



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
PPGCTA 2018-1

KARINA PAULA PRECZESKI

***Fusarium oxysporum* E *Aspergillus* sp. COMO PRODUTORES DE QUERATINASES
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

ERECHIM

2020

KARINA PAULA PRECZESKI

***Fusarium oxysporum* E *Aspergillus* sp. COMO PRODUTORES DE QUERATINASES
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS *Campus* Erechim como requisito de obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a Helen Treichel

Coorientadora: Prof^a Dr^a Gislaine Fongaro

ERECHIM

2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Preczeski, Karina Paula

Fusarium oxysporum E Aspergillus sp. COMO PRODUTORES DE QUERATINASES UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS / Karina Paula Preczeski. -- 2020.

35 f.:il.

Orientadora: Doutora Helen Treichel

Co-orientadora: Doutora Gislaine Fongaro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2020.

1. Pelo suíno. 2. Fungos queratinolíticos. 3. Processos biotecnológicos. 4. Precipitação enzimática. I. Treichel, Helen, orient. II. Fongaro, Gislaine, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

KARINA PAULA PRECZESKI

***Fusarium oxysporum* E *Aspergillus* sp. COMO PRODUTORES DE QUERATINASES
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em
Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 30/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Aline Viancelli - UNC

Luciane Maria Colla - UPF

Gislaine Fongaro - UFSC

Helen Treichel - UFFS

Erechim

2020

RESUMO

Queratinases atuam na hidrólise de queratina, um componente complexo presente em alguns resíduos agroindustriais, como pelos suínos e penas de frango. O tratamento destes resíduos é importante para sua valorização e para evitar a poluição ambiental. Processos tecnológicos mediados por fungos e enzimas são alternativas promissoras para tratamento de resíduos recalcitrantes. Considerando isso, o presente estudo avaliou estratégias de obtenção de queratinases produzidas por fungos utilizando fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES). Dois fungos isolados de resíduos de penas apresentaram potencial para produção de queratinases, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp. Estas cepas foram utilizadas na FS juntamente com penas ou pelos preparados em três diferentes condições (redução da concentração microbiana, esterilização e tratamento com peróxido de hidrogênio). A massa residual fermentada foi quantificada e testada para nova produção enzimática. O fungo com maior capacidade de produzir queratinases na FS foi utilizado para produção de queratinases em FES tendo como substrato resíduos de uva e/ou de pelo suíno. O extrato enzimático mais promissor de cada fermentação foi conduzido à técnica de precipitação enzimática utilizando sais e solventes orgânicos. A maior atividade queratinolítica em FS foi obtida com *F. oxysporum* ($243,50 \text{ U mL}^{-1}$) após seis dias de fermentação, utilizando pelo suíno esterilizado. Na FES a maior atividade queratinolítica foi obtida em nove dias ($518,66 \text{ U g}^{-1}$), utilizando somente resíduos de pelos como substrato. Na precipitação enzimática obteve-se um fator de purificação de 127,13 vezes em FS e de 14,08 vezes em FES, ambos na fase sobrenadante, com rendimentos enzimáticos acima de 100%. No reuso do pelo suíno, a atividade de queratinases manteve-se em 74,74% da atividade inicial após 3 ciclos, apresentando um potencial de produção enzimática para aplicação em diversas problemáticas ambientais. O uso de resíduos para produção de enzimas queratinolíticas se mostrou uma estratégia promissora para aplicação na área biotecnológica, obtendo enzimas com elevada atividade após processos simples de concentração enzimática, além de o resíduo ser passível de ciclos fermentativos sem perdas produtivas significativas.

Palavras-chave: pelo suíno, fungos queratinolíticos, processos biotecnológicos, precipitação enzimática.

ABSTRACT

Keratinases act in the hydrolysis of keratin, a complex component present in some agro-industrial residues, such as swine hair and chicken feathers. The treatment of these residues is important for their recovery and to avoid environmental pollution. Technological processes mediated by fungi and enzymes are promising alternatives for the treatment of recalcitrant residues. Considering this, the present study evaluated strategies for obtaining keratinases produced by fungi using submerged fermentation (SF) and solid-state fermentation (SSF). Two fungi isolated from feather residues showed potential for the production of keratinases, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. These strains were used in the FS together with feathers or swine hair prepared in three different conditions (microbial concentration reduction, sterilization and treatment with hydrogen peroxide). The residual fermented mass was quantified and tested for new enzymatic production. The fungus with the greatest capacity to produce keratinases in SF was used to produce keratinases in SSF, using grape residues and/or swine hair as a substrate. The most promising enzymatic extract of each fermentation was carried out using the enzymatic precipitation technique using salts and organic solvents. The greatest keratinolytic activity in the SF was obtained with *F. oxysporum* (243.50 U mL^{-1}) after six days of fermentation, using sterile swine hair. In SSF, the highest keratinolytic activity was obtained in nine days (518.66 U g^{-1}), using only hair residues as a substrate. In the enzymatic precipitation, a purification factor of 127.13 times in the FS and 14.08 times in the FES was obtained, both in the supernatant phase, with enzymatic yields above 100%. In the reuse of swine hair, the keratinase activity remained at 74.74% of the initial activity after 3 cycles, presenting potential for enzymatic production for application in various environmental problems. The use of residues for the production of keratinolytic enzymes proved to be a promising strategy for application in the biotechnological area, obtaining enzymes with high activity after simple processes of enzymatic concentration, in addition to the residue being susceptible to fermentative recycling without significant production losses.

Keywords: swine hair, keratinolytic fungi, biotechnological processes, enzymatic precipitation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 SUBSTRATOS FERMENTATIVOS	11
3.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE FUNGOS POTENCIALMENTE QUERATINOLÍTICOS	11
3.3 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE QUERATINASES	12
3.4 PRODUÇÃO DE QUERATINASES.....	12
3.4.1 Fermentação submersa (FS)	12
3.4.2 Fermentação em estado sólido (FES).....	13
3.5 ATIVIDADE DE QUERATINASES.....	13
3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	13
3.7 DEGRADAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE QUERATINA.....	14
3.8 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA	14
3.9 REÚSO DO PELO SUÍNO	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 FUNGOS QUERATINOLÍTICOS	16
4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E DEGRADAÇÃO DE QUERATINA	16
4.3 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA	22
4.4 REUSO DO PELO SUÍNO	25
5 CONCLUSÃO.....	27
6 TRABALHOS FUTUROS	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil está em uma posição de destaque no setor de carnes e derivados, com produção de 13,05 milhões de toneladas de carne de frango e de 3,75 milhões de toneladas de carne suína no ano de 2017 (ABPA 2018). Essa produção elevada gera enormes volumes de resíduos agroindustriais constituídos de queratina, como por exemplo penas de frango e pelos suínos (Freitas et al. 2018). Essas proteínas são filamentosas, inertes, insolúveis, com elevado teor de enxofre (Herrmann e Aebi 2004; Wang et al. 2016) e subdividindo-se em duas classes principais. As α -queratinas são estruturalmente formadas por duas cadeias de polipeptídios arranjadas no formato helicoidal, estabilizadas por ligações de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas (Pauling et al. 1951; Huggins 1956; Wang et al. 2016), enquanto as β -queratinas são formadas por cadeias laterais agrupadas de forma paralela ou antiparalela, estabilizadas pelas mesmas ligações que a categoria anterior, porém dando aspecto de pregas à estrutura (Fraser et al. 1971; Wang et al. 2016).

