

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**DEGRADAÇÃO DA FARINHA DE PENAS EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA
RESTINGA DE GUAIBIM - BA**

CLEILTON SOUSA FROTA

CRUZ DAS ALMAS – BA

MARÇO/2020

**DEGRADAÇÃO DA FARINHA DE PENAS EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA
RESTINGA DE GUAIBIM – BA**

CLEILTON SOUSA FROTA

Dissertação apresentada no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Orientadora: Dr^a. Márcia Luciana Cazetta

Co-orientador: Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach

CRUZ DAS ALMAS – BA

MARÇO/2020

FICHA CATALOGRÁFICA

F941d

Frota, Cleilton Sousa.

Degradação da farinha de penas em fermentação submersa por fungos filamentosos isolados da restinga de Guaibim – BA / Cleilton Sousa Frota. _ Cruz das Almas, BA, 2020.
48.; il.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marcia Luciana Cazetta
Co-Orientador: Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas, Mestre em Microbiologia Agrícola.

1. Compostagem. 2. Biodegradação 3. Resíduo Queratinoso . I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 631.86

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA – UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS- CCAAB
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE
CLEILTON SOUSA FROTA

Prof^a. Dr^a. Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(UFRB)
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Talita Lopes Honorato
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(UFRB)

Dr^a. Aline Simões da Rocha Bispo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(UFRB)

CRUZ DAS ALMAS – BA
MARÇO/2020

DEDICO

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tornar este sonho possível.

Aos meus pais, Maria Fátima Sousa Frota e Clódio Borges Frota pelo apoio nesta jornada.

A minha orientadora professora Dr^a. Marcia Luciana Cazetta pela assistência e paciência durante minha estada na UFRB e no Laboratório de Bioquímica. Sempre disponível, paciente e acessível para sanar minhas dúvidas.

Ao professor Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach pela co-orientação.

Aos meus amigos de mestrado Layana, Mileide, Fernando, Marília e Cris por estarem ao meu lado nos momentos difíceis.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica.

As técnicas de laboratório Lene e Verônica.

A professora Dr^a. Talita Lopes Honorato pela orientação no estágio em docência.

A agroindústria Avigro por ter cedido à farinha de penas para realização do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

FROTA, Cleilton Sousa. Degradação da farinha de penas em fermentação submersa por fungos filamentosos isolados da Restinga de Guaibim – BA

O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne de frango. Projeções mostram que a preferência por esta carne no mercado nacional tende a se elevar nos próximos anos. Durante a produção da carne de frango são geradas grandes quantidades de penas na etapa de abate das aves. Como forma de manejo, a indústria avícola utiliza as mesmas como matéria-prima reciclável para formular a farinha de penas. Esta pode ser aproveitada como ração para animais, porém, quando consumida apresenta baixa digestibilidade devido a queratina presente nas penas. Essa proteína tem como características ser estável e resistente a processos degradativos. No entanto, queratinases extracelulares secretadas por fungos em bioprocessos de fermentação são capazes de hidrolisar as cadeias peptídicas dessa proteína, o que a torna mais digerível. Dessa forma, na segunda parte do presente estudo, nove fungos filamentosos foram utilizados para degradar a farinha de penas em fermentação submersa durante cinco e sete dias de cultivo. Os resultados mostraram que os fungos apresentaram elevado potencial biotecnológico na degradação de um subproduto queratinoso da indústria avícola. Assim, podem ser explorados na produção de compostos com aplicações industriais que ajudam a melhorar a digestibilidade de rações que contém moléculas complexas como, a queratina, em sua composição.

Palavras-chave: agroindústria, biodegradação, hidrolisados de queratina

ABSTRACT

FROTA, Cleilton Sousa. Degradation of feather meal in submerged fermentation by filamentous fungi isolated from Restinga de Guaibim – BA

Brazil ranks second in the world ranking of chicken meat production. Projections show that the preference for this meat in the national market tends to increase in the coming years. During the production of chicken meat, large amounts of feathers are generated during the slaughter of birds. As a way of handling, the poultry industry uses them as recyclable raw material to formulate feather meal. This can be used as animal feed, however, when consumed it presents low digestibility due to the keratin present in the feathers. This protein has the characteristics of being stable and resistant to degradative processes. However, extracellular keratinases secreted by fungi in the fermentation bioprocess are capable of hydrolyzing the peptide chains of this protein, which makes it more digestible. Thus, in the second part of the present study, nine filamentous fungi were used to degrade the feather meal in submerged fermentation during five and seven days of cultivation. The results showed that the fungi had a high biotechnological potential in the degradation of a keratinous by-product of the poultry industry. Thus, they can be explored in the production of compounds with industrial applications that help to improve the digestibility of diets that contain complex molecules such as keratin in its composition.

Keyword: agribusiness, biodegradation, keratin hydrolysates

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Oferta e demanda de carne de frango no Brasil no período de 2011 a 2022.....3

Figura 2 - (A) Desenho esquemático da formação de filamento intermediário de α -queratina: (B) Estrutura dos filamentos de β -queratina: modelo bola-e-bastão da cadeia polipeptídica e ilustração das folhas- β -pregueadas.....6

Figura 3 - Ação sinérgica de endoproteases, exoproteases, oligopeptidases e dissulfeto redutases no processo de degradação da queratina.....7

CAPÍTULO 2:

Produção de hidrolisados a base de queratina em fermentação submersa.....17

Figura 1 – Degradação da farinha de penas em monocultura por isolados fúngicos a 30 °C em pH 6,5 a 150 rpm após cinco dias. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.....23

Figura 2 – Degradação da farinha de penas em monocultura por isolados fúngicos a 30 °C em pH 6,5 a 150 rpm após sete dias. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.....23

Figura 3 – Elevação do pH após a degradação da farinha de penas em fermentação submersa após 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente.....27

Figura 4 – Degradação da farinha de penas em monocultura por extrato bruto após 24, 48, 72 e 96 horas. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente.....28

Figura 5 – Degradação da farinha de penas em monocultura a 30 °C em pH 6,5 a 100, 150 e 200 rpm após sete dias. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente.....31

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 2:

Produção de hidrolisados a base de queratina em fermentação submersa 17

Tabela 1 - Variáveis com valores codificados e reais para avaliar os efeitos da agitação (X₁) e pH (X₂) na degradação da farinha de penas..... 21

Tabela 2 – Análise de variância da degradação da farinha de penas em monocultura por isolados após cinco dias 23

Tabela 3 – Análise de variância da degradação da farinha de penas em monocultura por isolados após sete dias 24

Tabela 4 – Degradação da farinha de penas em co-cultura a 30 °C em pH 6,5 a 150 rpm durante sete dias 26

Tabela 5 – Valores médios de pH no fim da degradação da farinha de penas em monocultura a 30 °C em pH 6,5 a 150 rpm durante sete dias..... 27

Tabela 6 – Matriz do delineamento com valores codificados, reais e seus resultados obtidos com a degradação da farinha de penas por fungos filamentosos..... 29

Tabela 7 – Análise de variância dos isolados *Acremonium* sp. IS21.1, *Trichoderma* sp. IS57 e *Lecanicillium* sp. IS5.2 após sete dias de fermentação na farinha de penas..... 30

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
1 Indústria avícola brasileira e a farinha de penas.....	3
2 Queratinas.....	5
3 Proteases e suas aplicações biotecnológicas.....	8
4 Proteases produzidas por fungos.....	10
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 2	16
Produção de hidrolisados a base de queratina em fermentação submersa	17
RESUMO	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
Obtenção da farinha de penas e isolados fúngicos.....	19
Pareamento de culturas.....	19
Avaliação da degradação em monocultura e co-cultura.....	20
Análise do pH.....	20
Ensaio de hidrólise enzimática utilizando o extrato bruto	21
Otimização da degradação utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
Degradação em monocultura.....	22
Degradação em co-cultura.....	25
Análise do pH.....	26
Hidrólise enzimática utilizando o extrato bruto.....	28
Otimização da degradação utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
AGRADECIMENTOS	31

REFERÊNCIAS..... 32

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria avícola no decorrer da produção da carne de frango gera inúmeros subprodutos e, dentre eles, as penas se destacam devido à grande quantidade produzida na etapa de abate das aves. Como forma de manejo, estas por sua vez passam por processos mecânicos e térmicos para produzir a farinha de penas. Além de ser uma manobra menos nociva ao meio ambiente, também se trata de uma forma de aproveitamento, já que pode ser utilizada como ração para animais. No entanto, a queratina contida nas penas proporciona baixa digestibilidade da farinha de penas (MAPA, 2008; LASEKAN et al., 2013; DAROIT & BRANDELLI, 2014).

Vários métodos podem ser empregados para degradar substratos queratinosos, porém, a degradação realizada em fermentação submersa por fungos filamentosos é uma alternativa viável e baixo custo que melhora a disponibilidade de proteínas e os torna mais digerível. Assim, quando empregados na dieta das aves, ajuda a reduzir os custos de produção, pois pode substituir parcial ou totalmente alguns ingredientes que possuem custo expressivo como, por exemplo, o milho, principal insumo usado como ingrediente da ração que tem seu valor de mercado influenciado por inúmeros fatores, dentre eles, climáticos e cotação do dólar (GUPTA & RAMNANI 2006; HOLKAR et al., 2018; AGROMOVE, 2019).

Durante a fermentação os fungos secretam queratinases extracelulares que hidrolisam a queratina. A hidrólise ocorre de forma suave, preservando e liberando componentes nutricionais importantes. Portanto, a degradação por fungos filamentosos de resíduos nos quais predominam a queratina, se apresenta como uma alternativa economicamente viável que contribui na digestibilidade de moléculas complexas (BOHACZ & KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, 2019).

Em virtude disso, primeiramente foi realizada uma revisão bibliográfica para obter na literatura informações sobre a produção brasileira de carne de frango, queratina e sua composição, proteases e aplicações biotecnológicas, assim como as secretadas por fungos, e na segunda parte nove fungos filamentosos isolados da Restinga de Guaibim, Bahia, foram utilizados para degradar a farinha de penas em fermentação submersa.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

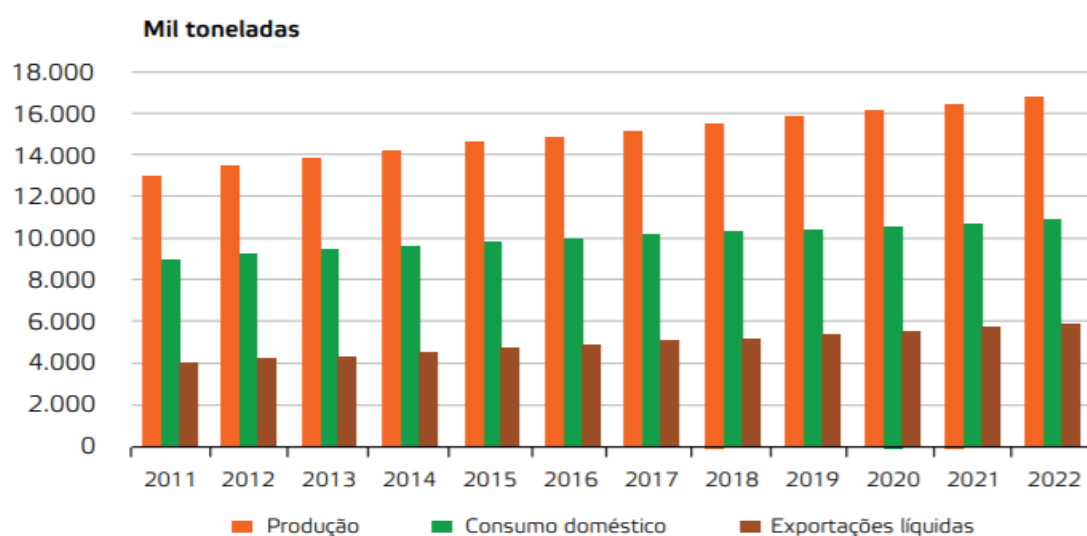
1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Indústria avícola brasileira e a farinha de penas

O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne de frango, atrás dos Estados Unidos. Em 2016 a produção brasileira foi de 12,90 milhões de toneladas, com consumo doméstico de 46 Kg por habitante (CNA, 2016). Segundo a Avinews Brasil, em 2017 a produção totalizou 13,056 milhões de toneladas, crescimento de 1,2%. Em 2019, a produção brasileira de carne de frango cresceu 2,3%, o que corresponde a 13,9 milhões de toneladas produzidas (AVINEWS BRASIL, 2019).

