



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS.



CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

GABRIEL CONCEIÇÃO MARQUES

**EFEITO DA TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA
DEGRADAÇÃO DE FARINHA DE PENAS POR
FUNGOS FILAMENTOSOS DA RESTINGA DE
GUABIM-BA**

Cruz das Almas – BA

2021

GABRIEL CONCEIÇÃO MARQUES

Efeito da temperatura e agitação na degradação da farinha de penas por fungos filamentosos da restinga de Guaibim, BA.

Relatório apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Biologia referente à atividade “CCA- Trabalho de conclusão de curso II-TCCII”, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB, como requisito para a atividade de TCC II.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta

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

Cruz das Almas – BA

2021

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	07
2.0 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVO ESPECIFICOS	13
3.0 METODOLOGIA	14
3.1 MATERIAL	14
3.2 METODO	14
3.3 Local de realização das atividades do estágio	14
3.4 Microrganismos	14
3.5 Obtenção da farinha de penas	14
3.6 Condições de cultivo	14
3.7 Análise dos dados	15
4.0 RESULTADOS E DISCURSÃO	15
4.1 Tabela 1 com valores obtidos dos pH por meio da fermentação	16
4.2 Gráfico 1: Influencia da agitação para o em <i>Aspergillus terrus</i> IS37	17
4.3 Gráfico 2: Influencia da agitação para o <i>Cladosporium</i> sp ISD8	18
4.4 Gráfico 3: Agitação. isolados <i>A. terrus</i> IS37 e <i>Cladosporium</i> sp ISD8	19
4.5 Gráfico 3: Influencia da temperatura para o <i>A. terrus</i> IS37	21
4.6 Gráfico 4: Influencia da temperatura para o <i>Cladosporium</i> sp ISD8	22
4.5 Gráfico 5: Temperatura. Isolados <i>A. terrus</i> IS37 e <i>Cladosporium</i> sp ISD8	23
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha rainha Maria Das Graças por sempre acreditar nos sonhos dos seus filhos e nunca mediu esforços para realizá-los, te amo.

A professora e Dra. Marcia Cazetta, agradeço por todo apoio e paciência durante os quatros longos estágios e projetos realizados com sua orientação e sua dedicação durantes esses anos.

Aos meus avós Valdelice Conceição e Raimundo Conceição, por toda sua atenção, compreensão e amor incondicional.

Durante a minha caminha foi fundamental a presença e o apoio dos meus amigos: Caroline Santos, Marta Maria, Jaciara Santana, Renato pereira.

A minha irmã Glaciane Marques por ser a melhor irmã do mundo e por toda ajuda.

A PROPRAE pela ajuda financeira e suporte ao aluno.

Á FAPESB pelo auxílio financeiro para realizações de pesquisas.

Agradeço a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) por possibilitar a realização de um sonho que é me tornar biólogo.

Resumo

Efeitos da temperatura e agitação na degradação da farinha de penas por fungos filamentosos da restinga de Guaibim, BA. Gabriel Conceição Marques

A biotecnologia é uma das técnicas mais utilizadas para redução de resíduos gerados pelas agroindústrias, através de microrganismos e sua produção enzimática. Na indústria avícola os principais subprodutos são as vísceras, penas, sangue e gorduras. As penas constituem um subproduto rico em proteína queratinosas, ricas em aminoácidos, os quais podem ser utilizados como suplemento proteico para produção de ração animal. Porém, devido à sua baixa digestibilidade, a absorção dos aminoácidos é comprometida. Entretanto, através dos processos fermentativos é possível fazer o aproveitamento de resíduos agroindustriais, como a farinha de penas, para a síntese de diversos compostos de interesse industrial e de elevado valor agregado. A técnica de fermentação submersa ocorre em meio aquoso e normalmente com substratos solúveis, permitindo maior controle dos parâmetros físico-químicos como temperatura, aeração, agitação, pH entre outros. O uso desta tecnologia acaba diminuindo o custo ambiental causado pelos subprodutos existentes nas produções agroindústrias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da agitação e da temperatura na taxa de degradação da farinha de penas pelos fungos filamentosos *Aspergillus terreus* Is 37 e *Cladosporium* sp. ISD8 em processo fermentativo submerso, bem como avaliar o pH final. Os resultados mostraram que tanto a temperatura quanto a agitação influenciaram na taxa de degradação da farinha de penas para ambos os isolados. Com relação à agitação, ocorreu maior taxa de degradação a 200 rpm tanto para *A. terreus* Is 37 como para *Cladosporium* sp. ISD8, com taxa de degradação acima de 80% e acima de 60%, respectivamente. A melhor temperatura para ambos os isolados foi 30 °C, havendo queda estatisticamente significativa para ambos os isolados a 25 °C e 35 °C. O isolado *A. terreus* IS37 apresentou taxa de degradação da farinha de penas superior ao isolado *Cladosporium* sp ISD8 em todos parâmetros estudados. Após o final da fermentação, o sobrenadante apresentou pH alcalino, indicando que ocorreu a degradação das proteínas da farinha de penas. De um modo geral, pode-se concluir que os fungos foram eficientes na degradação da farinha de penas.

Palavras-chave: Biotecnologia, microrganismos, agroindústria.

ABSTRACT

Effects of temperature and agitation on the feather meal degradation by filamentous fungi from the restinga of Guaibim, BA. Gabriel Conceição Marques

Biotechnology is one of the most used techniques to reduce waste generated by agro-industries, through microorganisms and their enzymatic production. In the poultry industry, the main by-products are viscera, feathers, blood and fat. Feathers are a by-product rich in keratinous protein, rich in amino acids, which can be used as a protein supplement for the production of animal feed. However, due to its low digestibility, the absorption of amino acids is compromised. However, through fermentation processes it is possible to make use of agro-industrial residues, such as feather flour, for the synthesis of various compounds of industrial interest and high added value. The submerged fermentation technique takes place in an aqueous medium and usually with soluble substrates, allowing greater control of physical-chemical parameters such as temperature, aeration, agitation, pH, among others. The use of this technology ends up reducing the environmental cost caused by the existing by-products in agribusiness production. The objective of this work was to evaluate the influence of agitation and temperature on the rate of degradation of feather meal by filamentous fungi *Aspergillus terreus* Is 37 and *Cladosporium* sp. ISD8 in submerged fermentation process, as well as evaluating the final pH. The results showed that both temperature and agitation influenced the feather meal degradation rate for both isolates. Regarding agitation, there was a higher degradation rate at 200 rpm for both *A. terreus* Is 37 and *Cladosporium* sp. ISD8, with degradation rate above 80% and above 60%, respectively. The best temperature for both isolates was 30 °C, with a statistically significant drop for both isolates at 25 °C and 35 °C. Isolate *A. terreus* IS37 presented a higher rate of degradation of feather meal than isolate *Cladosporium* sp ISD8 in all parameters studied. After the end of fermentation, the supernatant showed an alkaline pH, indicating that the degradation of the feather meal proteins had occurred. In general, it can be concluded that fungi were efficient in the degradation of feather meal.

