO, S. R. F.; RAMOS, K. M.; SANTOS, A. S.; RODRIGUES, R. C.; DOURADO, L. R. B. Inclusão de farinha de penas em dietas com redução de proteína e aminoácidos para codornas de corte. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, 2020. doi.org/10.33448/rsd-v9i9.6833

DIPANKAR, P.; BHAN, C. Role of keratinase in bioremediation of feathers and hairs. **Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology**, Roorkee, India. 2019. doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00005-6

EL-GENDY, M. M. A. Keratinase Production by Endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 Under Solid-State Fermentation Using Rice Straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n.3, p. 780–794, 2009. doi:10.1007/s12010-009-8802-x

EMRAN, M. A.; ISMAIL, S. A.; ABDEL-FATTAH, A. M. Valorization of feather via the microbial production of multi-applicable keratinolytic enzyme. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2020. doi:10.1016/j.bcab.2020.101674

EYNG, C.; NUNES, R.V.; ROSTANGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; NUNES, C.G.V.; BRUNO, L.D.G. Composição química, valores energéticos e aminoácidos digestíveis verdadeiros de farinha de vísceras para aves. **Revista Brasileira e Zootecnia**, v.39, n.4, p.779-786, 2010. doi.org/10.1590/S1516-35982010000400012

FONSECA, C.F. **Otimização da produção de queratinase por *Bacillus amyloliquefaciens***. Carolina Ferrarezi Fonseca. - Rio Claro: 2010. 69 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

GAMEIRO, M.; LISBOA, P.; PAIVA, A.; BARREIROS, S.; SIMÕES, P. Supercritical carbon dioxide-based integrated continuous extraction of oil from chicken feather meal, and its conversion to biodiesel in a packed-bed enzymatic reactor, at pilot scale. **Fuel**, v. 153, p. 135–142, 2015. doi:10.1016/j.fuel.2015.02.100

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHIMD, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.20, n.1, p. 17–48, 2000. doi.org/10.1080/07388550091144177

GIUFFRIDA, M. G.; MAZZOLI, R.; PESSIONE, E. Back to the past: deciphering cultural heritage secrets by protein identification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n. 13, p. 5445–5455, 2018.

GRAEFF, A.; MONDARDO, M. Substituição da farinha de peixes pela farinha de penas hidrolizada na alimentação da carpa comum (*Cyprinus carpio* L) na fase de recria. **Revista Ceres**, v.53, n.305, p.:7-13, 2006.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, 2015. doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017

HASSAN, M. A.; TAHA, T. H.; HAMAD, G. M.; HASHEM, M.; ALAMRI, S.; MOSTAFA, Y. S. Biochemical characterization and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorization of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.032

HOLANDA, M. A. C.; LUDKE, M. C. M. M.; LUDKE, J. V.; HOLANDA, M. C. R.; RABELLO, C. B.; DUTRA JÚNIOR, W. M.; VIGODERIS, R. B.; COSTA, A. A. G. Desempenho e características de carcaças de frangos de corte recebendo dietas com farinha de penas hidrolizada. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.10, n.3, p 696-707, 2009.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa trimestral do abate de animais**, 2016-2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1094#/n3/all/v/284/p/201601,201602,201603,201604,201701,201702,201703,201704,201801,201802,201803,201804,201901,201902,201903/c12716/115235,115236/c12529/111738/l/v,p+c12716,t+c12529/resultado>>. Acesso em: 26 de abril de 2020.

KRABBE, E. L.; SILVA, S. N. Ações e medidas da avicultura sustentável. **EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2016.

MALAJOVICH, M.A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MASOUDI, A.; DALELHAN, J.; ZHAO, M.; PEI, X.-Y.; WANG, D. Natural diversity and distribution of species within the entomopathogenic fungal genus *Metarhizium* in forest ecosystems in Sichuan Province, China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.170, 107313, 2020. doi.org/ 10.1016/j.jip.2019.107313

MOONJELY, S.; BIDOCHKA, M. J. Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots. **Fungal Ecology**, v.41, p:209–217, 2019. doi.org/10.1016/j.funeco.2019.06.004

MOORE, G.R.P.; MARTELLI, S.M.; GANDOLFO, C.A.; PIRES, A.T.N.; LAURINDO, J.B. Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p. 421-427. 2006.