O consumo doméstico em 2019 retraiu 2% e as exportações cresceram entre 4 e 5% (AVINEWS BRASIL, 2019). Algumas projeções têm sido bem positivas para indústria avícola, isso porque, a produção, exportação e preferência pela carne de frango no Brasil tende a se elevar pelos próximos anos como mostra a Figura 1 (OUTLOOK BRASIL, 2012).

Figura 1 – Oferta e demanda de carne de frango no Brasil no período de 2011 a 2022.



Fonte: Outlook Brasil - projeções para o agronegócio (2012).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017), no primeiro trimestre de 2017 foram abatidas 1,48 bilhão de cabeças de frango, aumento de 5,1% em relação ao último trimestre de 2016. Na comparação com o mesmo trimestre do ano anterior, houve aumento de 0,3%, o que mostra crescimento no número de abates. Nessa etapa, Lasekan et al., (2013) afirmam que, além da carne, são geradas vísceras, pés, cabeças, ossos, sangue e penas, sendo que, as penas correspondem aproximadamente a 10% desses subprodutos.

As penas representam de 5 a 10% do peso corpóreo das aves, e, segundo o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (2012), são geradas aproximadamente 18,5 toneladas de penas em uma unidade industrial com capacidade de abate médio de 165 mil aves/dia. Portanto, após o abate das aves esse subproduto é bastante abundante e possui forte potencial para causar impactos ambientais.

Segundo a Política Nacional de Resíduos Sólidos, Lei 12.305, de 02 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010)

Na gestão e gerenciamento de resíduos sólidos, deve ser observada a seguinte ordem de prioridade: não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos.

O objetivo dessa lei é de conscientizar as indústrias brasileiras sobre as questões ambientais e indicar caminhos para a utilização de subprodutos gerados em suas atividades na forma de resíduos como matérias-primas recicláveis. Dessa forma, a indústria avícola, por meio do processo de cocção sob pressão e moagem das penas, produz a farinha de penas (MAPA, 2008). Essa alternativa se trata de uma forma de manejo e também de aproveitamento, visto que, a farinha de penas pode ser empregada na alimentação das aves, o que contribui na diminuição dos custos de produção da indústria avícola. Segundo Carvalho (2012) a alimentação das aves representa aproximadamente 70% dos custos de produção.

O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (2018) afirma que os custos de produção da indústria avícola brasileira quando comparado com 2017 tiveram uma elevação, devido o milho, principal insumo usado como ingrediente da ração, ter seu preço elevado com a alta do dólar em 2018. Por isso, existe interesse na utilização da farinha de penas para nutrição animal. Porém, apesar de possuir 84% de proteína bruta, ser livre de materiais estranhos e microrganismos patogênicos, a

farinha de penas não pode ser a única fonte proteínica na alimentação dos animais devido a baixa digestibilidade da farinha de penas ocasionada pela queratina presente nas penas. A queratina é uma proteína estável e resistente devido a pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas dentro da sua molécula, além das pontes de enxofre presentes na cistina (ONIFADE et al., 1998; MAPA, 2008; DAROIT & BRANDELLI, 2014).

Quando a farinha de penas é utilizada como única fonte de proteína pode ocorrer danos a saúde dos animais devido a pouca disponibilidade de seus nutrientes. Dessa maneira, para que seja aplicada como ração é necessário melhorar a sua qualidade nutricional. Por isso, é necessário hidrolisar a queratina para tornar seus nutrientes mais disponíveis aos animais (ROCHA & SILVA, 2004).

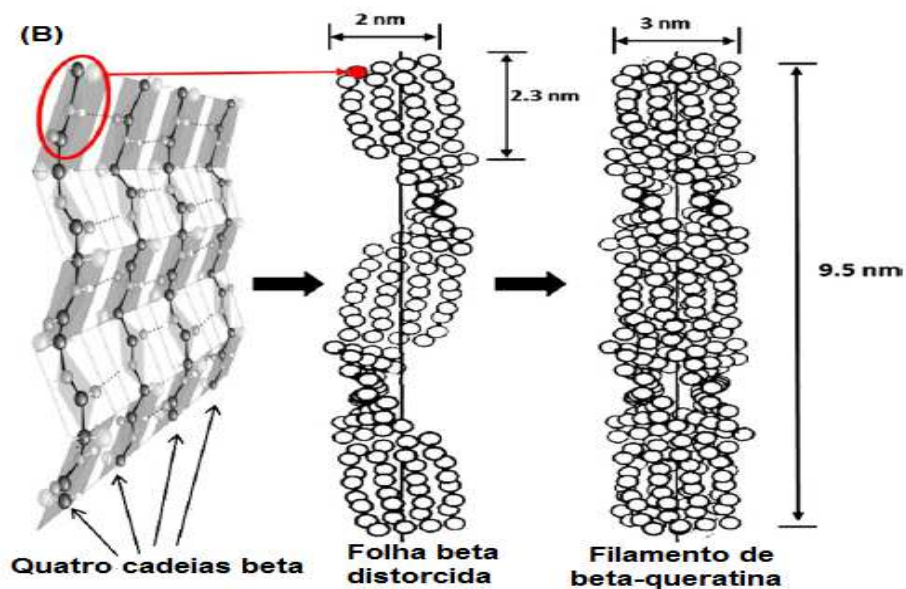
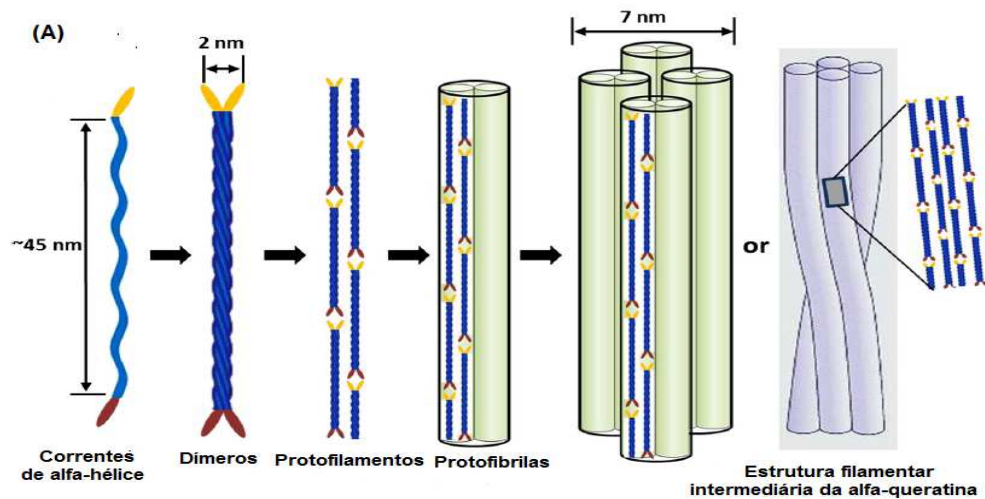
2 Queratinas

Queratinas são polímeros que pertencem à superfamília de proteínas de filamentos intermediários, com características estruturalmente fibrosas, insolúveis e recalcitrantes. Além de estar presente nas penas, também pode ser encontrada na pele, cabelo, lã, chifres, cascos, cravinhos, unhas, bicos, entre outros. Todos os materiais queratinosos possuem uma mistura da alfa (α) e beta (β) queratina. Nas penas, por exemplo, é possível encontrar α e β -queratinas em diferentes partes além da presença de queratina amorfa (ONIFADE et al., 1998; MCKITTRICK et al. 2012; NG et al., 2014; WANG, 2016).

Na α -queratina o esqueleto polipeptídico se dispõe de forma ordenada ao redor de um eixo helicoidal (α -hélice), estabilizado por pontes de hidrogênio, contribuindo para a formação de uma estrutura bastante rígida. As cadeias de α -hélice se torcem dando origem aos dímeros, que se juntam para formar os protofilamentos; em seguida, pares de protofilamentos se associam formando as protofibrilas, as quais se agregam para formar os filamentos intermediários de α -queratina. A β -queratina, por sua vez, apresentam uma conformação estendida em folhas β -pregueadas (Figura 2). Ambas possuem resistência mecânica e proteolítica, porém, a β -queratina, é mais facilmente degradada do que a α -queratina porque possui bem menos ligações dissulfeto. Os resíduos queratinosos, quando degradados, se tornam uma fonte de

proteínas de baixo custo, rica em aminoácidos (ONIFADE et al., 1998; WANG et al., 2016; MA et al., 2016).

Figura 2: (A) Desenho esquemático da formação de filamento intermediário de α -queratina: (B) Estrutura dos filamentos de β -queratina: modelo bola-e-bastão da cadeia polipeptídica e ilustração das folhas- β -pregueadas.

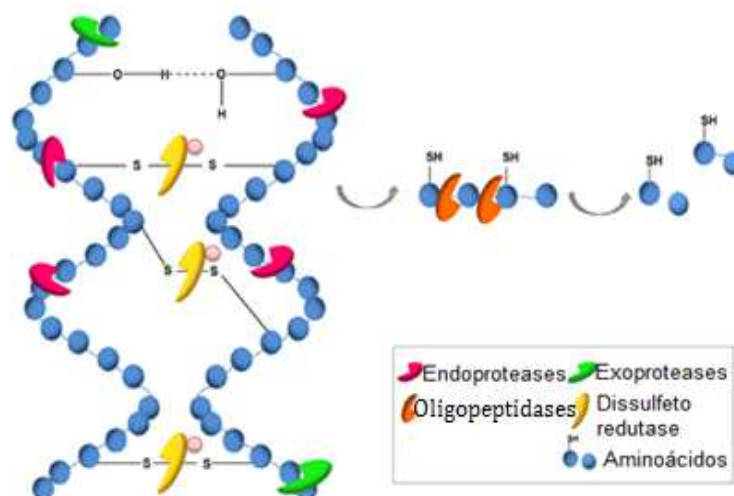


Fonte: WANG et al. (2016).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para degradar a queratina e os mais conhecidos são: hidrólise sob pressão, hidrólise enzimática e hidrólise química. Os procedimentos hidrotermais que são utilizados na hidrólise da queratina afetam no conteúdo nutricional do hidrolisado queratinoso resultante, isto é, ocorre a perda de aminoácidos termossensíveis, tais como, metionina, lisina, tirosina e triptofano. Os agentes microbianos são mais econômicos para atuarem no processo de degradação da queratina. O processo de degradação enzimática realizada por microrganismos ocorre suavemente e preserva aminoácidos essenciais. A hidrólise enzimática é predominantemente realizada por proteases (queratinases) extracelulares, secretadas por microrganismos que utilizam a queratina como substrato. A maior parte das queratinases depende da queratina como indutor exógeno para atuarem (ONIFADE et al., 1998; HOLKAR et al., 2018).