Keywords: Biotechnology, microorganisms, agroindustry

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO

Gabriel Conceição Marques

“Efeito da Temperatura e Agitação na Degradação
de Farinha de Penas por Fungos Filamentosos da
Restinga de Guabim-BA”

BANCA EXAMINADORA

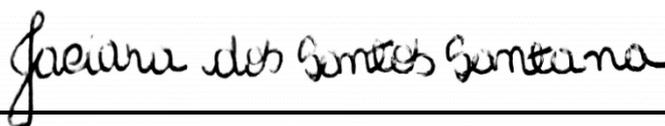


Prof. Dra. Marcia Luciana Cazetta
orientadora

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Prof. Msc. Cleilton Sousa Frota
Escola Superior de Ensino Santa Fé (CESSF)



Jaciara dos Santos Santana
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

CRUZ DAS ALMAS

Setembro-2021

Introdução

Os fungos queratinofílicos vêm despertando grande interesse no setor industrial, isso se deve, a alta produção de metabólitos secundários como as enzimas que esses microrganismos produzem, além da sua capacidade em usar a proteína queratina como fonte de carbono e nitrogênio. Mostrando assim um novo caminho a si trilhar para solucionar os problemas oriundos dos subprodutos gerados pelas agroindústrias (DUFOSSE et al., 2014).

Logo que esses fungos produzem enzimas que podem otimizar o desempenho enzimático, como a degradação de compostos orgânicos. Se ver utilizando esses microrganismos para a degradação de penas de frangos que são subprodutos oriundos dos abatedores, faz com que ocorra o aumento crescente e contínuo do mercado de enzimas industriais, apesar das enzimas já serem bastante conhecidas e comercializadas de diversas maneiras, ainda é necessário o desenvolvimento de melhores técnicas de produção e novas aplicações de enzimas para degradação do substrato desejado (SOUZA et al., 2015).

A aplicação da biotecnologia se faz necessária para a transformação de resíduos gerados pela alta demanda na produção agroindustrial, que tem contribuído com diversos impactos ambientais, por meio de geração de resíduos e subprodutos que ocasionam contaminação do meio ambiente quando descartado de forma incorreta, além de contribuir para a disseminação de doenças (BHATTACHARYA; PLETSCHE, 2015). Diante desses fatos, a sociedade se encontra em uma nova realidade, na qual se faz necessário repensar o atual modelo de desenvolvimento para assegurar a qualidade de vida das gerações futuras. Dessa maneira a biotecnologia desenvolve ações que visam minimizar esses impactos ecológicos causados por acúmulos desses resíduos agroindustriais (NAGARAJAN, 2012).

Os resíduos gerados pelas agroindústrias são consideravelmente baratos e, geralmente, apresentam um bom potencial como substrato para a produção de diferentes produtos como enzimas comerciais produzidas por microrganismos. Os fungos, por sua vez, conseguem utilizar os resíduos como fonte de carbono para o processo de produção enzimática que podem ser fornecidas de forma direta ou indiretamente por esses resíduos (HARANGOZÓ;

ZILAHY, 2015).

Os maiores impactos ambientais são provocados pelos descartes de materiais orgânicos de forma inadequada pois eles são ricos em proteínas, açúcares, ácidos orgânicos, óleos essenciais e sais e seu destino inadequado geram problemas ambientais e sociais bastante grave que influenciam nas gerações futuras (NASCIMENTO-FILHO; FRANCO, 2015). Por essa constante e crescente preocupação, a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos vem tomando espaço ao longo dos anos, com o desenvolvimento de tecnologias que favoreçam o meio ambiente, pela geração de produtos de valor agregado (KNOB et al., 2014).

Os processos biotecnológicos, contribuem para a diminuição destes problemas ambientais, por isso têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, pigmentos, aromas, agentes de controle biológico de pragas, antibióticos, dentre outros (SRIVASTAVA et al., 2020).

Dentre os processos mais utilizados para produção de biocompostos de interesse industrial, inclusive utilizando os subprodutos agroindustriais, encontram-se os processos fermentativos, com destaque para a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FS), (GRAMINHA, 2008).

A fermentação (FES) aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas. Utiliza substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição, os quais devem atuar como suporte fisiológico e fonte de nutrientes, como fontes de carbono, nitrogênio e microelementos, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas. O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. Uma característica da fermentação em estado sólido é a dificuldade no controle dos parâmetros físico-químicos como aeração, pH, temperatura e umidade, devido à baixa homogeneidade do meio, diferente da fermentação submersa, onde temos um controle destes parâmetros. Entretanto, apresenta como vantagens

o baixo custo das matérias-primas, a simplicidade do processo e a menor probabilidade de contaminação, devido a menor quantidade de água presente (PANDEY, 2003; PEREIRA J; FERRARA, 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Na Fermentação Submersa (FS) o crescimento microbiano ocorre em meio líquido com os nutrientes dissolvidos juntamente com o microrganismo, sendo que estes nutrientes se encontram disponíveis no meio, evitando a sedimentação destas partículas, que ficam disponíveis para a síntese metabólica durante a fermentação. Este bioprocessamento fermentativo possibilita o controle da temperatura, aeração e pH durante todo o processo (REGULY, 2000; PANDEYA et al., 2012). Além disso, possui facilidade de cultivo em grande escala, homogeneidade do meio e facilidade no controle do processo. (GUTARRA, 2003).

Os processos fermentativos permitem o uso de uma variada fonte de nutrientes, entre eles os resíduos e subprodutos de origem agroindustrial, como substratos. Atualmente, muita atenção tem sido dada aos subprodutos da indústria avícola, uma vez que são produzidos em grande quantidade, podendo causar impactos ambientais quando descartados de forma incorreta (FERNÁNDEZ, 2009).

A avicultura industrial é uma das atividades agrícolas mais desenvolvidas no mundo. O aumento da produção e abate de aves vem ao encontro da responsabilidade de destinação adequada dos resíduos de abatedouros. As penas são alguns dos principais subprodutos provenientes desta atividade agroindustrial, e, nas médias e grandes indústrias, são processadas dando origem à farinha de penas, que é um subproduto destinado à produção de rações animais para frangos de corte, peixes, cães, gatos além de serem utilizadas na agricultura como fertilizantes agrícolas (USDA, 2013).

As penas são produtos queratinosos, ou seja, compostos principalmente pelas proteínas denominadas de queratinas. Essas proteínas são diversificadas em sua estrutura molecular, sendo classificadas em alfa e beta queratina. As alfa-queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores enquanto as beta-queratinas são encontradas geralmente em répteis e aves, nesta última encontradas uma mistura de alfa e beta queratina nas penas. Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina e pepsina. Desse modo, rações a base de farinha de

penas, apresenta baixa digestibilidade quando ingeridas pelos animais, devido à ausência das enzimas responsáveis pela quebra desta proteína, as queratinases (FREITAS et al., 2018).