NAFADY, N. A.; HASSAN, E. A.; ABD-ALLA, M. H.; BAGY, M. M. K. Effectiveness of eco-friendly arbuscular mycorrhizal fungi biofertilizer and bacterial feather hydrolysate in promoting growth of *Vicia faba* in sandy soil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 140–147, 2018. doi:10.1016/j.bcab.2018.07.024

NAVEENAL, B.J.; ALTAF, M.; BHADRAYYA, K.; REDDY, G. Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran. **Food Technology and Biotechnology**, v.42, n.3, p.147–152, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, C.; MULLER, F.; SEGATO, M. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. **Aplicações de enzimas em produtos de limpeza**. In: Trabalhos de graduação do grupo de processos biotecnológicos da UFSC. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

OLIVEIRA, J.C. de. **Tópicos em Micologia Médica** / Jeferson Carvalhaes de Oliveira – Rio de Janeiro; 2014. 230 págs.; il. col.

OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, A. K. S.; CASTRO, R. J. S. Bioconversion of chicken feather meal by *Aspergillus niger*: simultaneous enzymes production using a cost-effective feedstock under solid state fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, 2019. doi.org/10.1007/s12088-019-00792-3

OZCENGIZ, G.; DEMAIN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n.2, p. 287–311, 2013. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.12.001

- PACHECO, G. F. E.; PEZZALI, J. G.; KESSLER, A. DE M.; TREVIZAN, L. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, 6, p. 288–294, 2016. doi:10.1590/s1806-92902016000600002
- PAN, L.; MA, X. K.; WANG, H. L.; XU, X.; ZENG, Z. K.; TIAN, Q. Y.; Zhao, P.F.; Zhang, S.; Yang, Z.Y.; PIAO, X. S. Enzymatic feather meal as an alternative animal protein source in diets for nursery pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 112–121, 2016. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.12.014
- PEREIRA, E. L.; OLIVEIRA, A.F. A. A produção de antibióticos por processos aeróbios fermentativos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 1058-1078, 2016.
- PURANDARADAS, A., SILAMBARASAN, T., MURUGAN, K., BABUJANARTHANAM, R., GANDHI, A. D., DHANDAPANI, K. V., ANBUMANI, D.; KAVITHA, P. Development and quantification of biodiesel production from chicken feather meal as a cost-effective feedstock by using green technology. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.14, p. 133–139, 2018. doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.04.012
- RAMAKRISHNA REDDY, M.; SATHI REDDY, K.; RANJITA CHOUHAN, Y.; BEE, H.; REDDY, G. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 254–263, 2017. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.067
- REIS, C. E. R.; VALLE, G. F.; BENTO, H. B. S.; CARVALHO, A. K. F.; ALVES, T. M.; DE CASTRO, H. F. Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: Vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters. **Fuel**, v. 277, 2020. doi:10.1016/j.fuel.2020.118064
- SALES, M. R.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L.; MOTTA, C. M. S.; PORTO, A. L. F. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.2, p.285-288, 2008.
- SALES, P. J. P.; FURUYA, W. M.; ROMANELLI, P. F. Chemical composition and apparent digestibility of the ostrich offal meal for Nile tilapia. **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 335-339, 2012. doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i4.13097
- SANCHES, L.E.F.; PAMPLIN, P.A.Z.; HAYASHI, C. Óleo de tilápia, óleo de vísceras de aves e suas combinações, em substituição ao óleo de soja, para alevinos de tilápias. **PUBVET – Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.6, p.1-11, 2020.
- SANTHA KALAIKUMARI, S.; VENNILA, T.; MONIKA, V.; CHANDRA RAJ, K.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. **Journal of Cleaner Production**, 2018. doi:10.1016/j.jclepro.2018.10.076
- SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; REIDEL, A. Farinha de vísceras de aves na alimentação de alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, Santa Maria, 2008.

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização de protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius/ Ronivaldo Rodrigues da Silva.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2011. 58 f.