Resíduos queratinosos possuem algumas destinações comuns como a incineração e a disposição em aterros sanitários (Agrahari e Wadhwa 2010; Starón et al. 2017). Para valorizá-los, é preferível a aplicação de processos biotecnológicos visando a reciclagem de resíduos ricos em queratina. Neste cenário é possível a produção de enzimas com grande valor comercial ao mesmo tempo em que trata-se o resíduo pela ação dos microrganismos (Łaba et al. 2015). Após, o resíduo remanescente pode ser encaminhado para a compostagem (Choińska-Pulit et al. 2019) ou para um novo processo fermentativo.

O resíduo de uva também é um resíduo agroindustrial e é comumente gerado na região sul do Brasil, proveniente da produção de sucos e vinhos. É empregado na produção enzimática (Teles et al. 2019), na obtenção de compostos fenólicos (Drevelegka e Goulana 2020), na área alimentícia (Beres et al. 2019), na dieta de animais (Guerra-Rivas et al. 2016) e na produção e remoção de corantes (Oliveira et al. 2018; Baaka et al. 2017).

Esse resíduo é composto principalmente por pele, polpa e sementes, constituídos por variações de carboidratos (8-13%), lignina (59-64%), hemicelulose (18-31%), celulose (6-17,75%) e pectina (0,25-4%). Possui ainda em torno de 7,13% de glicose e 1,5% de nitrogênio, principais fontes de nutrientes facilmente acessíveis por microrganismos (Botella et al. 2005; Egüés et al. 2013). O resíduo de uva ainda é pouco valorizado e possui uma diversidade de nutrientes, podendo ser empregado na produção de diversas enzimas utilizadas na solução de problemáticas ambientais.

Uma das enzimas aplicadas na área ambiental são as queratinases. A literatura já abordou muitas cepas bacterianas para produção destas enzimas, porém muitas espécies de

fungos vêm ganhando a atenção de pesquisadores pelo baixo custo de produção, crescimento rápido, uso de substratos baratos, produção de elevadas quantidades de enzimas e fácil recuperação e purificação dos produtos (Bagewadi et al. 2018). Estes fungos são encontrados e isolados de solos com presença de queratina, adaptando-se a este nutriente como forma de abrigo e de alimento, atuando em sua estrutura por ação enzimática, erosão superficial e penetração radial (Ganaie et al. 2010; Ismail et al. 2012; Kachuei et al. 2012; Kornilłowicz-Kowalska e Bohacz 2011; Bohacz e Kornilłowicz-Kowalska 2012). A escolha de uma cepa proeminente é um passo importante para a produção de queratinases, obtendo enzimas menos custosas, ecológicas e não tóxicas (Srivastava et al. 2020).

As queratinases microbianas, 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 (Gupta e Ramnani 2006; Queiroga et al. 2012; Bhange et al. 2015; Sharma e Devi 2018) e podendo ser produzidas por fermentação submersa (FS) ou em estado sólido (FES) (Mazotto et al. 2013). A FES ganha vantagem frente à FS pelo uso de substratos baratos e de fácil aquisição, elevada produtividade, cultivo em ambiente natural e uso de resíduos agroindustriais, minimizando os custos e a poluição ambiental (Srivastava et al. 2020). As enzimas produzidas em ambos os processos fermentativos ativam-se principalmente na presença de queratina, atacando as ligações peptídicas e liberando aminoácidos mais simples (Yamamura et al., 2002). As queratinases pertencem a uma classe de enzimas importantes na desestabilização de arranjos de queratina, porém a ação sinérgica com outras proteases funcionais é observada e considerada primordial (Yamamura et al. 2002; Lopes et al. 2011; Mazotto et al. 2013).

Estas enzimas podem ter sua atividade específica aumentada pelo uso de técnicas de concentração enzimática, como a precipitação. Esta metodologia possui destaque pelo uso de reagentes de baixo custo, visando a separação das enzimas de interferentes enzimáticos (Sala et al. 2014; Preczeski et al. 2018). Processos industriais requerem elevadas quantidades de enzimas concentradas, optando pela aplicação de metodologias iniciais e mais simples, como uso de sais e solventes, dispensando processos cromatográficos (Brandelli et al. 2015). Queratinases, ambas na forma bruta ou concentrada, possuem muitas aplicações, especialmente na área ambiental (Cervantes-González et al. 2009; Paul et al. 2014; Bhange, Chaturvedi e Bhatt 2015; Reddy et al. 2017; Su et al 2017; Abdel-Fattah et al. 2018; Kalaikumari et al. 2019; Choińska-Pulit, Łaba e Rodziewicz 2019), reduzindo a carga poluidora no meio ambiente causada principalmente pelas atividades industriais de aves, suínos, têxteis, couros e detergentes, por exemplo. Estudos apontam as queratinases como participantes do

desenvolvimento verde por serem proteases com ótimas expectativas na área de biocatálise. Ainda, o mercado atual busca ótima atividade catalítica e notável termoestabilidade em enzimas extracelulares relevantes e prósperas para atuar industrialmente, sendo produzidas por cepas microbianas promissoras (Srivastava et al. 2020).

Assim, a produção de enzimas *homemade* é muito importante para que elas possam, principalmente, serem utilizadas na resolução de inúmeros problemas ambientais. Além disso, o destaque da produção de queratinases se dá pelo uso de resíduos como única fonte de nutrientes, não competindo com a cadeia energética e alimentar.