As queratinases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina e são produzidas por diversos microrganismos e vegetais (WANG et al., 2016). Por isso, essas enzimas são usadas para o processamento biotecnológico de penas ao se fazer sua bioconversão de poluidores em potencial para ração rica em nutrientes, pois possuem aminoácidos essenciais como glicina e leucina, além de proporcionarem enriquecimento adicional da ração pela própria biomassa microbiana (SAID; PIETRO, 2004). Estas enzimas microbianas são biotecnologicamente importantes, devido a capacidade de hidrolisar a queratina, uma escleroproteína, insolúvel em água e em solventes orgânicos, e resistente a ácidos e álcalis diluídos (SCHROOYEN et al., 2001; GUPTA; ROMNANI, 2004; ANBU et al., 2007). As enzimas queratinolíticas são, geralmente, produzidas por fungos e bactérias em fermentação submersa. Estes microrganismos em meio onde a presença de queratina estará em baixa concentração de carbono e nitrogênio disponível para utilização de suas vias metabólicas, estimulando assim, o microrganismo a produzir a queratinases para quebra desta macromolécula, para a realização de sua via metabólica (ANBU et al., 2007).

Os principais subprodutos da indústria avícola são as vísceras, penas, sangue e gordura, que são gerados na hora do abate. As vísceras e penas podem ser transformadas em ração para esses animais, diminuindo assim os custos na produção, para obter um maior lucro, uma vez que esses subprodutos, quando processados corretamente, são ótimas fontes de nutrientes (BELLAVAR et al., 2005).

Nas indústrias avícolas de médio e grande porte, esses subprodutos são reaproveitados, fechando um ciclo no que vem sendo denominado, atualmente, de economia circular, um mecanismo de remanufatura e reciclagem, que cria uma estrutura lucrativa e sustentável. A farinha de vísceras é resultante da cocção, prensagem, moagem e inclusão cabeças e pés para a produção de ração, com uma boa digestibilidade para os animais. A farinha de penas também é produzida pelo método de cocção e moagem,

entretanto, devido à sua composição com grande quantidade de queratina, faz este produto ter uma baixa digestibilidade pelos animais quando ingerida (PADILHA et al., 2005).

O uso de penas como substrato fermentescível implica na secreção, por parte dos microrganismos, de queratinases capazes de degradá-las. Este fenômeno está associado à necessidade do microrganismo em hidrolisar substratos protéicos de grande tamanho em moléculas pequenas para aproveitamento como fonte de nutrientes. Entre os microrganismos produtores de enzimas com atividade queratinolítica encontram-se os fungos (SANTOS et al., 2009).

Existem uma ampla variedade de gêneros de fungos que produzem queratinases, dentre eles: *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gleomastis*, *Monodictys*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Stachybotrys*, *Urocladium*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium*, *Penicillium*, *Doratomyces*. Após a descoberta desta enzima, empresas passaram a isolar a queratinases dos microrganismos não patogênicos que possuem habilidade em degradar a queratina insolúvel de subprodutos ricos em queratinas e transformá-las em alimentos economicamente úteis (LIN et al., 2011). Considerando os gêneros estudados neste trabalho, será dado destaque a *Aspergillus* e *Cladosporium*.

Os fungos do gênero *Aspergillus*, possuem uma grande capacidade de crescimento rápido, além de apresentar tolerância às condições de pH e de secretar uma grande variedade de enzimas hidrolíticas, que são capazes de hidrolisar moléculas complexas tais como a queratina (GAUTAM, 2018). Estes microrganismos, também são capazes de biossintetizar outros compostos que podem dificultar as etapas de purificação na produção de enzimas em escala industrial, produzindo um co-metabólico (COUCH; GAUCHER 2004).

Ferreira et al. (2017) realizaram experimentos com diferentes gêneros fúngicos variando os parâmetros físicos e químicos, e o gênero *Aspergillus* apresentou uma alta produção enzimática, entre elas a queratinolítica e colagenolítica, que são capazes de degradar substratos queratinosos.

O gênero *Cladosporium*, criado por Link, em 1816, se destaca entre um dos maiores e mais heterogêneos hifomicetos, com aproximadamente 500 espécies, sendo 15 de ocorrência comum. O *Cladosporium* é um fungo

ascomiceto que apresenta colônias efusas, geralmente com coloração escura devido ao seu pigmento verde-escuro na maioria de suas espécies (KIRK et al., 2001; MENEZES et al., 2017). Sua ocorrência é bastante frequente em vários lugares do mundo, sendo encontrados geralmente em compostos orgânicos em decomposição (ALMATAR; MAKKY, 2016). Este microrganismo tem uma grande capacidade de produzir metabólitos secundários juntamente com outros bioativos, de grande interesse para o mercado de enzimas (JIN et al., 2016).

O gênero *Cladosporium* sp, em contato com substrato liberam agentes antagonistas que facilitam que esse microrganismo fúngico degrade facilmente o substrato que ele esteja presente, impedindo que haja competição com outros microrganismos (PEREIRA et al., 2007). Os fungos deste gênero produzem enzimas de interesse industrial, pois há variação genética entre eles, produzindo uma ampla variedade de enzimas que são utilizadas para processos de bioconversão, usados principalmente em subprodutos de empresas agroindustriais por exemplo na indústria avícola, pois apresentam características queratinofílicas e queratinolíticas, ou seja, podem hidrolisar a queratina livre ou associada a matéria (DESHMUKH, 2004; FERNANDEZ, 2009)

Devido a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, o *Cladosporium* sp. vem ganhando um lugar de destaque no ramo industrial de enzimas. A sua biodiversidade genética é um dos fatores que mais possibilita que este microrganismo ganhe mais espaço neste ambiente, além de estar presente em locais de fácil acesso para isolamento (MOHAN; KUMAR; REDDY, 2013).

Alguns dos parâmetros fermentativos que mais afetam a degradação de resíduos queratinosos pelos fungos são a temperatura e a agitação. Uma baixa taxa de degradação de substratos queratinosos está associada à baixa produção de enzimas queratinolíticas pelos microrganismos, isto pode estar associado a desnaturação destas enzimas devido alta temperatura que estes microrganismos são encontrados. Diferente da (FES), onde que há uma grande liberação de calor na matéria ao meio, na fermentação submersa (FS) é possível um controle desta temperatura, ajustando-a a melhor condição para ao microrganismo para seu melhor crescimento e produção de seus

metabólicos, sem causar problemas na sua estrutura celular e na desnaturação de suas enzimas (CĂLIN et al. 2017).

A agitação, por sua vez, desempenha um papel fundamental na fermentação submersa, mantendo as condições aeróbicas, removendo os gases produzidos pelo microrganismo, influenciando significativamente na taxa de degradação do substrato utilizado, onde os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização dos microrganismos e fique homogêneo ao meio impedindo que essas partículas sedimentem, deixando sempre disponíveis para que os microrganismos realizem suas vias metabólicas, impedindo danos celulares durante o processo fermentativo (MALAJOVICH, 2004).