As queratinases atuam em pontos distintos durante a hidrólise da queratina (Figura 3). As endopeptidases clivam a queratina em regiões que ficam distantes das extremidades amino- e/ou carboxi-terminal, e com isso, geram peptídeos maiores; as exoproteases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino- (N) e/ou carboxi-terminal (C), produzindo pequenos peptídeos; a dissulfeto redutases atuam na quebra das ligações de dissulfeto; e as oligopeptidases promovem a liberação dos resíduos de aminoácidos (RAO et al., 1998).

Figura 3: Ação sinérgica de endoproteases, exoproteases, oligopeptidases e dissulfeto redutases no processo de degradação da queratina.



Fonte: LANGE et al., 2016.

As proteases hidrolisam as pontes dissulfeto e a queratina passa a ser utilizada pelo microrganismo como fonte de nitrogênio e carbono sem afetar negativamente os nutrientes, uma vez que, a degradação enzimática ocorre suavemente. Após a ação, o substrato queratinoso se torna uma excelente fonte de proteínas e aminoácidos, além disso, as proteases podem ter inúmeras industriais (Błyskal, 2009; Călin et al. 2017; Bohacz & Kornikowicz-Kowalska, 2019).

3 Proteases e suas aplicações biotecnológicas

Proteases são enzimas produzidas por animais, plantas e microrganismos que hidrolisam as ligações peptídicas de proteínas, o que ocasiona a liberação de aminoácidos e peptídeos. Dependendo do sítio de ação, se classificam em dois tipos principais: exopeptidases (exercem sua ação próximo às extremidades amino e carboxi-terminais) e endopeptidases (ação nas regiões internas da cadeia polipeptídica). As proteases também são classificadas de acordo com as condições de pH em que são ativas, ácidas, neutras ou básicas, e conforme o substrato que degradam, por exemplo, colágeno (colagenase), elastina (elastase), queratina (queratinase) (RAO et al., 1998; GUPTA et al., 2002).

As proteases microbianas podem ser produzidas por fungos, bactérias e vírus. As de origem bacteriana podem ser neutras e alcalinas, porém, as neutras são mais termossensíveis e ativas em uma faixa de pH de 5 a 8. Contudo, os fungos se destacam na produção de proteases do que bactérias porque secretam uma variedade maior de enzimas, por exemplo, o *Aspergillus oryzae* pode produzir proteases ácidas, neutras e alcalinas. Além disso, as proteases fúngicas podem ser ativas em uma ampla faixa de pH que vai de 4 a 11. As proteases virais possuem grande importância na área da medicina, pois estão envolvidas funcionalmente no processamento de proteínas de vírus que provocam doenças fatais, como a AIDS e o câncer (RAO et al., 1998).

No mercado mundial de enzimas as proteases microbianas representam uma quota de dois terços da produção comercial de enzimas. As proteases microbianas chegam a aproximadamente 60% do total de venda de enzimas em todo

o mundo. Por ano estima-se que as vendas mundiais de enzimas industriais chegam a US \$ 300-600 milhões (RAI et al., 2010; SAVITHA et al., 2011).

As enzimas podem ser intracelulares ou extracelulares. As intracelulares têm importância em diversos processos celulares e metabólicos, como esporulação e diferenciação, renovação de proteínas, maturação de enzimas e hormônios e manutenção do conjunto de proteínas celulares. As extracelulares hidrolisam proteínas fora do ambiente intracelular, isso permite que a célula possa absorver e utilizar os produtos clivados. A partir disso, diversos processos industriais exploram as proteases extracelulares comercialmente com o objetivo de degradar proteínas. Em termos gerais, o processo é simplificado porque o produto extracelular é secretado no meio externo (BUCHHOLZ et al., 2000; SAVITHA et al., 2011).

Dessa maneira, as proteases extracelulares podem ser utilizadas em diversas indústrias como de alimentos, bebidas, medicamentos, têxtil, entre outras. Na indústria de detergentes, as proteases neutras e alcalinas têm ótimo potencial para aplicação e também podem ser usadas para o curtimento do couro. O biotratamento do couro com enzimas traz como vantagens: fácil controle e redução no desperdício de materiais e nos impactos ambientais devido a redução na quantidade de produtos químicos usados no processamento do couro (LADEIRA et al., 2010; JISHA et al., 2013; GUPTA et al., 2013).

Nas indústrias, fungos e bactérias são os mais utilizados em processos industriais porque apresentam ampla diversidade bioquímica e viabilidade da produção em larga escala, por isso, o interesse nas aplicações biotecnológicas das proteases de origem microbiana. As proteases fúngicas apresentam alta diversidade, vasta especificidade a substratos e são estáveis em condições intensas de pH e temperatura. As enzimas fúngicas são usadas para modificar as proteínas de alimentos, já as de origem bacteriana têm relevância comercial nas indústrias de detergentes, alimentos, couro e seda devido a sua elevada capacidade de produção e atividade catalítica (JISHA et al., 2013).

No setor de laticínios, as aplicações de proteases microbianas ajudam na coagulação do leite durante a fabricação de queijos, o que por sua vez, substitui o coalho, retirado do rúmen de bezerros. As proteases que podem ser utilizadas nesse processo podem ser produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* e fungos. Alguns alimentos quando processados, ocorre a redução de proteínas que reduz a capacidade de reter água e gordura, além de afetar a sua solubilidade e capacidade

emulsificante. Devido a isso, a indústria de alimentos tem recorrido a ação de enzimas para hidrolisar proteínas, tanto para não reduzir o valor nutricional, quanto para modular a funcionalidade das proteínas (SANCHEZ & DEMAIN, 2011).

As proteases também melhoram a digestibilidade e qualidade sensorial dos alimentos e ajuda a reduzir compostos alergênicos nos mesmos, o que induz a uma tendência global na utilização de proteases em diversos setores industriais. Na formulação de detergentes, 17% do mercado mundial têm feito o uso de proteases em seus processos de produção, assim como 8% das indústrias de couro usam proteases alcalinas como agentes de deformação do couro. Como são amplas as diversidades de proteases, as atenções dos pesquisadores de todo o mundo estão voltadas as suas aplicações biotecnológicas (TAVANO, 2013).

Bacillus licheniformis e *Bacillus subtilis* secretam proteases alcalinas que podem ser utilizadas para fabricar detergentes, que também pode ser empregadas na indústria de couro e no processamento de carnes e pescado. As proteases produzidas pela *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* possuem aplicação no setor de bebidas e panificação. Entretanto, as proteases fúngicas são bastante utilizadas na fabricação de pães, fabricação de cervejas, produção de queijos, amaciamento de carnes e produção de hidrolisados funcionais. O fungo *Aspergillus oryzae* possuem a capacidade de produzir proteases ácidas e neutras que podem ser empregadas para processar carne e pescado, cervejas e pão, além disso, suas proteases têm aplicação na indústria farmacêutica. O uso oral de suas enzimas ajuda a corrigir síndromes associadas a limitações de enzimas líticas (RAO et al., 1998).

Em virtude dos fatos mencionados, percebe-se que uso de proteases microbianas extracelulares indicam caminhos promissores para a valorização de produtos ou subprodutos produzidos industrialmente, o que não somente contribui para economia global, mas também para preservação do meio ambiente

4 Proteases produzidas por fungos

Os fungos crescem em diferentes condições ambientais de tempo, temperatura, pH, e são passíveis a diferentes nutrientes do meio em bioprocessos. As proteases de origem fúngica chamam bastante atenção devido à alta variedade, ampla diversidade de substratos, estáveis em condições extremas e fácil separação do micélio por meio do processo de filtração simples e possibilidade de obter uma

elevada concentração de enzimas. Com isso, uma diversidade de cepas fúngicas tem sido estudadas e utilizadas para produzir proteases que pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, entre outros (HAJJI et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

A utilização de fungos no processo de produção de enzimas tem como vantagens o baixo custo com matéria-prima, alta produtividade, e as enzimas podem ser facilmente modificadas e recuperadas do meio de cultura por serem, em geral, extracelulares. Quando comparada com as proteases bacterianas, as fúngicas têm como vantagem, além da remoção de micélio, oferecer segurança, pois a maioria dos fungos é reconhecido como seguro (GRAS - Generally Recognized as Safe) (GERMANO et al., 2003; MANDUJANO-GONZALEZ et al., 2016).

As enzimas que eles secretam são ativas em faixa de pH de 4 a 10 e podem ser ácida, neutra ou alcalina. Para as ácidas o pH ótimo está entre 4 e 4,5 e apresentam estabilidade entre pH 2,5 e 6,0. As que possuem alta atividade e estabilidade em pH ácido têm importantes aplicações industriais, com destaque para a indústria alimentícia. O potencial para aplicação comercial das proteases fúngicas aspárticas ou ácidas foi atestado após uma análise de suas características bioquímicas e propriedades. Algumas têm sido utilizadas para degradar as proteínas que são responsáveis por causar a turbidez em bebidas como sucos e vinhos (RAO et al., 1998; MANDUJANO-GONZALEZ et al., 2016).

Os fungos *Graphium putredinis* e *Trichoderma harzianum* secretam proteases que servem como aditivo para detergentes, pois ajudam na remoção de manchas das roupas. Eles são capazes de produzir proteases estáveis e altamente reativas mesmo com adição de aditivos químicos utilizados na formulação de detergentes. Tal aplicação ajuda a reduzir o volume de detergente durante seu uso. Já o *Aspergillus oryzae* produz endo e exoproteinasas que podem ser utilizadas na indústria de panificação com a finalidade de diminuir o tempo de mistura da massa e aumentar o volume do pão. As proteases fúngicas alcalinas e neutras também podem agregar valor ao molho e a outros derivados da soja, melhorando a solubilidade, rendimento protéico e sabor amargo (RAO et al., 1998; SAVITHA et al., 2011).

As proteases fúngicas não somente agregam valor aos produtos industriais, também podem ser utilizadas em processos de sanitização dos equipamentos da indústria de laticínio. Isso porque foram encontrados vários fungos capazes de produzir proteases que ajudam a remover incrustações nos tanques de tratamento

térmico do leite, o que contribui positivamente para o meio ambiente, pois produtos químicos e consumo energia durante procedimento de limpeza diminuem com o tratamento enzimático (BOYCE & WALSH, 2012).