Nesse sentido, este estudo visou avaliar estratégias de obtenção de queratinases produzidas por fungos em FS e FES utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar estratégias de obtenção de queratinases produzidas por fungos utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

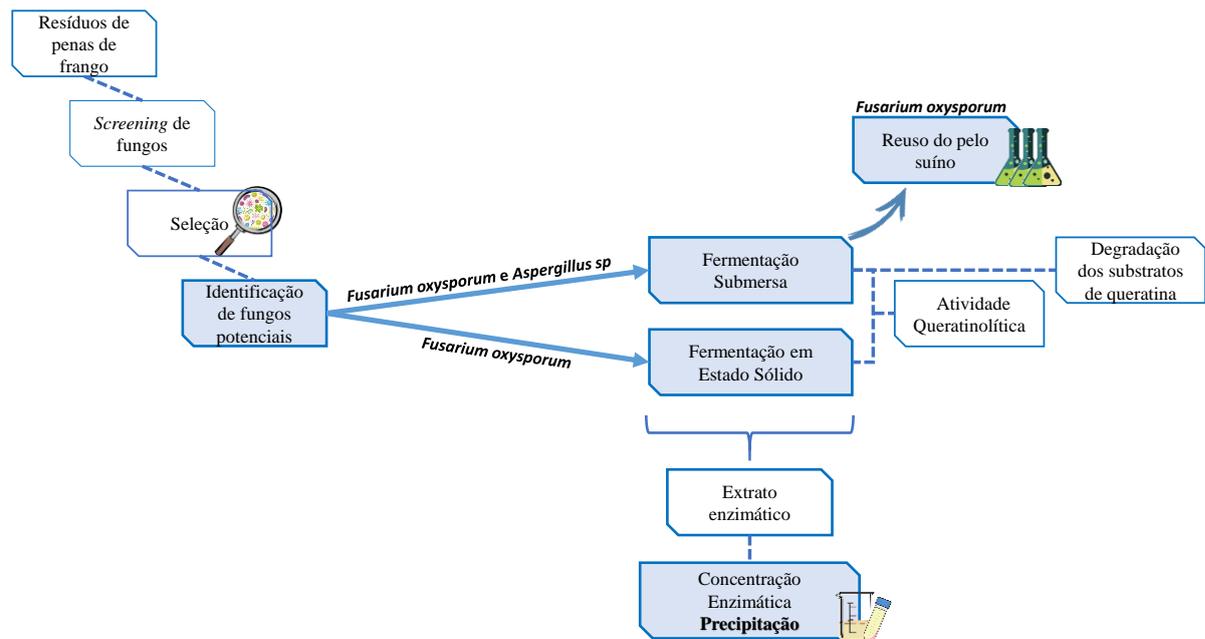
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos potencialmente queratinolíticos e induzi-los à produção de queratinases;
- Investigar a atividade de queratinases dos fungos isolados frente à Fermentação Submersa (FS) utilizando como substrato penas de frango e pelos suínos;
- Investigar a produção de queratinases em Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando pelo suíno e resíduos da produção de suco de uva como suporte fermentativo;
- Avaliar diferentes maneiras de preparo dos resíduos de queratina antes de serem utilizados na Fermentação Submersa (FS);
- Analisar o processo de precipitação enzimática utilizando sais e solventes orgânicos;
- Investigar a potencialidade de reuso do pelo suíno no processo de obtenção de queratinases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 1 é apresentado um fluxograma simplificado da metodologia desenvolvida neste trabalho.

Figura 1. Fluxograma simplificado da metodologia utilizada na obtenção de queratinases.



Fonte: Autora (2019).

3.1 SUBSTRATOS FERMENTATIVOS

As penas de galinha, os pelos suínos e os resíduos de uva foram obtidos de agroindústrias alimentícias localizadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Após coletados, os materiais foram armazenados à -4 ± 2 °C.

O resíduo da uva era proveniente de videira da variedade Isabel Preta (*Vitis labrusca*). O resíduo foi segregado manualmente para análise, sendo composto por aproximadamente 68% de cascas, 28% de sementes e 4% de outros compostos como folhas e talos.

3.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE FUNGOS POTENCIALMENTE QUERATINOLÍTICOS

Os fungos utilizados foram isolados de penas de frango dispostas no solo de uma propriedade localizada na região Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. O material sólido coletado, contendo penas e solo, foi plaqueado em meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar), realizando-se repiques consecutivos até obter-se culturas distintas de fungos.

3.3 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE QUERATINASES

Para selecionar os fungos com maior potencial de produção de queratinases foi realizada uma etapa de indução em placa de petri para produção de queratinases. Para isso, utilizou-se penas de frango cortadas em tamanho aproximado de 2 cm, lavadas com água destilada, imersas em álcool 70% (v v⁻¹) por 2 h e secas a 70 ± 2 °C (Adaptado de Călin et al. 2017). As penas foram adicionadas uniformemente às placas de petri após o repique dos fungos em meio BDA e, em seguida, incubadas a 28 °C por sete dias. Após, o conteúdo superficial da placa de petri foi transferido para erlenmeyers contendo tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) e 10 g L⁻¹ de penas tratadas da maneira acima citada. Os erlenmeyers permaneceram em incubadora com agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 28 °C por um período de sete dias para avaliação da degradação do substrato adicionado (Adaptado de Mazotto et al. 2013).

Os fungos que apresentaram as maiores porcentagens de degradação foram identificados pelo sequenciamento do material genético (*Next Generation Sequencing*) em parceria com a empresa Neopropecta - SC.

3.4 PRODUÇÃO DE QUERATINASES

3.4.1 Fermentação submersa (FS)

A produção enzimática foi conduzida com dois fungos potenciais utilizando substratos de queratina como única fonte de C e N. Os substratos foram penas de frango e pelos suínos, preparados de três diferentes maneiras, sendo elas:

- (a) Redução da carga microbiana: lavagem com água destilada, imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 2h e aquecimento a 70 ± 2 °C durante 15 h (Adaptado de Călin et al. 2017);
- (b) Esterilização: lavagem com água destilada e autoclavagem a 1 atm e 121 °C por 15 min;
- (c) Tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂): lavagem com água destilada e pré-tratamento com solução alcalina (pH 11,5) a 4% (v v⁻¹) de uma solução estoque de 30% (v v⁻¹) de H₂O₂ em agitação orbital a 27 °C e 150 rpm por 3h (Venturin et al., 2018; De Paris Junior et al. 2019). Seguido de imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 2h e aquecido a 70 ± 2 °C por 15h.

Para a fermentação submersa, 10 g L⁻¹ de cada resíduo de queratina foi transferido para uma solução tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5), adicionando uma concentração de 10⁶ esporos mL⁻¹, considerando somente células viáveis. Os ensaios foram incubados em agitador orbital por 9 dias a 150 rpm e 28 °C (Adaptado de Anitha e Palanivelu 2013; Łaba et al. 2015; Bagewadi et al. 2018). A atividade queratinolítica foi quantificada no sobrenadante em 3, 6 e 9 dias de fermentação. Ao final, a massa restante foi seca em estufa esterilizadora até peso

constante para avaliar a degradação do substrato, considerando a massa inicialmente adicionada à fermentação.