O pH do meio também é um dos fatores importantes, influenciando o crescimento dos microrganismos e sua atividade enzimática. De um modo geral, quando o pH do meio muda é um indicativo que há liberação de substâncias que comprovam que ocorreu quebra de moléculas para o crescimento celular (PRAKASHAM et al., 2006).

A indústria avícola produz uma grande quantidade de penas com potencial para causar impacto ambiental. A fermentação submersa utilizando fungos filamentosos da restinga de Guaibim-BA entra como um bioprocessamento capaz de hidrolisar essas moléculas estruturais da queratina, presente na farinha de penas, através das enzimas proteolíticas, aumentando a digestibilidade desta farinha de penas, que poderá resultar num ganho de massa maior e em menos tempo quando ingerido pelos animais.

2.0 Objetivo geral

Estudar a degradação da farinha de penas por fungos filamentosos isolados da Restinga de Guaibim-BA.

2.1 Específicos

- Avaliar o efeito da variação da agitação e temperatura na degradação da farinha de penas.
- Verificar o pH dos cultivos (inicial e final).

3.0 Material e Métodos

3.1. Local de realização das atividades do estágio

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

4.1.0 Microrganismos: foram estudados os fungos *Aspergillus terreus* IS37 e *Cladosporium* sp. ISD8, isolados da restinga de Guaibim e que fazem parte da coleção de fungos do laboratório Biologia Evolução –LABEV.

4.1.1 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 a 8°C.

4.1.2 Condições de cultivo

A degradação da farinha de penas foi avaliada a partir da fermentação submersa por cada isolado fúngico. Inicialmente foi feita a inoculação dos isolados em placas de Petri contendo meio mínimo mineral (g/L): Cloreto de sódio (NaCl, 0,5), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4 0,3), fosfato monopotássico (KH_2PO_4 0,4), ágar (15) e farinha de penas a 10. Após 7-10 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): NaCl 0,5 g K_2HPO_4 0,3 g; KH_2PO_4 0,4 g. O controle foi feito somente com a solução mineral 60ml e 0,6 g de farinha de penas, sem inóculo fúngico. Frascos de Erlenmeyer foram inoculados com um disco fúngico de 1 cm e colocados em câmara agitadora com temperatura controlada a 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C sob uma agitação de 200 rpm por 7 dias. Também foi testado seguindo a mesma metodologia padrão citados a cima com as diferentes agitações de 100 rpm, 150 rpm e 200 rpm sob uma temperatura de 30 °C, para ver a influência da agitação sobre a

degradação deste processo fermentativo. Para padronização do inóculo, foi realizada a contagem de esporos do disco fúngico. Para isso, o disco fúngico do tamanho de 1 cm de cada isolado foi colocado em solução mineral com mesma composição utilizada da fermentação com uma gota de tween 20%, em um tubo tipo Falcon, agitado pelo vórtex para suspensão dos esporos e, em seguida, transferidos para câmara de Neubauer para contagem. Os discos fúngicos continham, em média, $14,86 \times 10^8$ esporos/mL para *A. terreus* IS37 e $3,06 \times 10^6$ esporos/mL para *Cladospprium* sp. ISD8.

Após 7 dias de fermentação, foi realizada uma filtração simples para a extração do caldo fermentativo com papéis de filtro previamente secos em estufa a 65 °C por 24 horas e, posteriormente, pesados. Após a fermentação, o caldo fermentado foi filtrado e a biomassa foi seca em estufa a 65 °C por 24 h, até atingir peso constante. A taxa de degradação foi determinada pela diferença de peso entre os filtros vazios e com a biomassa seca, de acordo com a equação abaixo:

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

4.1.3 Análise dos dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e as análises dos dados foram rodados no programa R e utilizando a metodologia estatística de Tukey a 5% de probabilidade.

5.0 Resultados e discussão:

Nestes experimentos foram aferidas as taxas de degradação da farinha de penas em função de diferentes agitações, temperaturas bem como o pH inicial e final da fermentação. Este último variou em média de 6,5 (pH inicial) até 9,03 (pH final) para o isolado *A. terreus* IS37 e de 6,5 (pH inicial) variando até 8,67 (pH final) para o isolado *Cladosporium* sp. ISD8, em média, após 7 dias de fermentação (Tabela 1). Saber et al. (2010) estudaram a capacidade de 82 fungos de degradarem resíduos queratinosos, sendo que o isolado *A. terreus* conseguiu degradar as penas em 5 dias de incubação, apresentando pH final alcalino em torno de 9,0.

Souza et al. (2015) demonstraram que a fermentação submersa, usando penas de frangos como substrato, também apresentou uma alta alcalinidade no final do processo, em torno de pH 10 mostrando, de forma indireta, que houve liberação de enzimas que proporcionaram a degradação do substrato queratinoso.

Tabela 1: Médias dos pH obtidos durante a fermentação submersa pelos isolados fúngicos *Aspergillus terreus* IS37 e *Cladosporium* sp. ISD8 sob diferentes temperaturas após 7 dias de fermentação.

Temperatura (°C)	<i>Aspergillus terreus</i> IS37	<i>Cladosporium</i> sp. ISD8
25	9,03	8,67
30	8,79	8,28
35	8,56	6,35

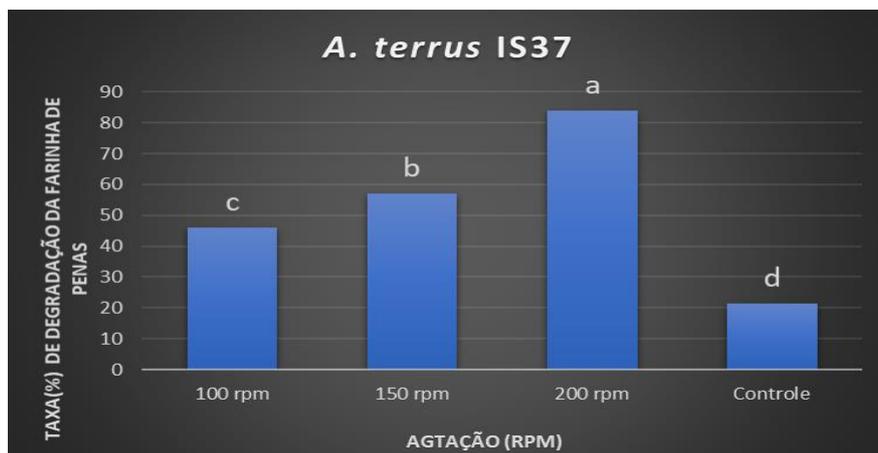
Essa alcalinidade aferida no final da fermentação demonstra que ocorreu a hidrólise das proteínas, especialmente das queratinas, liberando aminas que alcalinizaram o meio. No trabalho de Souza et al. (2015) a degradação de penas pelos microrganismos fúngicos elevou os pH final nos processos fermentativos, sugerindo assim que houve a liberação de enzimas, tais como a peptidases, proteases, queratinases pelos microrganismos na fermentação submersa, o que demonstra que houve degradação do substrato.