Devido a possibilidade da aplicação de proteases fúngicas em diversos setores da indústria, Souza et al., (2015) isolaram e identificaram várias espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecylomices* com forte potencial para produzir protease extracelular por meio de fermentação submersa.

Corrêa et al., (2014) afirmam que as indústrias preferem por fungos na produção de enzimas por serem excelentes produtores de proteases extracelulares e capazes de secretar uma variedade de enzimas, tais como, catalase, celulase, fitase, entre outras. Lange et al., (2016) destacam que espécies de fungos não-patogênicos produtores de queratinases tem sido pouco explorados no processo de degradação de substratos queratinosos como, penas. Neste contexto, utilizar fungos em processos biotecnológicos é uma alternativa viável e de baixo custo que pode atender às necessidades econômicas da indústria em processos de produção devido a sua versatilidade metabólica.

REFERÊNCIAS

AGROMOVE. Principais fatores que influenciam os preços do milho e soja no mercado brasileiro. 2019. Disponível em: <https://blog.agromove.com.br/principais-fatores-precos-milho-soja/>. Acesso em: 30/08/2019.

AVINEWS BRASIL. Brasil: Produção de carne de frango cresce 1,2% em 2017. Disponível em: <https://avicultura.info/pt-br/brasil-producao-carne-de-frango-2017/>. Acesso em: 06/09/2018.

AVINEWS BRASIL. USDA: Brasil deverá produzir 2,3% mais carne de frango em 2019. 2018. Disponível em: <https://avicultura.info/pt-br/usda-brasil-carne-de-frango-2019/>. Acesso em: 06/09/2018.

AVINEWS BRASIL. Carne de frango: exportações crescem e consumo doméstico retrai no Brasil em 2019. 2019. Disponível em: <https://avicultura.info/pt-br/mercado-frango-brasil-2019/>. Acesso em: 01/09/2019.

BRASIL. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. 2018. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/frangoperspec2018comexcedentesetorde-pendera-de-bom-desempenho-das-exportacoes.aspx>. Acesso em: 10/09/2018.

BRASIL. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. 2016. <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/carnederangoprodu%C3%A7%C3%A3oumter%C3%A7o-maior-em-2027>. Acesso em: 06/09/2018.

BRASIL. Lei Nº 12.305 de 02 de agosto de 2010. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília: Diário Oficial da União, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 34 de 28/05/2008 /MAPA**. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2008-05-28-34>. Acesso em: 06/09/2018.

BRASIL. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agenciasaladeimprensa/2013agenciadenoticias/riass/10217abatesdefrangossuinosebovinosaumentouno1tride2017frenteaoespomopriodode2016>. Acesso em: 06/09/2018.

BRASIL. IPEA- Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília, 2012.

BOYCE, A.; WALSH, G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. **Chemosphere**, [s.l.], v. 88, n. 2, p. 211-218, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.022>.

BOHACZ, J., & KORNÍŁŁOWICZ-KOWALSKA, T. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 119-128, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>.

BŁYSKAL, B. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p.631-653, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.006>.

CĂLIN, MARIANA et al., (2017). Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnology**, n. 28, p. 101-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.05.007>.

CARVALHO, C. M. C.; FERNANDES, E. A.; CARVALHO, A. P.; CAÍRES, R. M.; FAGUNDES, N. S. Uso de farinhas de origem animal na alimentação de frangos de corte. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**. p. 69-73, 2012.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 41, n. 10, p.1467-1478, 13 ago. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>.

DAROIT, D. J., & BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, 34(4), 372–384, 2014. <https://10.3109/07388551.2013.794768>.

GERMANO, S. et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 246-251, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00283-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00283-1).

GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9931-9940, 2013. <http://10.1007/s00253-013-5292-0>.

GUPTA, R. & RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 21-33, 4 jan. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>.

HAJJI, M.; HMIDET, N.; JELLOULI, K. Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1746–1752, 2010. <http://10.1016/j.procbio.2010.07.005>.

HOLKAR, C. R. JAIN, S. S., JADHAV, A. J., & PINJARI, D. V. et al. Valorization of keratin based waste. **Process Safety and Environmental Protection**, [s.l.], v. 115, p. 85-98, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.045>.

JISHA, V.N. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances In Enzyme Research**, [s.l.], v. 01, n. 03, p. 39-51, 2013. Scientific Research Publishing, Inc. <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2013.13005>.

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552-565, 2013.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P.K. Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 100, n. 5, p. 2083-2096, 12 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7262-1>.

MA, B.; QIAO, X., HOU, X., & YANG, Y. Pure keratin membrane and fibers from chicken feather. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 89, p. 614-621, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.039>.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. et al. Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 76-82, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.10.003>.

MCKITTRICK, J.; CHEN, PY; BODDE, S.G.; NOVITSKAYA, M. The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin. **Jom**, [s.l.], v. 64, n. 4, p. 449-468, abr. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11837-012-0302-8>.

NG, C. S.; FANWL, YAN J.; CHEN, L.; WU, SM.; MAO, CT; CHEN, J.J.; LU, MY; HO, M. R.; WIDELITZ, R. B.; CHEN, C. F.; CHUONG, C. M.; LI, WH. Genomic Organization, Transcriptomic Analysis, and Functional Characterization of Avian α - and β -Keratins in Diverse Feather Forms. **Genome Biology and Evolution**, [s.l.], v. 6, n. 9, p. 2258-2273, 24 ago. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evu181>.

ONIFADE, A. A; AL-SANE N.A.; AL-MUSALLAM A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 1-11, out. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00033-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00033-9).

Outlook Brasil 2022: Projeções para o agronegócio. <http://icna.org.br/sites/default/files/artigo/Outlook%20Brasil%202022.pdf>. Acesso em: 05/09/2018.

RAI, S. K. AND A. K. MUKHERJEE, "Statistical Optimization of Production, Purification and Industrial Application of a Laundry Detergent and Organic Solvent-stable Subtilisin-like Serine Protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. **Biochemical Engineering Journal**, p. 48-173, 2010. <http://10.1016/j.bej.2009.09.007>.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998. PMC98927.

ROCHA T. C.; SILVA, B. A. N. Utilização da Farinha de Penas na Alimentação de Animais Monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, Artigo Número 5. p. 35-43, 2004.

SAVITHA, S. et al. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 298-304, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2010.05.012>.

SOUZA, P. M. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 337-346, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-838246220140359>.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p.224-230, 2011.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p1–11, 2013.

WANG, B. et al. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, [s.l.], v. 76, p. 229-318, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS A BASE DE QUERATINA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Artigo seguindo as normas de formatação da revista Acta Scientiarum. Biological Sciences.

DEGRADAÇÃO DA FARINHA DE PENAS

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS A BASE DE QUERATINA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Cleilton Sousa Frota^{1*}, Phellippe Arthur Santos Marbach² e Marcia Luciana Cazetta³

^{1,2}Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB); ³Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC). Rua Rui Barbosa, 710, CEP: 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Autor correspondente: E-mail: ksffrota@gmail.com

RESUMO

Este estudo teve como objetivo degradar a farinha de penas durante cinco e sete dias com nove fungos filamentosos isolados da Restinga de Guaibim, Bahia, em fermentação submersa. Os melhores resultados foram obtidos após sete dias de degradação e nesse intervalo os fungos *Lecanicillium* sp. IS5.2, *Acremonium* sp. IS21.1, *Trichoderma* sp. IS57, *Fusarium* sp. IS98 e *Purpureocillium* sp. IS35, em média degradaram 70% da farinha de penas. Testes em co-cultura foram realizados buscando aumentar as taxas de degradação da farinha de penas. No entanto, não houve crescimento nos percentuais de degradação, pelo contrário, os fungos com os melhores resultados em monocultura quando combinados tiveram sua porcentagem de degradação reduzida. Também foram feitos ensaios adicionando na farinha de penas o extrato bruto do *Trichoderma* sp. IS57, *Acremonium* sp. IS21.1 e *Lecanicillium* sp. IS5.2 para avaliar a hidrólise do substrato queratinoso nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. A degradação foi crescente e o tempo de exposição da farinha de penas ao extrato teve influência significativa nas taxas de degradação. O extrato produzido pelo *Acremonium* sp. IS21.1 obteve maior destaque, pois em 96 horas degradou 34% da farinha de penas. Portanto, por meio do presente estudo foi possível constatar o potencial biotecnológico dos fungos e produzir compostos que podem ser utilizados em futuros estudos para avaliar sua aplicação como, ração para animais, biofertilizantes e bioinseticidas.

Palavras-chave: biodegradação, substrato queratinoso, proteína

INTRODUÇÃO

35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67

O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos. Em 2016 a produção brasileira foi de 12,90 milhões de toneladas, com consumo doméstico de 46 Kg por habitante (Confederação da Agricultura e Pecuária, 2016). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017), no primeiro trimestre de 2017 foram abatidas 1,48 bilhão de cabeças de frango, aumento de 5,1% em relação ao último trimestre de 2016. Em 2019, a produção brasileira de carne de frango cresceu 2,3%, o que corresponde a 13,9 milhões de toneladas de carne (Avinews Brasil, 2018). Apesar de ocorrer uma retração de 2% no consumo doméstico em 2019, as exportações cresceram entre 4 a 5% (Avinews Brasil, 2019).

Na etapa de abate das aves, além da carne, Lasekan, Bakar, e Hashim (2013) afirmam que são geradas vísceras, pés, cabeças, ossos, sangue e penas, sendo que, as penas correspondem aproximadamente a 10% desses subprodutos. De acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (2012), são geradas aproximadamente 18,5 toneladas de penas em uma unidade industrial com capacidade de abate médio de 165 mil aves/dia.

Como forma de aproveitamento e manejo, a indústria avícola destina as penas para a produção da farinha de penas por meio do processo de cocção sob pressão e moagem. Apesar de possuir 84% de proteína bruta, ser livre de materiais estranhos e microrganismos patogênicos, a farinha de penas não pode ser usada como única fonte de proteína na alimentação de animais não-ruminantes, pois seus nutrientes são pouco disponíveis devido à sua baixa digestibilidade (Scapin, 2003; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008).

A baixa digestibilidade da farinha de penas está relacionada a queratina presente nas penas, que pertence à superfamília de proteínas de filamentos intermediários e tem como características ser estruturalmente fibrosa, insolúvel e recalcitrante. Porém, quando degradada, a queratina é considerada uma fonte de proteína de baixo de custo (Mckittrick, Chen, Bodde & Novitskaya, 2012; Wang et al., 2016).

Vários métodos que podem ser utilizados para hidrolisar a queratina, e os mais conhecidos são: hidrólise sob pressão, hidrólise enzimática e hidrólise química. Os tratamentos térmicos afetam o conteúdo nutricional do hidrolisado queratinoso resultante, isto é, ocorre a perda de aminoácidos termossensíveis, tais como metionina, lisina, tirosina e triptofano. Ao contrário dos processos hidrotermais, o processo de hidrólise enzimática por

68 meio desses microrganismos é mais econômico e ocorre de forma suave, preservando
69 aminoácidos essenciais (Holkar et al., 2018).