3.4.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido foi conduzida utilizando resíduo de queratina contendo pelos com pele suína e resíduos de uva. O resíduo de uva foi triturado em moinho de facas e segregado em peneira de 10 mesh para ser utilizado como suporte fermentativo para retenção de umidade e redução de espaços vazios entre as cerdas suínas, bem como para suprimento de carbono e nitrogênio.

Para conduzir a fermentação foram elaborados 2 diferentes sistemas compostos por: a) resíduo de queratina e b) resíduos de queratina e de uva 1:1 (m m⁻¹ seca). O teor de umidade dos substratos foi ajustado para 50% (m m⁻¹) e a concentração de inóculo adicionada foi de 10⁷ esporos por grama de substrato. A fermentação, com os substratos previamente esterilizados a 121 °C e 1 atm por 20 min, foi conduzida a 28 °C com saturação total do ar por 3, 6 e 9 dias. Decorrido o tempo de fermentação, adicionou-se ao meio fermentado um volume de 75 mL de tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) para extração enzimática, agitando-se a mistura por 1h a 28 °C e 200 rpm. Após, o conteúdo foi centrifugado a 1384 xg e 4 °C por 10 min para obtenção do extrato enzimático e quantificação da atividade queratinolítica nos 3 tempos de fermentação (Adaptado de Botella et al. 2005; Mazotto et al. 2013).

3.5 ATIVIDADE DE QUERATINASES

Os sobrenadantes obtidos dos processos fermentativos foram usados para a quantificação da atividade enzimática. A mistura reacional continha 0,013 g de azoqueratina (Sigma K8500), 3,2 mL de tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) e 0,8 mL de extrato enzimático, incubado a 50 °C por 1h. Ao final, 0,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (v v⁻¹) foi adicionado para cessar a reação e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 595 nm (Adaptado de Bressollier et al. 1999). Uma unidade (U) de atividade de queratinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento de absorbância de 0,01 nas condições de ensaio descritas.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (ASB) como padrão (Sigma A3294).

3.7 DEGRADAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE QUERATINA

A quantificação da degradação dos substratos de queratina (D) no processo fermentativo foi avaliada pela diferença entre a massa seca inicialmente adicionada à fermentação (MI) e a massa seca restante ao final da fermentação (MF), expressa em porcentagem (Equação 1).

$$D (\%) = \left(\frac{MI-MF}{MI} \right) * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

3.8 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A concentração enzimática foi conduzida utilizando a técnica de precipitação com sais e solventes orgânicos. Para isso utilizou-se o extrato enzimático mais potencial de cada uma das fermentações testadas (FS e FES). Neste tópico avaliou-se o incremento de atividade queratinolítica (atividade relativa), o fator de purificação (FP) e o rendimento enzimático (Equações 2, 3 e 4, respectivamente).

$$AR (\%) = \left| \frac{AE-AB}{AB} \right| * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

AR= Atividade Relativa (%)

AE= Atividade Enzimática do Ensaio (U mL⁻¹ ou U g⁻¹)

AB= Atividade Enzimática do Extrato Bruto (U mL⁻¹ ou U g⁻¹)

$$FP = \frac{AEE}{AEB} \quad (\text{Equação 3})$$

FP= Fator de Purificação

AEE= Atividade Específica do Ensaio (U mg⁻¹)

AEB= Atividade Específica do Extrato Bruto (U mg⁻¹)

$$R (\%) = \frac{AE*VF}{AB*VI} * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

R= Rendimento Enzimático (%)

AE= Atividade Enzimática do Ensaio (U mL⁻¹ ou U g⁻¹)

AB= Atividade Enzimática do Extrato Bruto (U mL⁻¹ ou U g⁻¹)

VI= Volume inicial de extrato enzimático utilizado na precipitação

VF= Volume obtido ao final do processo de precipitação

Os sais e solventes utilizados foram combinados entre si em concentrações fixas, sendo eles: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acetona e etanol (absolutos) (Quadro 1). A reação foi preparada com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de concentração salina e 50% de concentração de solvente, vertido a uma vazão de 10 mL min^{-1} . Os ensaios foram conduzidos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a precipitação, os volumes foram centrifugados a $9500 \text{ } \times\text{g}$ por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e a fase precipitada foi ressuspensa em tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) (Farag e Hassan 2004; Preczeski et al. 2018). A atividade queratinolítica foi mensurada nas fases sobrenadante e precipitada.

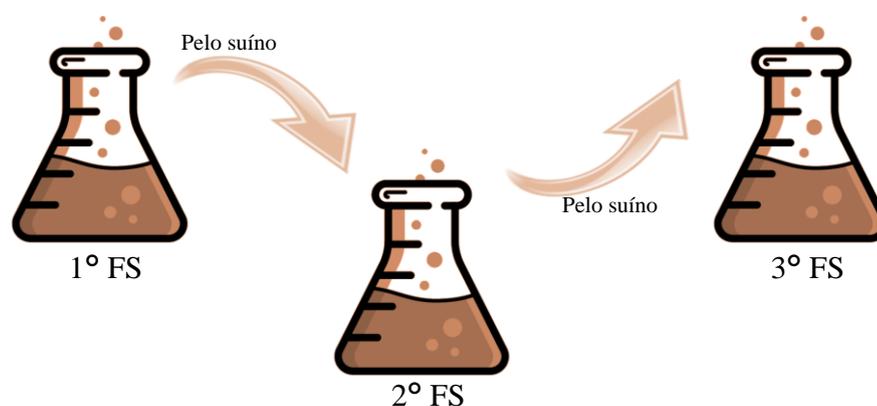
Quadro 1: Combinações realizadas entre os reagentes utilizados na precipitação enzimática.

Reagente	Ensaio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sal ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$)	-	-	NaCl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaCl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaCl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Solvente (50 %)	Acetona	Etanol	Acetona	Acetona	Etanol	Etanol	-	-

3.9 REÚSO DO PELO SUÍNO

O pelo suíno não degradado durante a fermentação submersa foi utilizado em mais dois processos fermentativos (Figura 2). Em cada fermentação, o substrato foi preparado por imersão em álcool 70% (v v^{-1}) por 2 h e secagem a $70 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por $\pm 15 \text{ h}$ (Adaptado de Călin et al. 2017). O fungo foi incubado em 10 g L^{-1} de pelos suínos contendo tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5). Os ensaios permaneceram a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 150 rpm e a atividade queratinolítica foi mensurada sempre ao sexto dia de fermentação.