Estudos com gêneros de *Aspergillus* em fermentação submersa demonstraram sua plasticidade fenotípica e diversidade molecular, podendo ser evidência para a capacidade de produção de diferentes tipos de enzimas por estes microrganismos em variados valores de pH (ZAFERANLOO et al., 2014).

Os resultados obtidos nos Gráficos 1 e 2 mostram que a agitação apresentou influência estatisticamente significativa na degradação da farinha de penas pelos isolados fúngicos da restinga. Na agitação de 200 rpm foram observadas as maiores taxas de degradação da farinha de penas para ambos os isolados, porém o *A. terreus* IS37 degradou acima 80% do material queratinoso (Gráfico 1). Os tratamentos observados sob diferentes agitações demonstram estatisticamente que eles não compartilham de letras iguais,

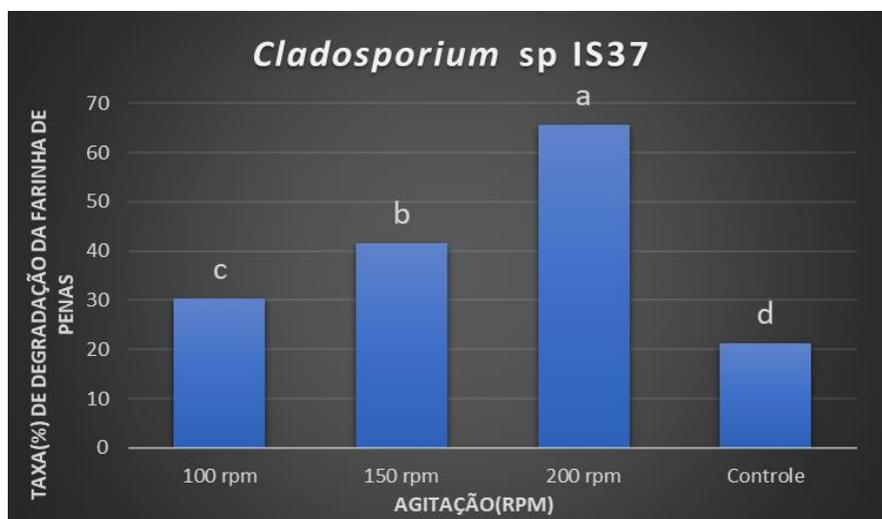
diferindo nas porcentagens da taxa de degradação da ração de penas, indicando, de forma indireta, que esta agitação promoveu uma melhor condição para produção das enzimas queratinolíticas pelos fungos.

Gráfico 1: Taxa de degradação (%) do isolado *Aspergillus terreus* IS37 sob temperatura de 30°C durante 7 dias.



Para o isolado *Cladosporium* sp. ISD8, uma maior degradação da farinha de penas foi observada com o aumento da agitação, sendo que na agitação de 200 rpm a taxa de degradação também foi a mais elevada, sendo estatisticamente diferente das agitações de 100 rpm e 150 rpm (cada tratamento compartilha de letras diferentes, ou seja, cada agitação promoveu uma taxa diferente da degradação da farinha de penas) (Gráfico 2).

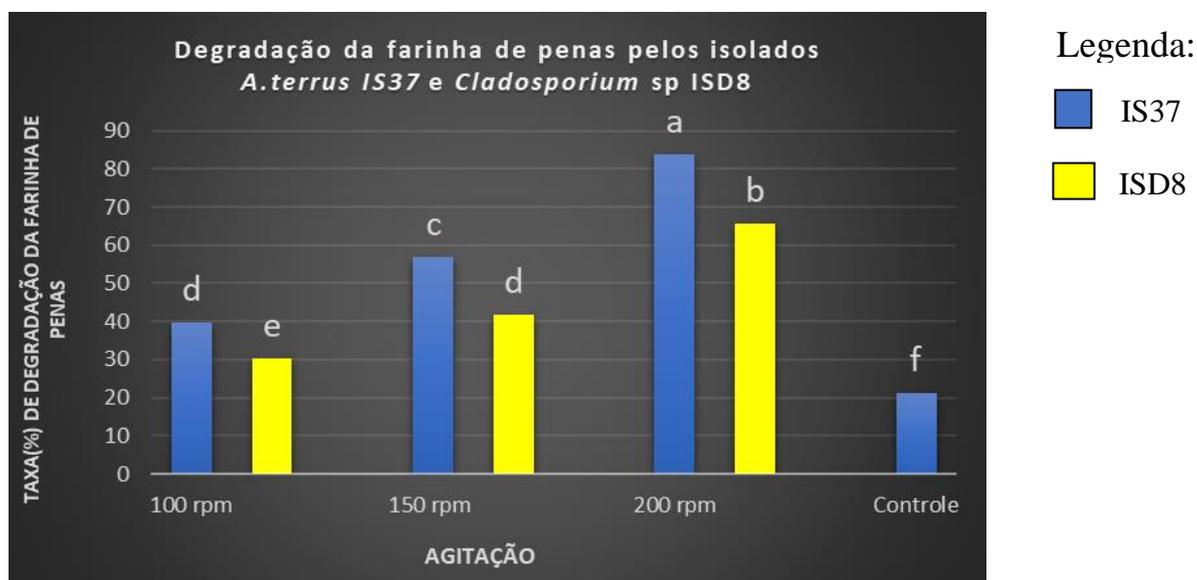
Gráfico 2: Taxa (%) de degradação do isolado *Cladosporium* sp ISD8 sob temperatura de 30°C durante 7 dias.



Para se obter o melhor pico de produção de metabólitos desejáveis é necessário observar e estudar a capacidade de adaptação de cada isolado fúngico às condições de crescimento em que são submetidos para poder verificar a influência dos parâmetros físicos e químicos que podem interferir na capacidade dos microrganismos em produzir metabólitos secundários ((ASGHER et al. 2016; AMIN et al. 2017).

O isolado *A. terreus* IS37 apresentou capacidade de degradação da farinha de penas cerca de 25% maior quando comparado ao isolado *Cladosporium* sp. ISD8, em todas as agitações estudadas (Gráfico 3). O gênero *Aspergillus* possui características como crescimento rápido, tolerância a variações de pH e capacidade de secretar uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na decomposição de materiais queratinosos (CAIRNS et al., 2018), o que pode explicar sua maior eficiência na degradação da farinha de penas.

Gráfico 3: Taxa da degradação (%) da farinha de penas pelos isolados fúngicos *Aspergillus terreus* IS37 e *Cladosporium* sp ISD8 a 30°C e diferentes agitações (rpm).



De Castro e Sato (2014) ressaltam em seu trabalho a importância das condições como temperatura, pH, íons e agitação, para o sucesso do processo fermentativo. A agitação, por sua vez, desempenha um papel fundamental, que influencia na taxa de degradação, devido à redução de danos na estrutura

celular do microrganismo e diminuindo assim o gasto energético no sistema, possibilitando que os microrganismos possam realizar suas vias metabólicas, o que pode resultar na degradação do substrato.