70 Os fungos filamentosos podem realizar a hidrólise e tem como vantagens: baixo
71 custo com matéria-prima, alta produtividade e as enzimas podem ser facilmente modificadas e
72 recuperadas do meio de cultura por serem, em geral, extracelulares. Muitos processos
73 industriais utilizam fungos filamentosos para produzir enzimas e outros metabólitos. Quando
74 comparada com proteases produzidas por bactérias, as secretadas por fungos têm como
75 vantagens, facilidade na remoção do micélio por filtração simples e oferecer segurança
76 durante a manipulação, pois a maioria dos fungos é reconhecido como seguro (GRAS -
77 Generally Recognized as Safe) (Mandujano-Gonzalez et al., 2016).

78 Como a queratina é uma proteína difícil de degradar, as ligações entre os seus
79 aminoácidos podem ter a hidrólise melhorada por meio da co-cultura de dois ou mais
80 microrganismos (Lange, Huang e Busk 2016). Com isso, a utilização de enzimas produzidas
81 por fungos em mono ou co-cultura é uma alternativa economicamente viável que pode
82 melhorar sensivelmente a qualidade de resíduos queratinosos. Dessa forma, o objetivo desse
83 trabalho foi avaliar a degradação da farinha de penas em fermentação submersa por fungos
84 filamentosos isolados da região da Restinga de Guaibim - Bahia.

85

86

MATERIAL E MÉTODOS

87

88

Obtenção da farinha de penas e isolados fúngicos

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

Pareamento de culturas

100

101

O procedimento foi realizado de acordo com Dennis e Webste (1971), e em triplicata. Foi preparada uma suspensão a partir de uma alçada da colônia dos fungos e

102 transferida para uma solução contendo 60 mL de água, 0,2 g de ágar e 1 gota de Tween 20.
103 Em placas de Petri contendo meio de malte 20% foram adicionados em posição opostas na
104 placa 2 µl da suspensão de esporos. Em seguida, as placas foram vedadas com plástico filme e
105 incubadas a 25 °C por sete dias. Após crescimento micelial, os diâmetros das colônias foram
106 determinados com uso de uma régua. O controle foi feito cultivando os fungos em placas
107 separadas.

108

109 **Avaliação da degradação em monocultura e co-cultura**

110

111

112 A degradação foi avaliada em fermentação submersa com solução mineral
113 composta por (%): cloreto de sódio (NaCl) 0,5, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,3 e
114 fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4. Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 60 mL
115 da solução, 0,6 g de farinha de penas, disco de micélio de 1,0 cm de diâmetro para
116 monocultura e dois discos de mesmo diâmetro de fungos distintos para co-cultura. O controle
117 foi realizado apenas solução mineral estéril e farinha de penas.

118 Os Erlenmeyers foram agitados em shaker a 30 °C e 150 rpm por cinco e sete
119 dias. Os resultados da degradação foram obtidos seguindo os seguintes passos: papéis de filtro
120 previamente secos em estufa a 65 °C por 24 horas foram pesados para obter o peso seco dos
121 filtros vazios e, em seguida foi realizada a filtração; após a filtragem, os papéis contendo a
122 biomassa foram secos no mesmo tempo e temperatura descritos anteriormente. O peso dos
123 filtros com biomassa e dos filtros vazios foram usados para determinar os percentuais de
124 degradação por meio da seguinte fórmula:

125

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{Peso em gramas do filtro com biomassa} - \text{Peso em gramas do filtro vazio}}{0,6} \times 100$$

126

127 *0,6g: quantidade inicial da farinha de penas.

128

129 Os ensaios foram realizados em triplicata e a análise estatística dos resultados por
130 meio da análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo Teste de Skott-Knott
131 utilizando software RStudio versão 1.2.

132

133

133 **Análise do pH**

134

135 O pH foi mensurado após a fermentação e nos períodos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96
136 horas utilizando pHmetro de bancada.

137

138 **Ensaio de hidrólise enzimática utilizando o extrato bruto produzido em monocultura**

139

140 Em Erlenmeyers contendo 0,6 g de farinha de penas foram adicionados 10 mL do
141 extrato bruto, filtrado duas vezes em papéis de filtro esterilizados em autoclave a 121 °C por
142 20 minutos. Em seguida, os Erlenmeyers foram colocados em shaker a 30 °C sob agitação de
143 150 rpm para homogeneização constante e a avaliação da degradação foi realizada em 24, 48,
144 72 e 96 horas. Foi feito um controle contendo apenas solução mineral esterilizada e farinha de
145 penas. Os ensaios foram realizados em triplicata, condições assépticas e os cálculos e
146 resultados da degradação foram obtidos seguindo os passos descritos anteriormente na
147 fermentação submersa. A comparação das médias de degradação foram realizadas pelo Teste
148 de Skott-Knott por meio do software RStudio versão 1.2.

149

150 **Otimização da degradação utilizando Delineamento Composto Central Rotacional** 151 **(DCCR)**

152

153 Os isolados que apresentaram maior taxa de degradação, *Lecanicilium* sp. IS5.2,
154 *Acremonium* sp. IS21.1 e *Trichoderma* sp. IS57, foram selecionados para avaliar o efeito das
155 variáveis pH e agitação sobre a degradação em monocultura por meio do Delineamento
156 Composto Central Rotacional 2² (DCCR), segundo Rodrigues e Iemma 2009 (Tabela 1). As
157 combinações nos ensaios foram utilizadas para realizar os cultivos durante sete dias a 30 °C e
158 as fermentações, juntamente com o cálculo para obtenção dos resultados, seguiu o
159 procedimento descrito anteriormente na avaliação da degradação em monocultura. As análises
160 estatísticas foram realizadas no *Software* Statistica Release versão 7.1, Stat Soft. Inc., USA.

161

162 **Tabela 1** – Variáveis com valores codificados e reais empregados para avaliar o efeito da agitação
163 (X₁) e pH (X₂) na degradação da farinha de penas.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁	100	115	150	185	200
X ₂	3	4	6,5	9	10

164

165 Testes de validação foram realizados em fermentação submersa com solução mineral
166 composta por (%): cloreto de sódio (NaCl) 0,5, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 0,3 e
167 fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4. Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 60 mL
168 da solução, 0,6 g de farinha de penas, disco de micélio de 1,0 cm de diâmetro. Em seguida, os
169 Erlenmeyers foram colocados em shaker a 30 °C e 100, 150 e 200 rpm para homogeneização
170 constante e a avaliação da degradação foi realizada após sete dias de fermentação. O cálculo
171 para obtenção dos resultados seguiu o mesmo procedimento realizado na avaliação da
172 degradação em monocultura e co-cultura e as médias de degradação foram comparadas pelo
173 Teste de Tukey por meio do software RStudio versão 1.2.

174

175 RESULTADOS E DISCUSSÃO

176

177 Degradação em monocultura

178

179 A degradação da farinha de penas em fermentação submersa com os nove isolados
180 fúngicos da Restinga de Guaibim foi analisada após 5 e 7 dias de fermentação. As médias de
181 degradação nos períodos analisados apresentaram diferenças significativas e os isolados
182 *Purpureocillium* sp. IS35, *Trichoderma* sp. IS57, *Acremonium* sp. IS21.1 e *Lecanicillium* sp.
183 IS5.2 demonstraram as maiores taxas de degradação (Figuras 1 e 2) após cinco e sete dias de
184 fermentação, e suas médias não diferiram a 5% de probabilidade.

185 Em média, esses isolados chegaram a degradar mais de 60% da farinha de penas
186 após cinco dias e 70% em sete dias. O *Fusarium* sp IS98 chegou próximo aos 70% de
187 degradação após sete dias, seguido pelo *Metarhizium* sp. IS15 com 62% de degradação. Já o
188 *Aspergillus* sp. IS37, *Cladosporium* sp. ISSD.8 e *Penicillium* IS25.2 expressaram as menores
189 taxas de degradação, mas ainda assim, acima de 40% (Figura 1 e 2), o que mostra que o
190 potencial de degradação destes isolados também é bastante promissor. Além dos resultados
191 terem apresentado diferenças significativas ($p < 0,05$), os resíduos foram considerados normais
192 e as variâncias consideradas homogêneas porque o p-valor no Teste de Shapiro-Wilk foi
193 0,061 e no Teste de Bartlett 0,063, superiores ao p-valor apresentado na análise de variância
194 (Tabela 2 e 3).

195

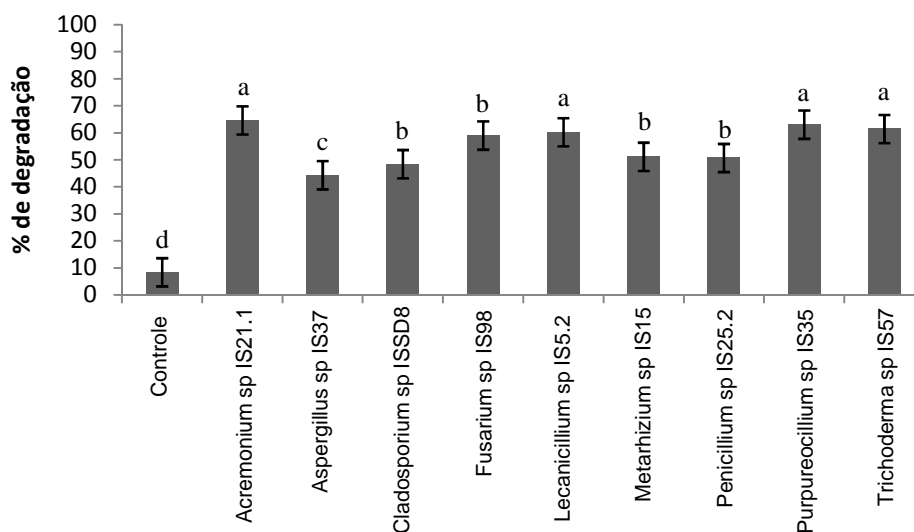
196

197

198

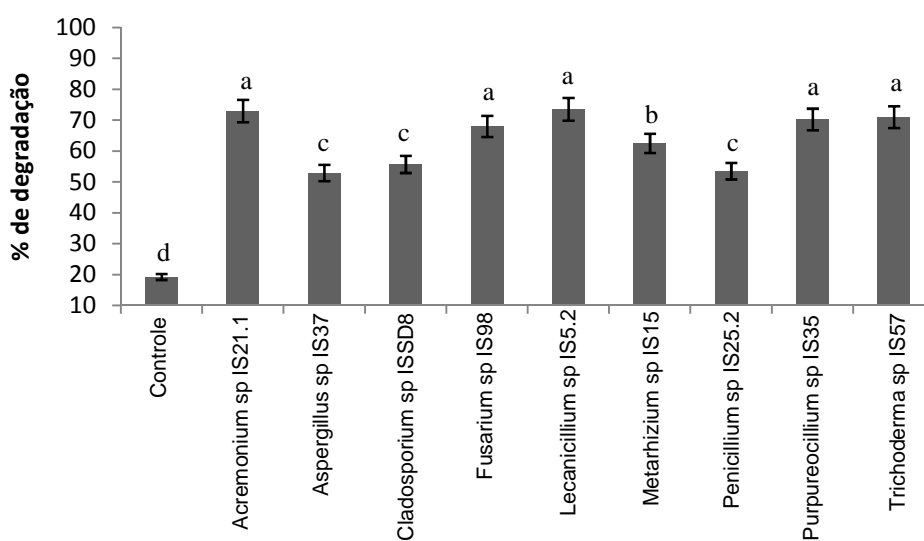
199 **Figura 1** – Degradação da farinha de penas em monocultura por isolados fúngicos a 30 °C em pH 6,5 a 150
 200 rpm após cinco dias. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.