Figura 2: Esquema do reuso do pelo suíno empregado no processo fermentativo submerso (SF).



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FUNGOS QUERATINOLÍTICOS

Quatro fungos distintos morfológicamente foram isolados dos resíduos de penas. Dois deles apresentaram potencial para produção de queratinases e foram então identificados como *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp.

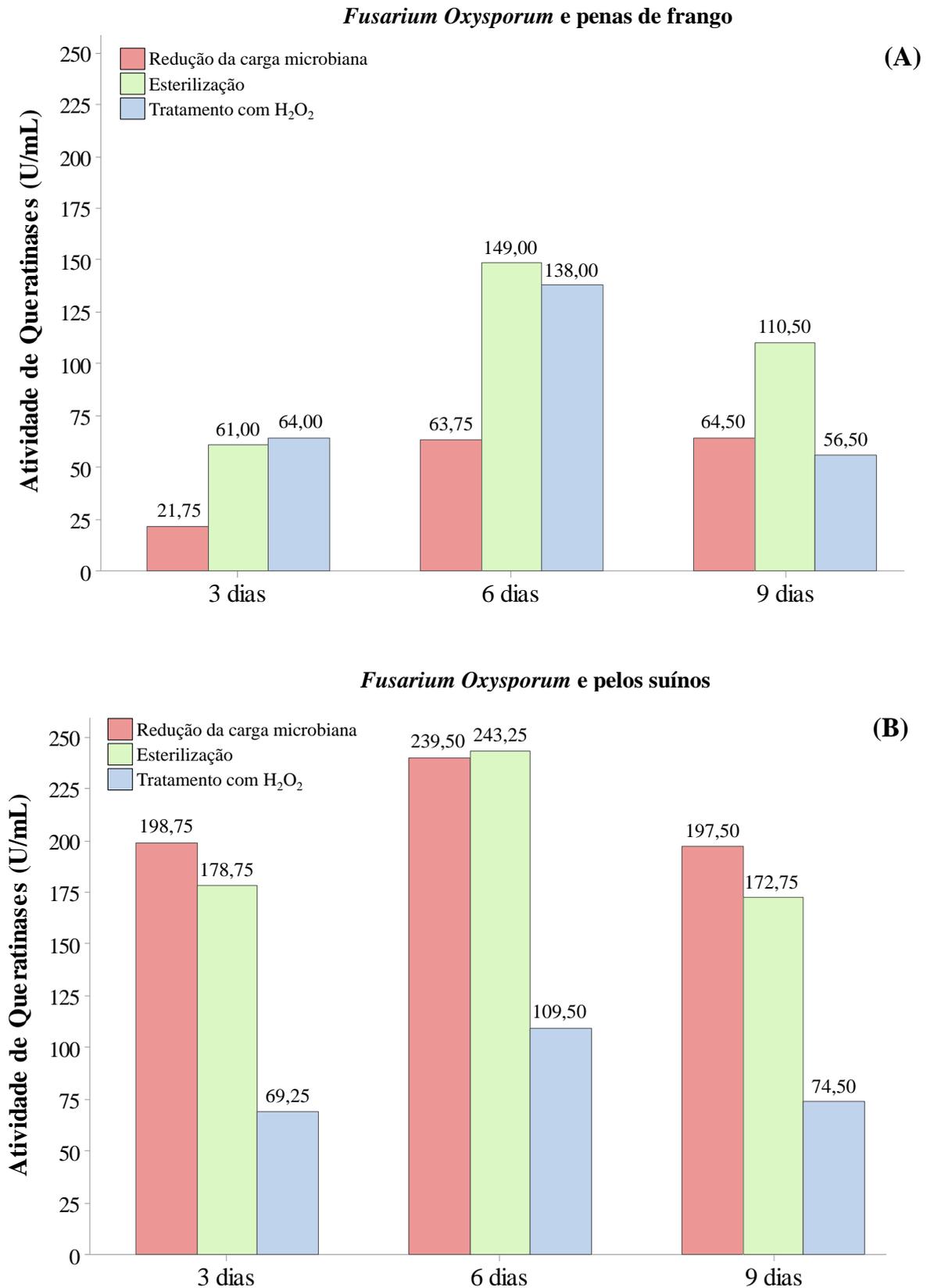
Resultados de degradação de penas de frango de 36,11% (m m^{-1}) e 42,23% (m m^{-1}) foram observados, respectivamente para estes dois fungos. Até o momento há poucos relatos na literatura utilizando *Fusarium oxysporum* para produção de queratinases, expandindo o caráter inovador e científico deste estudo. Já o fungo *Aspergillus* sp. é reportado como uma espécie encontrada no solo, possuindo potencial queratinolítico (Maitig et al. 2018).