Por isso, para os experimentos seguintes com *A. terreus* IS37 e *Cladosporium* sp. ISD8 foi padronizada a agitação de 200 rpm, variando somente as temperaturas, na avaliação da taxa (%) de degradação da farinha de penas em fermentação submersa (Gráficos 4 e 5).

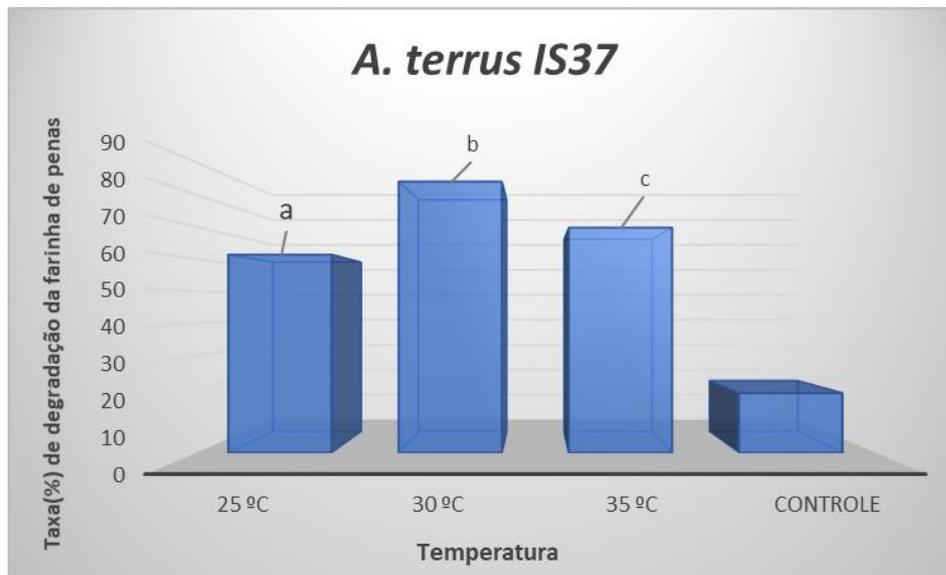
A temperatura ótima das queratinases, que são as enzimas responsáveis pela hidrólise da queratina, está em uma faixa entre 30 °C e 80 °C, dependendo do microrganismo utilizado na fermentação (ANITHA; PALANIVELU, 2013).

A temperatura influenciou na taxa de degradação da farinha de penas pelos isolados fúngicos *A. terreus* IS37 e *Cladosporium* sp ISD8, sendo que para ambos os isolados os tratamentos foram estatisticamente significativos entre si (letras diferentes significam que os tratamentos diferiram estatisticamente), ou seja, a temperatura promoveu diferentes taxas de degradação na faixa estudada.

Para o isolado fúngico *A. terreus* IS37 a temperatura que levou a uma maior taxa de degradação do substrato queratinoso foi 30 °C, acima de 80%, sendo cerca de 20% a 25% superior quando comparado à temperatura de 25 °C e 35 °C (Gráfico 3). Este resultado pode ser corroborado pelo trabalho de Anitha; Palanivelu (2013).

Os resultados também foram significativamente superiores ao controle em todas as temperaturas, mostrando que, embora o controle apresente cerca de 20% de taxa de degradação, isso ocorre devido à agitação mecânica que degrada a farinha de penas. Entretanto, essa degradação decorrente de um processo físico é insuficiente para atingir um nível desejável.

Gráfico 4: Taxa de degradação (%) da farinha de penas pelo isolado fúngico *Aspergillus terreus* IS37, em diferentes temperaturas sob agitação de 200rpm, no período de 7 dias.



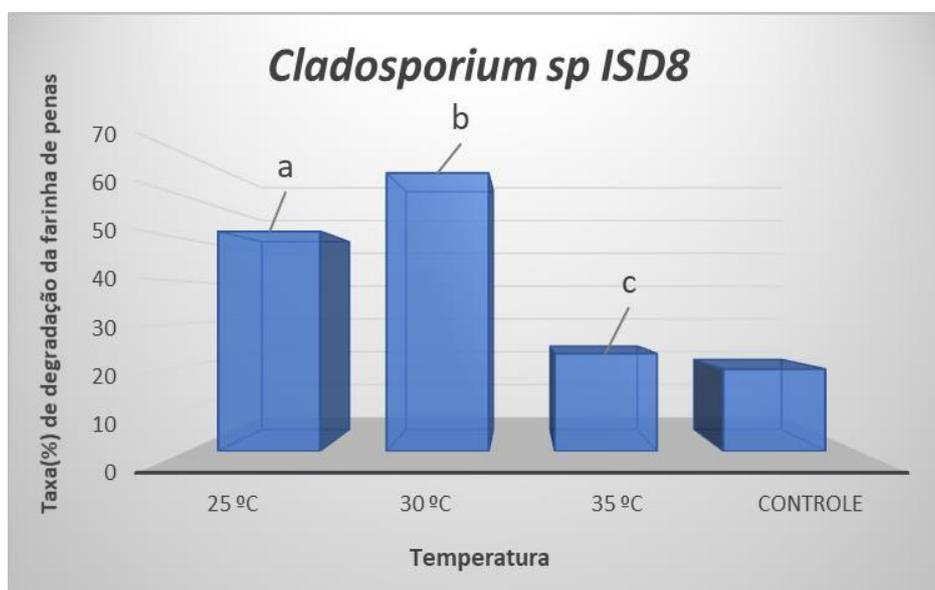
Ferreira et al. (2017) cultivaram fungos do gênero *Aspergillus* sp. isolados do Cerrado e obtiveram o valor de 645 U/mL de atividade colagenolítica, sendo que o meio fermentativo também foi constituído de solução mineral de sais e penas de galinha, na temperatura de 30 °C. Mazotto et al. (2013) usaram em seus experimentos penas de frango como substrato fermentativo, obtendo atividades queratinolíticas de 60 U mL⁻¹ e 172 U mL⁻¹ aos sete dias em fermentação submersa, usando cepas mutantes de *Aspergillus niger*.

O isolado fúngico *Cladosporium* sp. ISD8 também apresentou a melhor taxa de degradação da farinha de penas, acima de 60%, na temperatura de 30 °C. Porém, nas outras duas temperaturas estudadas as taxas de degradação foram inferiores, sendo que na temperatura de 25 °C a taxa de degradação foi cerca de 20% menor (51,73%) e a 35 °C foi observada uma degradação da farinha de penas em torno de 20% apenas, comparável àquela observada no controle (Gráfico 4). Isso indica que, a 35 °C as enzimas sofreram desnaturação térmica, perdendo a capacidade de hidrolisar as queratinas.