201
 202
 203



204
 205
 206
 207
 208
 209

Figura 2 – Degradação da farinha de penas em monocultura por isolados fúngicos a 30 °C em pH 6,5 a 150 rpm após sete dias. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.



210
 211
 212
 213
 214
 215

Tabela 2 – Análise de variância da degradação da farinha de penas em monocultura por isolados fúngicos após cinco dias.

Fontes de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	Pr>Fc
Tratamento	9	6102,0	678,00	21,382	2,1887e-08
Resíduo	20	634,2	31,71		
Total	29	6736,2			

216

Coeficiente de variação: 8.4 %.

217 **Tabela 3** – Análise de variância da degradação da farinha de penas em monocultura por isolados fúngicos após
 218 sete dias.
 219
 220

Fontes de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	Pr>Fc
Tratamento	9	7263,1	807,01	108	5,6921e-15
Resíduo	20	149,5	7,47		
Total	29	7412,5			

221 Coeficiente de variação: 4.56 %.

222 O baixo percentual de degradação da farinha de penas pelo *Aspergillus* sp. IS37,
 223 *Penicillium* IS25.2 e *Cladosporium* sp. ISSD.8 pode está relacionado a fermentação
 224 submersa. De acordo com a literatura, a condição de fermentação influencia diretamente na
 225 quantidade de enzimas extracelulares secretadas por fungos e bactérias. Em um estudo da
 226 degradação de penas por fungo em fermentação sólida e submersa foi constatado que a
 227 atividade queratinolítica do *Aspergillus niger* é maior em fermentação sólida (Mazotto et al.,
 228 2013). Também se tem relatos de que em fermentação sólida ocorre maior produção de
 229 queratinases por *Streptomyces* sp. (Azeredo et al., 2006) e que neste tipo de fermentação a
 230 potencialidade biotecnológica do *Aspergillus oryzae* para produzir proteases neutras é mais
 231 elevada do que em fermentação submersa (Sandhya et al., 2005; Belmessikh et al., 2013).

232 A princípio, a degradação realizada pelos fungos é mecânica, causada por
 233 erosão superficial e penetração das hifas no substrato. Porém, as enzimas são os principais
 234 agentes que atuam na degradação devido à queratina induzir a produção de queratinases que
 235 hidrolisam as ligações peptídicas dessa proteína. A partir disso, as pontes dissulfeto são
 236 quebradas e a queratina passa a ser utilizada pelos fungos como fonte de nitrogênio e carbono
 237 sem afetar negativamente os nutrientes. A degradação enzimática ocorre em condições
 238 brandas e ao final da hidrólise, o substrato queratinoso se torna uma excelente fonte de
 239 proteínas e aminoácidos (Călin et al., 2017; Bohacz & Kornilłowicz-Kowalska, 2019).

240 A indústria, por sua vez, utiliza tratamentos hidrotérmicos e mecânicos para
 241 degradar as penas e, posteriormente, produzir a farinha de penas. Conforme Brebu e Spiridon
 242 (2011) a degradação térmica de materiais queratinosos ocorre em faixas de temperatura de
 243 170 a 300 °C. Nesse processo com altas temperaturas são perdidos aminoácidos
 244 termossensíveis essenciais como lisina, metionina e triptofano, e formados aminoácidos não
 245 nutritivos, como lisinoalanina e lantionina (Holkar et al., 2018). Percebe-se que a exposição
 246 da farinha de penas a altas temperaturas afeta negativamente componentes nutricionais
 247 importantes.

248 Dessa forma, microrganismos que degradam a queratina viabilizam o
249 desenvolvimento de uma tecnologia que pode ser aproveitada para produzir substâncias
250 digeríveis e nutricionalmente mais ricas. Fungos que possuem potencial biotecnológico
251 podem ser utilizados para degradar subprodutos da indústria avícola que podem ser utilizados
252 na alimentação de animais não ruminantes. Com isso, a fermentação submersa pode substituir
253 o processo hidrotérmico convencional, o que contribui positivamente para o meio ambiente e
254 possibilita redução nas despesas da indústria avícola com alimentação das aves já que esta
255 representa 70% dos custos de produção (Carvalho et al., 2012; Holkar et al., 2018).

256

257 **Degradação em co-cultura**

258

259 O pareamento de culturas verificou a possibilidade de interação antagônica entre
260 os isolados quando cultivados juntos. Os resultados mostraram que o *Trichoderma* sp. IS57
261 foi o único que apresentou antagonismo sobre os demais isolados. A atividade antagônica
262 desse fungo está associada à competição por espaço e nutrientes, hiperparasitismo ou
263 produção de compostos voláteis e não voláteis durante seu pareamento (Hajieghrari et al.,
264 2008; Bunbury-Blanchette & Walker, 2018).

265 Os isolados *Purpureocillium* sp. IS35, *Fusarium* sp. IS98, *Acremonium* sp.
266 IS21.1, *Lecanicillium* sp. IS5.2, *Metarhizium* sp. IS15, *Aspergillus*, *Cladosporium* sp ISSD8 e
267 *Penicillium* sp IS25.2 não demonstraram inibição entre si quando pareados. As fermentações
268 em co-cultura buscaram melhorar o rendimento (Kumari & Naraian, 2016; Lange et al., 2016)
269 na degradação da farinha de penas por meio da ação sinérgica dos fungos.

270 No fim da fermentação em todas as combinações foi constatada a formação de
271 biomassa e micélio característico do crescimento de fungos filamentosos, mas não ocorreu
272 aumento na taxa de degradação da farinha de penas, inclusive, os fungos com melhores
273 resultados em monocultura tiveram decréscimo no seu rendimento quando combiados (Tabela
274 4). Embora os isolados que apresentaram os menores percentuais de degradação quando
275 cultivado junto com os melhores (*Acremonium* sp IS21.1 x *Cladosporium* sp. ISSD.8,
276 *Aspergillus* sp. IS37 x *Purpureocillium* sp. IS35, *Cladosporium* sp. ISSD.8 x
277 *Purpureocillium* sp. IS35 e *Metarhizium* sp IS15 x *Purpureocillium* sp. IS35) tenham
278 apresentado médias de degradação que ultrapassaram 70%, não se pode afirmar que a
279 combinação resultou em melhora nas taxas de degradação devido o *Acremonium* sp IS21.1 e
280 *Purpureocillium* sp. IS35 em monocultura degradarem 73% e 71% da farinha de penas,
281 respectivamente. Para co-cultivar esses isolados são necessários estudos adicionais, pois as

282 enzimas ou outros mecanismos antagônicos estimulam a concorrência entre os fungos pelo
283 substrato quando cultivados juntos em espaço confinado.

284

285 **Tabela 4** – Degradação da farinha de penas em co-cultura a 30 °C em pH 6,5 a 150 rpm durante sete dias.

286

287

Fungos combinados	% de degradação
Controle	19,82
<i>Acremonium</i> sp IS21.1 x <i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8	74,93
<i>Acremonium</i> sp. IS21.1 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	73,77
<i>Acremonium</i> sp IS21.1 x <i>Penicillium</i> sp. IS25.2	67,35
<i>Acremonium</i> sp. IS21.1 x <i>Fusarium</i> sp. IS98	65,6
<i>Acremonium</i> sp. IS21.1 x <i>Purpureocillium</i> sp. IS35	68,81
<i>Acremonium</i> sp. IS21.1 x <i>Metarhizium</i> sp. IS15	63,34
<i>Acremonium</i> sp. IS21.1 x <i>Aspergillus</i> sp. IS37	68,25
<i>Aspergillus</i> sp. IS37 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	61,16
<i>Aspergillus</i> sp IS37 x <i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8	57,1
<i>Aspergillus</i> sp. IS37 x <i>Penicillium</i> sp. IS25.2	56,52
<i>Aspergillus</i> sp. IS37 x <i>Metarhizium</i> sp. IS15	53,26
<i>Aspergillus</i> sp. IS37 x <i>Fusarium</i> sp. IS98	64,46
<i>Aspergillus</i> sp. IS37 x <i>Purpureocillium</i> sp. IS35	71,47
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8 x <i>Metarhizium</i> sp. IS15	53,67
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8 x <i>Penicillium</i> sp. IS25.2	58,91
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8 x <i>Fusarium</i> sp. IS98	65,81
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8 x <i>Purpureocillium</i> sp. IS35	70,04
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	61,54
<i>Fusarium</i> sp. IS98 x <i>Metarhizium</i> sp. IS15	63,93
<i>Fusarium</i> sp. IS98 x <i>Purpureocillium</i> sp. IS35	55,46
<i>Fusarium</i> sp. IS98 x <i>Penicillium</i> sp. IS25.2	65,93
<i>Fusarium</i> sp. IS98 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	60,05
<i>Metarhizium</i> sp. IS15 x <i>Penicillium</i> sp. IS25.2	56,68
<i>Metarhizium</i> sp. IS15 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	59,41
<i>Metarhizium</i> sp IS15 x <i>Purpureocillium</i> sp. IS35	70,82
<i>Penicillium</i> sp. IS25.2 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	61,92
<i>Purpureocillium</i> sp. IS35 x <i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	59,41
<i>Purpureocillium</i> sp. IS35 x <i>Penicillium</i> sp. IS25.2	63,15

288

289

290

Análise do pH

291

292 Ao fim da fermentação foi observado alcalinização do pH (Tabela 5), o que
293 também foi certificado por Bach, Lopes e Brandelli (2015), e Bohacz e korniłowicz-
294 Kowalska (2019) após a biodegradação de penas em meio líquido.

295 O aumento do pH inicial de 6,5 ocorreu juntamente com o processo de degradação
296 (Figura 3). Essa elevação tem relação com a atividade proteolítica que ocasiona ações de
297 desaminação e liberação de excesso de nitrogênio na forma de íons amônio. O meio alcalino

ajuda a reduzir às ligações dissulfeto presentes na molécula da queratina e contribui para
degradação. As alterações no pH, assim como a degradação, são indícios da atividade
queratinolítica dos microrganismos (Bach, Lopes & Brandelli, 2015; Abdel-Fattah et al.,
2018).

302

Tabela 5 – Valores médios do pH no fim da degradação da farinha de penas em monocultura a 30 °C em pH 6,5
a 150 rpm após sete dias de fermentação.