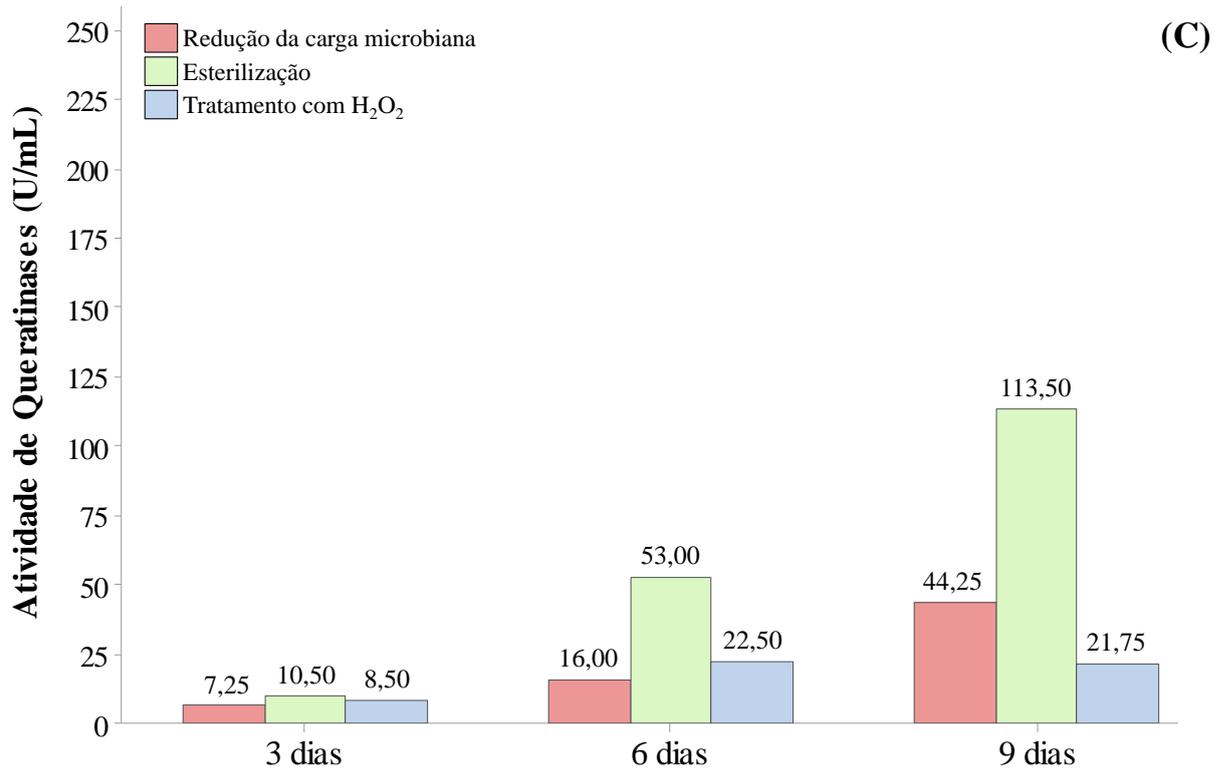
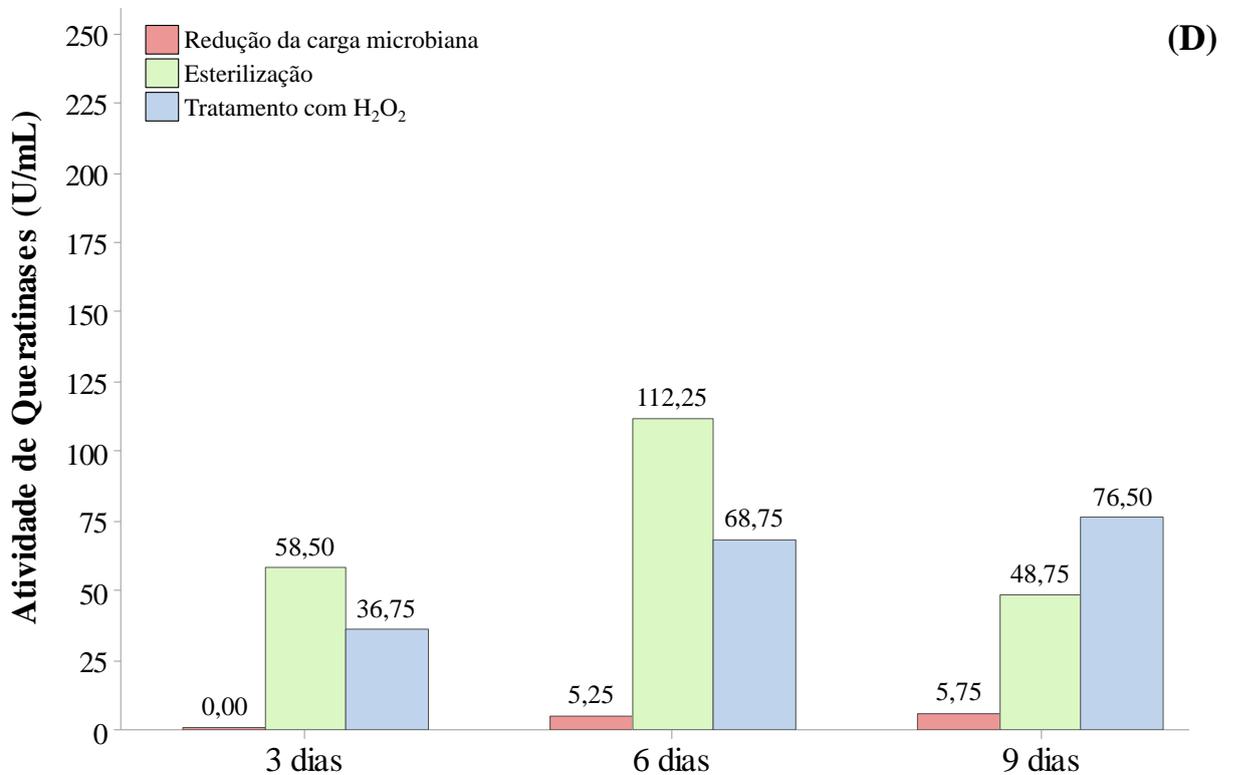
4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E DEGRADAÇÃO DE QUERATINA

A fermentação submersa foi realizada com os fungos promissores *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp. usando penas de frangos ou pelos suínos como substrato, sendo a atividade queratinolítica quantificada em três diferentes tempos de fermentação.

F. oxysporum apresentou a maior produção de queratinases no sexto dia de fermentação, com 243,25 U mL^{-1} e 239,50 U mL^{-1} , utilizando como substrato pelos suínos estéreis e preparados com o método de redução da carga microbiana, respectivamente. A degradação do substrato nesses ensaios foi de 59,20% (m m^{-1}) e 41,87% (m m^{-1}), respectivamente. Usando penas como substrato fermentativo, *F. oxysporum* apresentou a maior atividade com o substrato esterilizado (149,00 U mL^{-1}), seguido de tratamento com peróxido de hidrogênio (138,00 U mL^{-1}), ambos em seis dias de fermentação, com porcentagens de degradação de 53,98% (m m^{-1}) e 32,78% (m m^{-1}), respectivamente. *Aspergillus* sp. apresentou a maior atividade enzimática em pelos esterilizados ao sexto dia de fermentação e para penas de frango esterilizados somente no nono dia, obtendo 112,25 U mL^{-1} e 113,50 U mL^{-1} , com degradação de 34,67% (m m^{-1}) e 39,08% (m m^{-1}), respectivamente (Figura 3).

Figura 3: Atividade de queratinases - utilizando três diferentes preparos do substrato - após fermentação submersa nos seguintes sistemas fermentativos: (A) *Fusarium oxysporum* e penas de frango; (B) *Fusarium oxysporum* e pelos suínos; (C) *Aspergillus* sp. e penas de frango; (D) *Aspergillus* sp. e pelos suínos.