Khanam et al. (2004) também observaram que o isolado *Cladosporium* sp. degradou em torno de 40-50% das penas de frango a 28 °C, mostrando

uma maior preferencia do organismo a este substrato do que para cabelo humano. Mohak-kumar (2013) avaliou a capacidade do *Cladosporium* sp. em produzir atividade enzimática de L-asparaginase utilizando resíduos agroindustriais, sendo este processo fermentativo realizado a 30 °C com pH inicial 5,8 por 5 dias, onde o mesmo conseguiu produzir enzimas capazes de degradar o substrato queratinoso.

Gráfico 5: Taxa de degradação (%) da farinha de penas pelo isolado fúngico *Cladosporium* sp ISD8 em diferentes temperaturas sob agitação de 200rpm, no período de 7 dias.



Os resultados mostraram que as enzimas dos isolados fúngicos da restinga de Guaibim-BA atuam na faixa mesófila de temperatura.

Esses resultados são similares aos descritos por outros fungos queratinolíticos. Marcondes et al. (2008) analisaram 106 fungos filamentosos isolados a partir de resíduos de aves de capoeira, para avaliar a produção de proteases queratinolíticas, os quais foram capazes de degradar resíduos de penas como única fonte de carbono e nitrogênio a 28 °C.

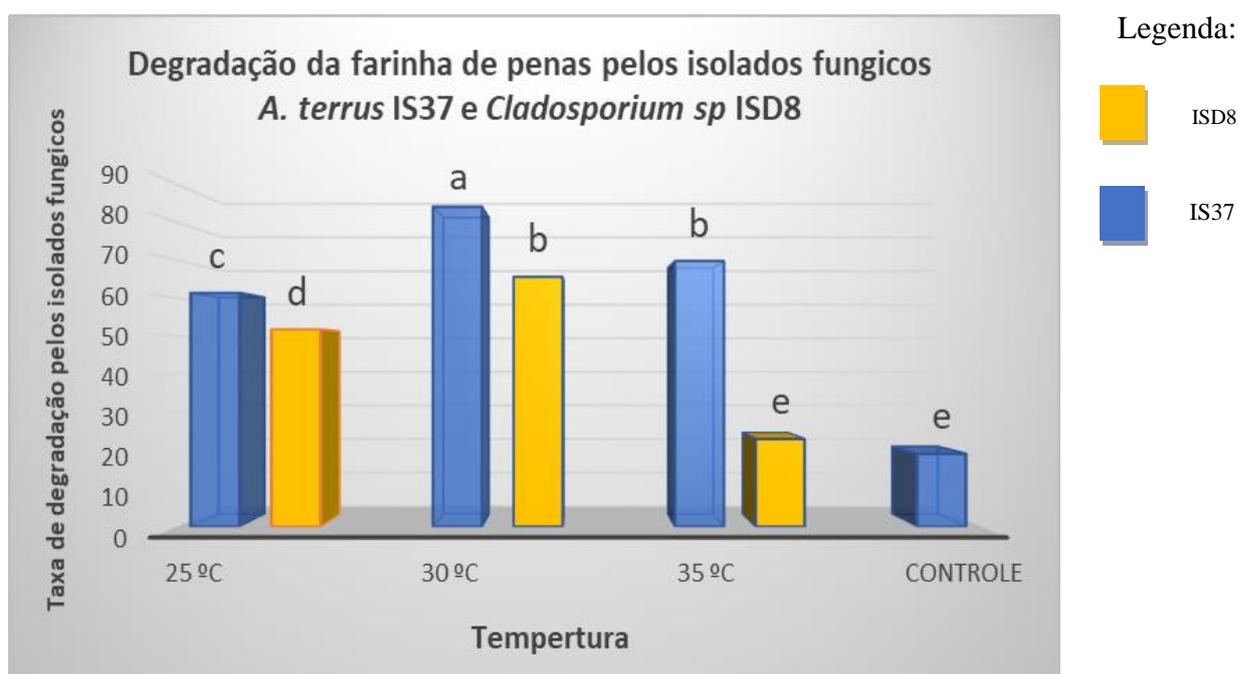
Entretanto, os isolados da restinga de Guaibim apresentaram maior taxa de degradação quando comparado com outras espécies de fungos. Maitig et al. (2018) avaliaram a capacidade do fungo *Aspergillus* sp. em processo fermentativo para produção de proteases com atividade queratinolíticas para a degradação de penas, que variaram entre cerca 36% e 42%.

A temperatura é um parâmetro importante que afeta a sobrevivência, reprodução e o crescimento fúngico, além de auxiliar na regulação da atividade metabólica para secreção de enzimas (SANTIAGO et al., 2016).

Altas temperaturas podem causar danos a membrana celular pela ruptura das pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos e desnaturação enzimática irreversível, conferindo perda de funções e estrutura da membrana, ruptura do DNA e perda de viabilidade celular. Ao contrário, baixas temperaturas causam danos por afetar a membrana de forma a reduzir os processos de regulação e conferir menor fluidez, refletindo em um transporte lento de nutrientes e criando uma membrana densa e bastante rígida. Esse processo reflete no metabolismo, provocando baixa atividade enzimática em detrimento do crescimento lento ou inexistente (MADIGAN et al., 2016).

No Gráfico 6 pode ser observado que o isolado *A. terreus* IS37 foi superior em todas as temperaturas estudadas para a degradação da farinha de penas quando comparado com o isolado *Cladosporium sp* ISD8.

Gráfico 6: Dados comparativos da taxa de degradação (%) da farinha de penas pelo isolados fúngicos *Aspergillus terreus* IS37 e *Cladosporium sp* ISD8 em diferentes temperaturas sob agitação de 200 rpm, no período de 7 dias.



As queratinases se destacam em processos biológicos, por serem de baixo custo e livres de contaminantes, são alternativas de rota ecológica para possibilitar um novo destino aos resíduos agroindustriais, sendo utilizadas em diversas aplicações no mercado enzimático, pois elas apresentam mecanismos que atacam os resíduos queratinosos como a pena e, conseqüentemente, encontram aplicação no desenvolvimento custo-benefício dos subprodutos para alimentação animal e fertilizantes. Sua aplicação também pode ser estendida para indústrias de detergentes e de couro onde servem como enzimas especiais (BAGEWADI et al., 2018).

6.0 Conclusões

- Tanto a agitação quanto a temperatura, nas faixas estudadas, apresentaram influência estatisticamente significativas na taxa de degradação da farinha de penas para ambos os isolados.
- Os isolados apresentaram melhor taxa de degradação da farinha de penas na faixa mesófila de temperatura.
- O aumento da taxa de degradação da farinha de penas foi diretamente proporcional ao aumento da agitação.
- O pH ficou alcalino no final da fermentação, indicando que ocorreu a liberação de aminas, ou seja, ocorreu a degradação da farinha de penas pelos isolados fúngicos.

7.0 Referências Bibliográficas:

ALMATAR, M.; MAKKY, E. A. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. **3 Biotech**, v. 6, p. 4, 2016.

AMIN, F; NAWAZ H; BHATTI, MUHAMMAD B; ASGHER M. Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exopolysaccharide enzyme and

its application in fruit juice clarification. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, n. 2, p. 2016-0256, 2017.