305

Fungos	pH final
<i>Acremonium</i> sp. IS21.1	9,10
<i>Aspergillus</i> sp. IS37	9,24
<i>Cladosporium</i> sp. ISSD.8	9,26
<i>Fusarium</i> sp. IS98	9,5
<i>Lecanicillium</i> sp. IS5.2	9,28
<i>Metarhizium</i> sp. IS15	9,33
<i>Penicillium</i> sp. IS25.2	9,16
<i>Purpureocillium</i> sp. IS35	9,36
<i>Trichoderma</i> sp. IS57	9,20

306

307

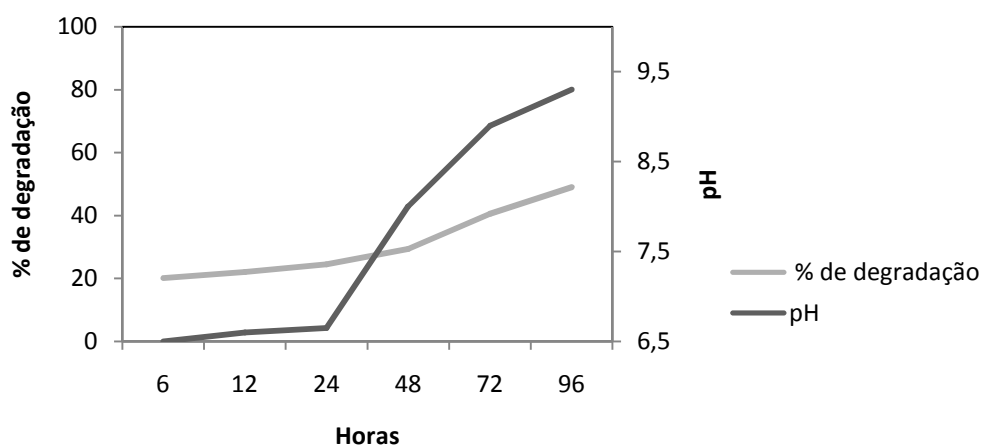
Figura 3 – Elevação do pH após a degradação da farinha de penas em fermentação submersa nos intervalos de
6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

309

310

311

312



313

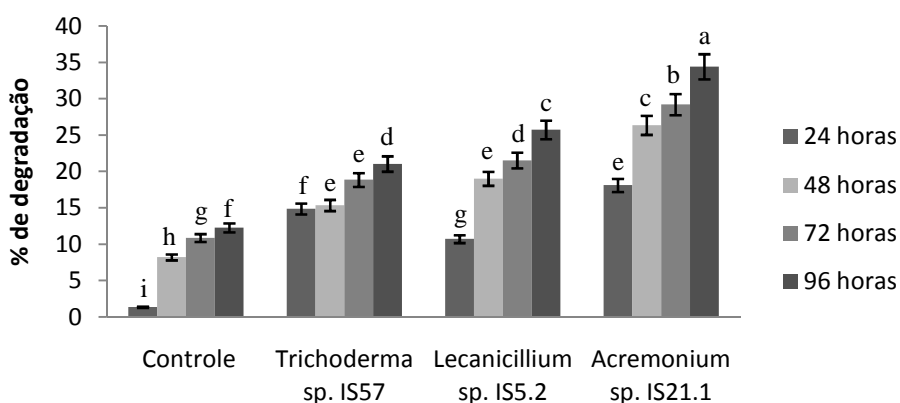
O aumento da degradação e pH ao longo do tempo (Figura 3) indicou ótima
adaptação dos isolados estudados ao substrato disponível, portanto, podem ser explorados
para possíveis aplicações biotecnológicas e industriais utilizando diferentes resíduos
insolúveis como, penas de aves, lã, cabelo ou substratos protéicos solúveis como, caseína e
gelatina (Gupta, Rajput, Sharma & Gupta, 2013; Anitha & Palanivelu, 2013; Gómes-
Mendoza et al., 2014).

319

Hidrólise enzimática utilizando o extrato bruto

Os fungos *Trichoderma* sp. IS57, *Acremonium* sp. IS21.1 e *Lecanicillium* sp. IS5.2 por não produzirem toxinas e apresentarem as maiores taxas de degradação em cultura pura após sete dias de fermentação, tiveram seu extrato bruto adicionados a farinha de penas com o objetivo de hidrolisar o substrato. Quando comparado ao controle, os resultados apresentados pelos extratos mostraram que o tempo de exposição da farinha de penas ao extrato bruto influencia significativamente nas taxas de degradação (Figura 4). Nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas a degradação foi crescente e com diferenças estatísticas entre as médias apresentadas. O extrato produzido pelo *Acremonium* sp. IS21.1 obteve destaque, pois os resultados foram maiores e em 96 horas degradou 34% da farinha de penas.

Figura 4 – Degradação da farinha de penas por extrato bruto após 24, 48, 72 e 96 horas. Letras iguais indicam médias que não diferem estatisticamente.



As enzimas presentes no extrato bruto são queratinases extracelulares e não configuram ameaça à estrutura intestinal dos animais. Por isso, podem ser empregadas, por exemplo, na ração de frangos de corte para aumentar a digestibilidade de moléculas complexas sem causar riscos ao desempenho das aves ou rendimento da carcaça (Adetunji & Adejumo, 2018).

Além de servir como complemento enzimático para as farinhas de origem animal, também é possível produzir antioxidantes, antimicrobianos e fertilizantes menos tóxicos ao meio ambiente, visto que a pesquisa de Adetunji et al., (2012) verificaram que aplicação de hidrolisados microbiológicos a base de queratina apresentaram efeitos positivos no crescimento de plantas. As atividades biológicas dos hidrolisados de queratina ainda não são vastamente conhecidas (Daroit, Corrêa & Brandelli, 2011; Fontoura et al., 2014; Brandelli et

348 al., 2015; Oladele et al., 2017). Assim, esses resultados fornecem sugestão de aplicação do
 349 extrato enzimático bruto obtido a partir da fermentação da farinha de penas com fungos.

350

351 **Otimização da degradação utilizando Delineamento Composto Central Rotacional**
 352 **(DCCR)**

353

354 Os resultados no DCCR 2² mostraram que as variáveis pH e agitação influenciam na
 355 degradação da farinha de penas por *Lecanicilium* sp. IS5.2, *Acremonium* sp. IS21.1 e
 356 *Trichoderma* sp. IS57 após sete dias de cultivo (Tabela 6). O ensaio 8 (150 rpm e pH 10) foi a
 357 condição em que os isolados apresentaram os maiores percentuais de degradação, isso porque,
 358 segundo Bagewadi, Mulla e Ninnekar (2018) o meio alcalino auxilia os fungos na produção
 359 de queratinases. No entanto, nos ensaios do ponto central (9, 10 e 11), também podem ser
 360 observadas taxas elevadas de degradação da farinha de penas para os três isolados fúngicos,
 361 em torno 70%. Mesmo em pH ácidos como nos ensaios 1, 2 e 7, a maioria dos isolados
 362 apresentou taxa de degradação acima de 60%. Isso mostra a versatilidade e elevada
 363 capacidade de adaptação desses fungos, o que amplia sua aplicação industrial.

364

365

366 **Tabela 6** - Matriz do delineamento com valores codificados, reais e seus resultados obtidos com a degradação da
 367 farinha de penas por fungos filamentosos.

368

369

Ensaio	X ₁	X ₂	Agitação	pH	Taxa de degradação (%)		
					<i>Lecanicilium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.
					IS5.2	IS21.1	IS57
1	-1	-1	115	4	61,78	62,03	60,85
2	1	-1	185	4	65,11	66,41	65,66
3	-1	1	115	9	64,33	65,95	63,83
4	1	1	185	9	67,41	66,42	68,16
5	-1,41	0	100	6,5	48,53	50,38	39,83
6	1,41	0	200	6,5	63,49	65,95	59,45
7	0	-1,41	150	3,0	61,33	38,9	62,15
8	0	1,41	150	10	75,98	79,13	74,73
9	0	0	150	6,5	70,19	73,9	70,75
10	0	0	150	6,5	69,88	71,75	69,51
11	0	0	150	6,5	71,40	70,52	70,35

370

371

372
 373 A análise de variância mostrou que não houve diferenças significativas entre os
 374 tratamentos, pois nos ensaios o F calculado foi inferior ao F tabelado (Tabela 7). Assim,
 375 foram realizados novos testes fixando o pH do meio em 6,5 e as agitações em 100, 150 e 200
 376 rpm. O pH 6,5 foi selecionado porque está próximo do pH 7,0, sugerido por trabalhos que
 377 incluem *Stenotrophomonas maltophila* e *Bacillus subtilis* como pH ideal para bactérias
 378 produzirem proteases em fermentação submersa (Jeong et al., 2010; Sing et al., 2017).

379
 380
 381 **Tabela 7** - Análise de variância dos isolados *Acremonium* sp. IS21.1, *Trichoderma* sp. IS57 e *Lecanicilium* sp.
 382 IS5 2 após sete dias de fermentação na farinha de penas.
 383
 384

<i>Acremonium</i> sp. IS21.1					
Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	Fcal	Ftab
Regressão	731,75	5	146,35	1,29	5,05
Resíduo	568,72	5	113,74		
<i>Trichoderma</i> sp. IS57					
Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	Fcal	Ftab
Regressão	711,82	5	142,36	5,00	5,05
Resíduo	137,42	5	27,48		
Total	849,24				
<i>Lecanicilium</i> sp. IS5.2					
Fatores	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	Fcal	Ftab
Regressão	326,33	5	65,27	2,71	5,1
Resíduo	120,47	5	24,09		
Total	446,8				

385
 386
 387
 388 Os resultados foram mais significativos a 150 rpm e apresentaram diferenças
 389 estatísticas entre as médias de degradação (Figura 5). Segundo Singh et al. (2017) a
 390 quantidade de enzimas produzidas durante a fermentação pode variar conforme a velocidade
 391 de agitação aplicada. Os autores afirmam que agitações elevadas podem propiciar bom
 392 crescimento microbiano, porém, a quantidade de oxigênio dissolvido se eleva, diminuindo a
 393 produção de queratinases, e já em baixas velocidades ocorre a menor diluição de oxigênio e as

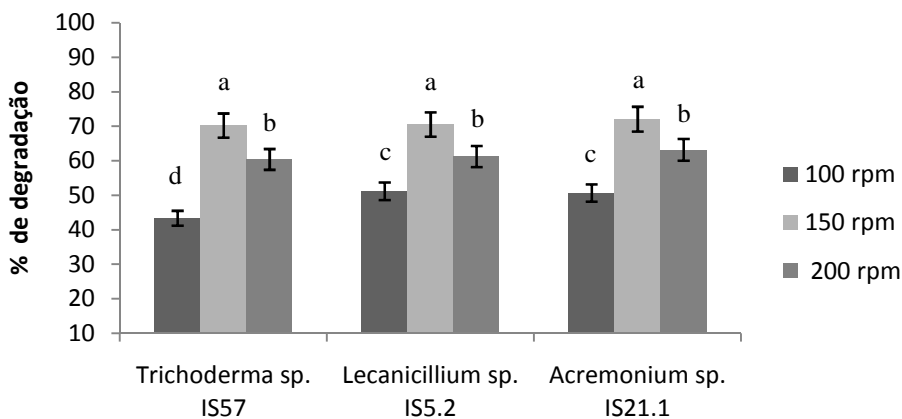
394 células microbianas não são bem homogêneas com o substrato, o que acaba influenciando
 395 nos resultados.