Aspergillus sp. e penas de frango*Aspergillus sp. e pelos suínos*

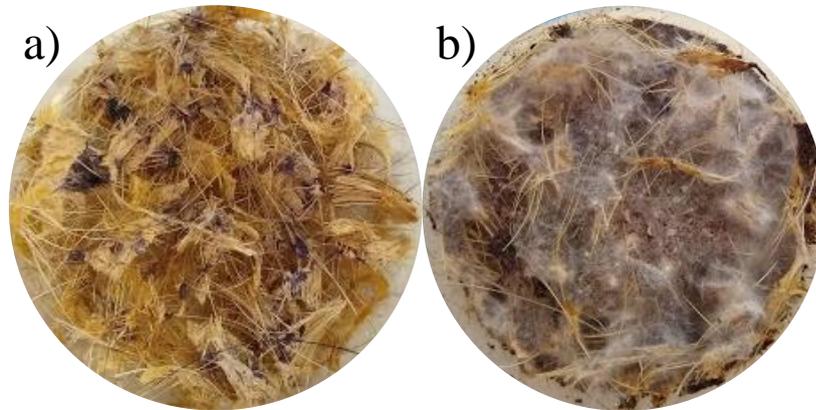
As máximas atividades enzimáticas para *F. oxysporum*, 243,25 e 239,50 U mL⁻¹ foram obtidas quando o pelo suíno foi usado como substrato, mesmo que o fungo tenha sido isolado de penas de frango. É importante enfatizar que diferentes estruturas formam esses substratos e que a ação sinérgica entre enzimas na estrutura da queratina pode se comportar distintamente (Lopes et al. 2011; Mazotto et al. 2013). As penas de aves, por exemplo, possuem cerca de 32 resíduos de queratina na matriz β -folha, organizadas em estruturas de cerca de 100 resíduos. A matriz restante consiste em outros compostos com características hidrofóbicas essenciais para a estabilidade do material (Fraser e Parry 2008).

Nossos resultados sugerem que a variação da produção enzimática entre os substratos é devida à especificidade do extrato produzido, demonstrando que *F. oxysporum* secreta enzimas com alta afinidade para atuar em alfa-queratina. Propõe-se que a ação enzimática em pelos suínos é mediada por um pool enzimático, incluindo pelo menos três classes de enzimas que degradam sinergicamente a queratina: endoprotease, exoprotease e oligoprotease (todas produzidas após sulfitólise) sendo as queratinases pertencentes à família das exoproteases (Lange et al., 2016; Huang et al., 2015). Sugere-se que as diferenças estruturais dos substratos induzem a variações na produção enzimática, podendo estar relacionado ao uso de resíduos como substratos fermentativos.

As quantidades substanciais de atividade enzimática observadas para *F. oxysporum* no pelo suíno preparado por redução da carga microbiana tornam esse processo promissor. Isso porque a maioria dos processos fermentativos dependem da esterilização a alta pressão e temperatura, tornando-os dependentes de sistemas complexos e de altos custos (Adler et al. 2018). A capacidade do fungo em produzir queratinases usando penas de frango e pelos suínos como única fonte de carbono e nitrogênio também o torna um processo simples e possivelmente escalonável.

Após esses resultados, conduziu-se a FES utilizando o resíduo de pelo suíno e a combinação de pelos com resíduos de uva para atuarem conjuntamente como fontes de C e N. Ao longo do período fermentativo houve um crescimento fúngico distinto entre os dois sistemas sólidos estudados. Para o sistema 1 não se observou supercrescimento micelial, diferente do que pôde ser visualizado no sistema 2, em que os esporos fúngicos desenvolveram um exuberante micélio pela presença de açúcares fermentescíveis logo no início da fermentação, substratos esses mais facilmente acessíveis que a queratina (Botella et al. 2005) (Figura 4).

Figura 4: Aspecto da FES aos 6 dias de fermentação, mostrando o desenvolvimento de *F. oxysporum* nos dois sistemas estudados: a) Sistema 1: somente resíduo de pelo; b) Sistema 2: resíduo de pelo e de uva.

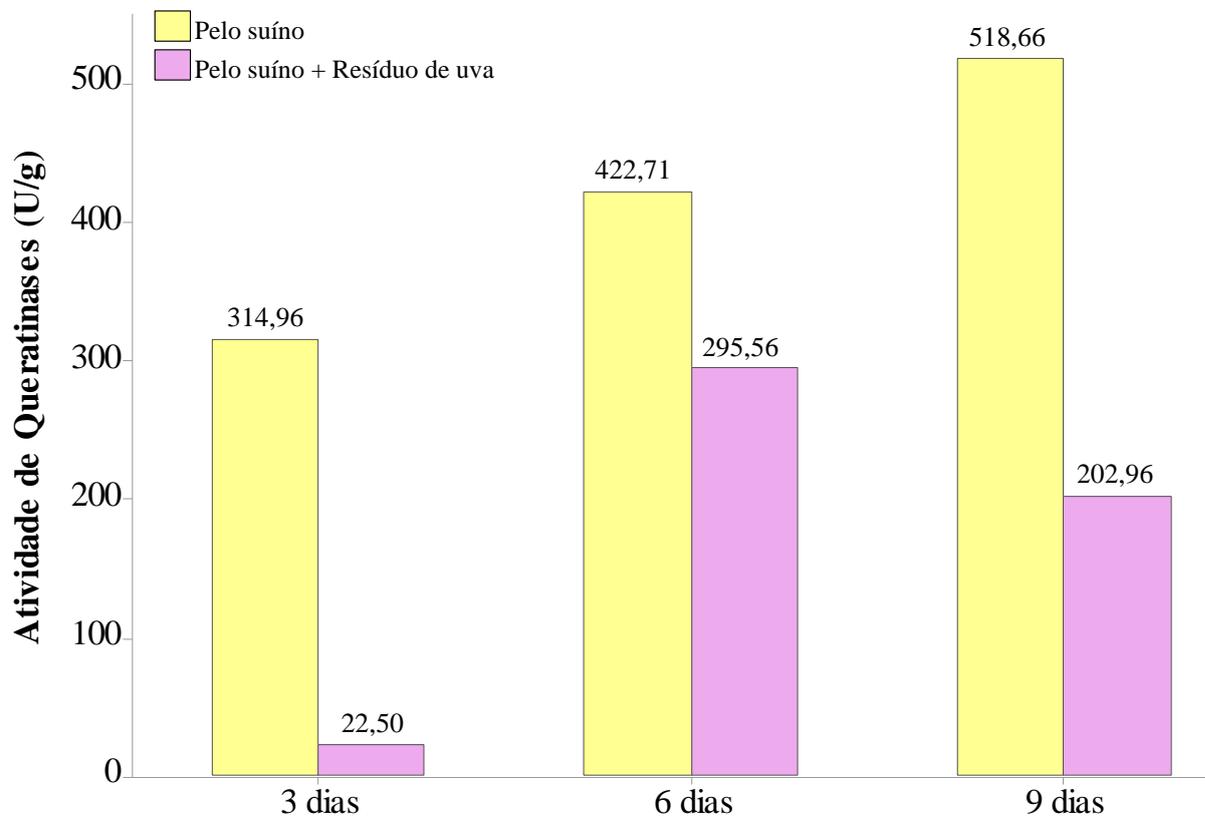


A maior atividade queratinolítica obtida em FES foi no sistema 1 ao nono dia de fermentação, alcançando $518,66 \text{ U g}^{-1}$, seguido do sexto ($422,71 \text{ U g}^{-1}$) e terceiro dia ($314,96 \text{ U g}^{-1}$). Isso mostra um aumento gradual da produção de queratinases, realçando a adaptação fúngica em utilizar o resíduo de pelo suíno como única fonte de nutrientes (Figura 5).