SILVA, G.M.H; FERREIRA, G.F; BEZERRA, N.S; TAVARES, L.M; ALMEIDA, A.F; SOUSA, A.C.B. Produção de amilase e protease obtidas por *Metarhizium anisopliae* Var. *Anisopliae* através da fermentação em estado sólido. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, 2018. 502 p

SINGH, S.; MASI, H.; JEYAKUMAR, G.E.; LAWRENCE, R.; RAMTEKE, P.W. Optimization of fermentative production of keratinase by *Bacillus subtilis* Strain S1 in submerged state fermentation using feather waste. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, n.12, p. 1499-1510, 2017. doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.167

SIVAKUMAR, N.; RAVEENDRAN, S. Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage. **British Poultry Science**, v. 56, n. 2, p. 210–217,2015. doi.org/10.1080/00071668.2014.996119

SOUSA, M.A. **Queratinases produzidas por fungos isolados de ambientes de piscinas de parques aquáticos do Recife-PE.** Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2008. 122 f.

SOUSA, M.; SOUZA, O.; MACIEL, M.; CRUZ, R.; RÊGO, M.G.; MAGALHÃES, M.; PESSOA-JÚNIOR, A.; PORTO, A.; SOUZA-MOTTA, C. Keratinolytic potential of fungi isolated from soil preserved at the Micoteca URM. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v.3, n.4, p. 10-15, 2015.

SOUZA, B.S.; OLIVEIRA, D.R.; ROCHA, F.V.R.; CANTO, E.S.M.; OLIVEIRA, D.P.; SANTOS, T.T. Fungos endofíticos associados à planta medicinal *Kalanchoe pinnata* (LAM.) PERS. **Revista Desafios** – v. 5, n. 3, 2018. doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2018v5n3p30

SOUZA, F.R.A.; MUNIZ, C.B.O.; LIMA, C.A.; BORGES, E.M.E.S.; CAVALCANTE, L.E.; AMORIM, L.A.S.; QUEIROZ, C.F. Produção e avaliação de antibiótico obtido por fermentação pelo Fungo Cds71. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, 2018. 502 p.

SUNADA, N. DA S.; ORRICO, A. C. A.; ORRICO JUNIOR, M. A. P.; CENTURION, S. R.; OLIVEIRA; A. B. DE M.; FERNANDES, A. R. M.; LUCAS JÚNIOR, J.; SENO, L. DE O. Compostagem de resíduo sólido de abatedouro avícola. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 178–183, 2015. doi.org/10.1590/0103-8478cr20120261

TAMREIHAO, K.; DEVI, L. J.; KHUNJAMAYUM, R.; MUKHERJEE, S.; ASHEM, R. S.; NINGTHOUJAM, D. S. Biofertilizing potential of feather hydrolysate produced by indigenous keratinolytic *Amycolatopsis* sp. MBRL 40 for rice cultivation under field conditions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 317–320, 2017. doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.010

TAUK, S.M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v. 20, n. 1-4, p. 299-301, 1990.

THONGKAEWYUAN, A.; CHAIRIN, T. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* by *Metarhizium guizhouense* and its protease. **Biological Control**, v. 126, p. 142–146, 2018. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.005

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRINCA-FERRO VERDADEIRO. Disponível em: <<http://trincaferroverdadeiro.blogspot.com/2011/03/as-penas.html>>. Acesso em: 13 de abril de 2020.

WALK, C. L.; JUNTUNEN, K.; PALOHEIMO, M.; LEDOUX, D. R. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and nutrient digestibility of poultry: enzyme dose response. **Poultry Science**, 2019. doi.org/10.3382/ps/pez299

WANG, Y.-Z.; ZHANG, L.; XU, T.; DING, K. Influence of initial anolyte pH and temperature on hydrogen production through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose in microbial electrolysis cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22663–2267, 2017.

WANG, C.-C.; WU, J.Y.; CHANG, C.Y.; YU, S.T.; LIU, Y.C. Enhanced exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* using repeated batch cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2018. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.09.006

YANG, M.-H.; LI, T.-X.; WANG, Y.; LIU, R.-H.; LUO, J.; KONG, L.-Y. Antimicrobial metabolites from the plant endophytic fungus *Penicillium* sp. **Fitoterapia**, v. 116, p. 72–76, 2017. doi.org/10.1016/j.fitote.2016.11.008

ZARAÏ JAOUADI, N.; REKIK, H.; BEN ELHOUL, M.; ZOHRA RAHEM, F.; GORGI HILA, C.; SLIMENE BEN AICHA, H.; BADIS, A.; TOUMI, A.; BEJAR, S.; JAOUADI, B. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 952–964, 2015. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.038