ANBU, P.; GOPINATH S.C.B.; HILDA A.; LAKSHMIPRIYA T.; ANNADURAI G. off off extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopuariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v.18, p.1298-1303, 2007.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, p. 214-220, 2013.

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, p.4828-4839, 2018.

BHATTACHARYA, A. S.; BHATTACHARYA, A.; PLETSCHKE, B. I. Synergism of fungal bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. **Biotechnology Letters**, v.1, p. 13, 2015.

CĂLIN, M. CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D., ALEXANDRESCU, E., RĂUT, I., DONI, M.B., ARSENE, M., OANCEA, F., JECU, L., LAZĂR. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28. p.101-112, 2017.

CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2018.

CASTRO, S. M.; CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 2, p. 87-107, 2012.

COUCH, RD, GAUCHER GM. Rational elimination of *Aspergillus terreus* sulochrin production. **Journal of Biotechnology**, v.108, p.171–177, 2004.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 20-25, 2014.

DESHMUKH, S.K. Keratinophilic fungi on feathers of pigeon in Maharashtra, India. **Revista Mycoses**, v.47, p.213-215, 2004.

DUFOSSÉ, L., FOUILLAUD M., CARO Y., MAPARI S. A., SUTTHIWONG N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion of Biotechnology**, v. 26. pp.56–61, 2014.

ELLAVER, C; COSTA, F. A. C; AVILA, V. S; FRAHA, M; LIMA, G, J, M, M; HACHENHAR, L; BARDIR, P. Substituição de farinhas de origem animal por ingredientes de origem vegetal em dietas para frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 35, p. 671-677, 2005.

FERNÁNDEZ, D.E.R. Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial. **Tese Pós-graduação em Processos Biotecnológicos**), Curitiba, v.1, p.125, 2009.

FERREIRA, C.M.O.; CORREIA, P.C.; BRANDÃO-COSTA, K.M.P.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; Liu, T.P.S.L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F. Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. **Biomedical Chromatography**, v.6. p.25663-25676, 2017.

FREITAS, J.A.S., SILVA, V.R., LUZ, F.B., ZWRITES, A.L. Soil carbon and physicalmechanical properties after successive applications of swine and poultry organic waste. **Agricultural Research in the Tropics**, v. 48, p. 390-398, 2018.

GAUTAM, S. P. et al. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 8, 2018.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A; GOMES, E.R.S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

GUPTA, R.; RAMMANI P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology & Biotecnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.

GUTARRA, M. L. E. Produção de lipase por fermentação no estado sólido: Seleção de fungos protetores e estudo das condições de cultivo. **Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, pp.13-108, 2003.

HARANGOZÓ, G.; ZILAHY, G. Cooperation between business and non-governmental organizations to promote sustainable development. **Journal of Cleaner Production**, v. 89, p. 18-31, 2015.

LIN H.H.; Li-Jung Y.; SHANN-TZONG J. Functional expression and characterization of Keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural Food Chemiatry**. v. 57, p. 5321–5325, 2011.

KHANAM S.J.P.; AGRAWAL S.C.; JAIN P.C. Keratin degrading and enzyme production ability of fungi from soil. **Indian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 261-264, 2004.

KNOB, A. et al. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **Bioresources**, v. 9, p. 5738-5773, 2014.

MADIGAN S, ATKINSON L, LAURIN K, BENOIT D. Attachment and internalizing behavior in early childhood: a meta-analysis. **Revista Psychological Bulletin**, v.142, p.367-399, 2016.

MAITIG, A.M.A., ALHOOT, M.A.M., TIWARI, K. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from Fungal Isolates of Soil. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, p. 2059-2067, 2018

MALAJOVICH, M.A.; Biotecnologia, **Axcel Books**: Rio de Janeiro, 2004.

MAZOTTO, A.M., COURI, S., DAMASO, M.C.T., VERMELHO, A.B. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p.189-195, 2013.

MENEZES, C. P.; PEREZ, A. L. A. de L.; LIMA, E. de O. *Cladosporium spp*: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, v. 1, p. 23-27, 2017.

MOHAN-KUNAR. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium sp.* using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150–158, 2013.

NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends – microbial lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1163-1196, 2012.

NASCIMENTO-FILHO, W. B.; FRANCO, C.R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual Química**, v. 7, p. 1968-1987, 2015.

KIRK P. CANNON P. STALPERS J. **Dictionary of the Fungi**. 9th ed., Wallingford: CAB International, 2008.

OLIVEIRA, M. S; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIÁLE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, p. 7-11, 2009.

PADILHA, M.T.S.; LEBOUTE, E.M.; MACIEL, M.L.C. PADILHA, J.C.F. Utilização de subprodutos de abatedouro de aves como fonte de proteína em

rações para frangos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. v.9, p.203-213, 2005.

PANDYA, J. J.; GUPTE, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.35, p. 769–779, 2012.

PEREIRA JÚNIOR, N.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia**, v. 1. Rio de Janeiro: Escola de Química, 2008.

PEREIRA, A.A., HUNGRIA, M., FRANCHINI, J.C., KASCHUK, G., CHUEIRE, L.M.O., CAMPO, R.J. TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v. 31, p.1397-1412, 2007.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. H. S.; SARMA, P. N. Gram husk-anin expensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1449-1460, 2006.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Editora Universitária, São Paulo, Pelotas v. 3, 2000.

SABER W.I.A.; EL-METWALLY M.M.; EL-HERSH M.S. Keratinize production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. **Research Journal of Microbiology**, v.5 p. 21-35, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa. v.1, p.413, 2004.

SANTIAGO, M; CESÁR A; RICARDO A; PARRA L. et al. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1408, 2016.

SANTOS, R.M.D.B., FIRMINO, A.A.P., de Sá, C.M., FELIX, C.R. Keranolitic activity of *Aspergillus fumigatus*. **Current Microbiology**. v. 33, p.364-370, 2009.

SEBRAE. **O novo ciclo da cana: estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos**. Brasília. v.1, pp.344, 2005.

SOUZA, T.C.; ARAÚJO, C.P.M.; RODRIGUES, J.C.; Filho, R.F.C.; Fernandes, O.C.C. Análise quantitativa da produção de proteases por *Aspergillus spp* e *Penicillium sp* da coleção de fungos da Amazônia - CFAM/FIOCRUZ - AM em diferentes condições de cultivo. **Scientia Amazonia**, v.4. p.107-113, 2015.

SOUZA P. MAGAHÃES P. ALMEIDA R. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

SRIVASTAVA, B., KHATRI, M., SINGH, G., ARYA, S.K. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 252, p. 119-847, 2020.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/portugues/reports.asp>> Acesso em 13/09/2020. 2020.

WANG, B., YANG, W., MCKITTRICK, J., MEYERS, M.A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, p. 229-318, 2016.

ZAFERANLOO, B. et al. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1755-1762, 2014.