396

397 **Figura 5** – Degradação da farinha de penas a 30 °C em pH 6,5 a 100, 150 e 200 rpm após sete dias. Letras
 398 iguais indicam médias que não diferem estatisticamente.

399

400



401

402

403 Estudos sobre os efeitos da agitação na produção de queratinases por bactérias
 404 verificaram que a 150 rpm ocorre a máxima produção de enzimas (Cortezi, Cilli & Contiero
 405 2008; Barman et al., 2017; Singh et al., 2017). Isso possivelmente se aplica aos fungos em
 406 razão dos percentuais de degradação da farinha de penas nesta velocidade de agitação ter sido
 407 mais expressivo. Por isso, com base na literatura e nos resultados entende-se que o melhor
 408 cultivo dos três isolados na farinha de penas a 30 °C em pH 6,5 ocorre a 150 rpm.

409

410

CONSIDERAÇÕES FINAIS

411

412 A degradação de resíduos queratinosos por fungos em fermentação submersa
 413 indica caminhos promissores e de baixo custo para enriquecer e agregar valor a subprodutos
 414 da indústria avícola. Assim, podem ser explorados na produção de compostos com aplicações
 415 industriais que ajudam a melhorar a digestibilidade de rações que contém a farinha de penas
 416 como ingrediente. A biomassa e o extrato bruto obtido a partir da hidrólise de resíduo rico em
 417 queratina também podem ser utilizados em futuros estudos para avaliar sua aplicação como
 418 biofertilizantes e bioinseticidas

419

420

AGRADECIMENTOS

421

422 Os autores gostariam de agradecer a agroindústria Avigro Avícola Agroindustrial,
423 por ter cedido a farinha de penas, e à Agência de Coordenação de Aperfeiçoamento de
424 Pessoal de Nível Superior (001).

425

426

REFERÊNCIAS

427

428 Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A., & Hashem, A. M. (2018).
429 Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus*
430 *licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 311-
431 318. DOI:10.1016/j.jgeb.2018.05.005.

432 Adetunji C. O, Makanjuola O.R, Arowora K.A, Afolayan S.S, Adetunji J. B (2012).
433 Production and Application of Keratin-Based Organic Fertilizer from Microbially Hydrolyzed
434 Feathers to cowpea (*Vigna unguiculata*). *International Journal of Scientific & Engineering*
435 *Research*, 3(12), 164-162. ISSN 2229-5518.

436 Adetunji, C. O., & Adejumo, I. O. (2018). Efficacy of crude and immobilized enzymes from
437 *Bacillus licheniformis* for production of biodegraded feather meal and their assessment on
438 chickens. *Environmental Technology & Innovation*, 11, 116-
439 124. DOI:10.1016/j.eti.2018.05.002.

440 Anitha, T. S., & Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular
441 keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and*
442 *Purification*, 88(2), 214-220. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.01.007>.

443 Azeredo, L. A. I., Lima, M. B., Coelho, R. R. R., & Freire, D. M. G. (2006). Thermophilic
444 protease production by *Streptomyces* sp. 594 in submerged and solid-state fermentations using
445 feather meal. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 641-647. DOI:10.1111/j.1365-
446 2672.2005.02791.x.

447 Avinews Brasil. Brasil deverá produzir 2,3% mais carne de frango em 2019. (2018).
448 Disponível em: <https://avicultura.info/pt-br/usda-brasil-carne-de-frango-2019/>. Acesso em:
449 06/09/2018.

450 Avinews Brasil. Carne de frango: exportações crescem e consumo doméstico retrai no Brasil
451 em 2019. (2019). Disponível em: <https://avicultura.info/pt-br/mercado-frango-brasil-2019/>.
452 Acesso em: 01/09/2019.

- 453 Barman, N. C., Zohora, F. T., Das, K. C., Mowla, M. G., Banu, N. A., Salimullah, M., &
454 Hashem, A. (2017). Production, partial optimization and characterization of keratinase
455 enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. *AMB Express*,
456 7(1). DOI:10.1186/s13568-017-0462-6.
- 457 Bach, E., Lopes, F. C., & Brandelli, A. (2015). *Biodegradation of α and β -keratins by Gram-*
458 *negative bacteria. International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 136–
459 141. DOI:10.1016/j.ibiod.2015.06.001.
- 460 Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., & Amrane, A.
461 (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by
462 *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato
463 pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 377–
464 385. DOI:10.1016/j.jtice.2012.12.011.
- 465 Bohacz, J., & korniłłowicz-Kowalska, T. (2019). Fungal diversity and keratinolytic activity of
466 fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Process Biochemistry*, 80, 119–
467 128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>.
- 468 Brasil. Confederação da Agricultura e Pecuária - CNA. (2016).
469 <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/carnederangoproducto%3%A7%3%A3oumter%3%A7%3A7o-maior-em-2027>. Acesso em: 06/09/2018.
- 471 Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. (2017). *Estatística Econômica*.
472 Brasília: Diário Oficial da União.
473 <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agenciasaladeimprensa/2013agenciadenoticias/releass/10217abatesdefrangossuinoosebovinosaumentouno1tride2017frenteaoesmooperiodode2016>.
474 Acesso em: 06/09/2018.
- 476 Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. (2012). *Diagnóstico dos resíduos*
477 *orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindústrias associadas*.
478 http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf. Acesso em: 06/09/2018.
- 480 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. (2008). Instrução
481 Normativa nº 34 de 28/05/2008 /MAPA. *Regulamento técnico da inspeção higiênico-*
482 *sanitária e tecnológica do processamento de resíduos de animais*. Brasília: Diário Oficial da
483 União. [https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2008-05-28-](https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2008-05-28-34)
484 34. Acesso em: 06/09/2018.

- 485 Brandelli, A., Sala, L., & Kalil, S. J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry
486 waste into added-value products. *Food Research International*, 73, 3–
487 12. DOI:10.1016/j.foodres.2015.01.015.
- 488 Brebu, M., & Spiridon, I. (2011). Thermal degradation of keratin waste. *Journal of Analytical*
489 *and Applied Pyrolysis*, 91(2), 288–295. DOI:10.1016/j.jaap.2011.03.003.
- 490 Bunbury-Blanchette, A. L., & Walker, A. K. (2018). *Trichoderma* species show biocontrol
491 potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion.
492 *Biological Control*, 130, 127-135. DOI:10.1016/j.biocontrol.2018.11.007.
- 493 Călin, Mariana et al., (2017). Degradation of keratin substrates by keratinolytic
494 fungi. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 101-112. DOI:
495 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.05.007>.
- 496 Carvalho, C. M. C.; Fernandes, E. A.; carvalho, A. P.; Caíres, R. M.; Fagundes, N. S, (2012).
497 Uso de farinhas de origem animal na alimentação de frangos de corte. *Revista Portuguesa de*
498 *Ciências Veterinária*, 107, 69-73. Disponível em:
499 http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf6_2012/69-73.pdf. Acesso em: 07/05/2019.
- 500 Cortezi, M., Cilli, E. M., Contiero, J. (2008). *Bacillus Amylolyquefaciens*: A new Keratinolytic
501 Featherdegrading Bacteria. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(1) 170 - 177.
- 502 Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F. & Brandelli, A. (2011). Production of keratinolytic proteases
503 through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45.
504 *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 45-51. DOI:
505 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.04.014>.
- 506 Dennis, C. & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*.
507 III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*, 57(1), 363-369. DOI:
508 [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80050-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80050-5).
- 509 Fontoura, R., Daroit, DJ. et al. (2014). Production of feather hydrolysates with antioxidant,
510 angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New*
511 *Biotechnology*, 3(5), 506-513. DOI: 10.1016 / j.nbt.2014.07.002.
- 512 Gupta, R., Rajput, R., Sharma, R., & Gupta, N. (2013). Biotechnological applications and
513 prospective market of microbial keratinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97,
514 9931-9940. DOI: <http://10.1007/s00253-013-5292-0>.

- 515 Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, MR, Davari M. (2008). Biological potential
516 of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi.
517 *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 967-972.
- 518 Holkar, C. R., Jain, S. S., Jadhav, A. J., & Pinjari, D. V. et al., (2018). Valorization of keratin
519 based waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 115, 85-98. DOI:
520 <http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.045>.
- 521 Kumari, S., & Naraian, R. (2016). Decolorization of synthetic brilliant green carpet industry
522 dye through fungal co-culture technology. *Journal of Environmental Management*, 180, 172–
523 179. DOI:10.1016/j.jenvman.2016.04.060.
- 524 Jeong J.H., Lee O.M., Jeon Y.D., Kim J.D., Lee N.R., Lee C.Y. and Son H.J. 2010.
525 Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather degrading *Stenotrophomonas*
526 *maltophilia* that produces plant growth-promoting activity, *Process Biochemistry*, 45, 1738–
527 1745. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.020>.
- 528 Lange, L., Huang, Y., & Busk, P. K. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature—a
529 new hypothesis of industrial relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5),
530 2083-2096, 12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7262-1>.
- 531 Lasekan, A., Bakar, F. A., & Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources
532 of useful biological resources. *Waste Management*, 33(3), 552-565. DOI:
533 <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>.
- 534 Mandujano-González, V. et al., (2016). Secreted fungal aspartic proteases: a review. *Revista*
535 *Iberoamericana de Micología*, 33(2), 76-82. DOI:
536 <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.10.003>.
- 537 Mazotto, A. M. et al., (2013). Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases:
538 Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration &*
539 *Biodegradation*, 85, 189-195. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.003>.
- 540 Mckittrick, J., Chen, P., Bodde, S. G., & Novitskaya, M. (2012). The structure, functions, and
541 mechanical properties of keratin. *Jom*, 64(4), 449-468. DOI:
542 <http://dx.doi.org/10.1007/s11837-012-0302-8>.
- 543 Oladele, I.O., Olajide, J.L., Daramola, O.O. and Siaw, K.B. (2017) Re-Evaluation of Bovine
544 Fiber Biomass as Exploitable Keratinous Bio-Re- source for Biomedical and Industrial

- 545 Applications. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 5, 1-17.
546 DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/jmmce.2017.51001>.
- 547 Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of
548 neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation.
549 *Process Biochemistry*, 40(8), 2689–2694. DOI:10.1016/j.procbio.2004.12.001.
- 550 Scapin, M. R. S. (2003). Avaliação nutricional de farinha de penas e de sangue para frangos
551 de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*,
552 25(1), 91-98. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v25i1.2104>.
- 553 Singh, S., Masih, H., Jeyakumar, E., Lawrence, R., e Ramteke, P.W. (2017). Optimization of
554 Fermentative Production of Keratinase by *Bacillus subtilis* Strain S1 in Submerged State
555 Fermentation Using Feather Waste. *International Journal of Current Microbiology and*
556 *Applied Sciences*, 6(12), 1499-1510. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.167>.
- 557 Wang, B. et al., (2016). Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological
558 organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229-318. DOI:
559 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>.