Na sequência, para o sistema 2, a maior atividade foi ao sexto dia, alcançando $295,56 \text{ U g}^{-1}$. Era esperado que próximo às 72h de fermentação todos os açúcares totais fossem consumidos pelo fungo, produzindo muitas enzimas hidrolíticas, como lipases, celulasas e pectinases, ao invés de proteases. Isso ocorre pela presença de outros compostos no bagaço de uva, além de frutose e glicose, desviando a rota da produção de queratinases. Após o esgotamento dos açúcares disponíveis, o microrganismo começa a utilizar o pelo suíno como fonte majoritária de nutrientes, elevando a produção de queratinases (Botella et al. 2005). Caso a finalidade fosse produzir um pool enzimático para diversas aplicações, esse extrato enzimático seria muito promissor; porém como o objetivo do trabalho é a produção elevada de queratinases, a fermentação somente com o resíduo do pelo é a mais adequada.

A literatura científica mostra que a adição de fontes de carbono, como glicose e frutose, eleva a produção de queratinases (Srivastava et al. 2020), porém nesta FES o resíduo da uva não se torna necessário como suplementação de carbono e de nitrogênio, pois somente propicia a produção de enzimas que não são de interesse deste estudo, elevando o potencial do uso único de resíduos frigoríficos desvalorizados para obtenção de bioprodutos tecnológicos valiosos.

Figura 5: Atividade queratinolítica – em 3, 6 e 9 dias – para *F. oxysporum* em duas diferentes configurações sistêmicas utilizando fermentação em estado sólido (FES).



Comparado à outros estudos, os resultados encontrados neste trabalho são promissores. Mazotto et al. (2013) usou 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 e em estado sólido, respectivamente, usando cepas mutantes de *Aspergillus niger*. Lopes et al. (2011) encontrou aproximadamente $0,7 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade de queratinases às 72 horas de fermentação submersa utilizando *A. niger* e pelo suíno sem algum pré-tratamento, com azocaseína como substrato de medida de atividade. Kalaikumari et al. (2019) usou planejamento Plackett-Burman para produção de queratinases por *Bacillus paralicheniformis* MKU3, tendo penas de frango como substrato fermentativo, obtendo 155 U mL^{-1} de atividade ao quarto dia de processo.

Estudos mostram que o gênero *Aspergillus* e *Fusarium* são espécies fúngicas potencialmente queratinolíticas, atuando efetivamente no substrato de queratina (Lopes et al., 2011; Kannahi e Ancy, 2012; Mazotto et al., 2013). Geralmente, a degradação da queratina por fungos filamentosos ocorre primeiramente pelo crescimento de hifas ao redor do fio de

queratina, comprometendo a integridade do substrato pelos processos de erosão superficial e elevação das escamas cuticulares (Călin et al., 2017).

Já o processo de degradação realizado por enzimas envolve a redução das pontes dissulfeto mediadas principalmente por sulfeto redutases, liberando cisteína e S-sulfocisteína. Este processo altera a conformação estrutural da queratina, permitindo o processo de proteólise por enzimas endo e exo-proteolíticas como as queratinases, resultando na liberação de amino ácidos e de peptídeos solúveis (Kunert 1976; Yamamura et al., 2002). Ainda, o rendimento enzimático dos fungos depende da composição do substrato, o qual não é composto somente por queratina (Monod, 2008).

Muitos dados na literatura trabalham somente com β -queratina enquanto o presente estudo difere dos demais em relação aos achados de atividades superiores a 200 U mL^{-1} e 500 U g^{-1} utilizando um substrato com estrutura α -hélice (pelo suíno), sugerindo um uso valioso para esse resíduo que, de outra forma, é considerado um problema industrial e ambiental.

Ainda, queratinases comerciais são tão custosas, puras e específicas que não se sobressaem frente ao pool enzimático produzido por microrganismos utilizando resíduos como substrato fermentativo. Esse extrato enzimático *homemade* é capaz de degradar a matriz heterogênea da queratina, podendo ser aplicado com baixo custo na solução de problemáticas ambientais referentes ao tratamento de resíduos sólidos, como a queratina (Gupta e Ramnani 2006). A compostagem de resíduos de queratina (pelos, penas, cabelo, etc.) é um processo complexo e que precisa ser mediado por diferentes enzimas para que o sucesso da degradação dessa proteína recalcitrante seja alcançado (Choińska-Pulit et al. 2019).

A cepa de *F. oxysporum* se destacou na produção enzimática de queratinases utilizando pelo suíno como substrato fermentativo. Assim, os extratos enzimáticos obtidos da FS pelo método de redução da carga microbiana e da FES utilizando somente pelo suíno (sistema 1) foram selecionados para condução da etapa seguinte de precipitação enzimática utilizando sais e solventes orgânicos.

4.3 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

O extrato enzimático de queratinases produzidas por *F. oxysporum* com pelo suíno preparado pelo método de redução da carga microbiana em FS e o extrato produzido pelo mesmo fungo em FES utilizando somente resíduo de pelos como substrato fermentativo foram usados para precipitação enzimática com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, cloreto de sódio (NaCl), acetona e etanol absolutos.

Tabela 1: Atividade relativa e fator de purificação (FP) para os extratos enzimáticos produzidos por *F. oxysporum* na fase precipitada e sobrenadante em fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES).

	Fermentação Submersa (FS)				Fermentação em Estado Sólido (FES)			
	Precipitado		Sobrenadante		Precipitado		Sobrenadante	
Agentes precipitantes	Atividade Relativa (AR) (%)	FP	Atividade Relativa (AR) (%)	FP	Atividade Relativa (AR) (%)	FP	Atividade Relativa (AR) (%)	FP
Acetona	300,00	3,05	1966,67	85,93	0,00	0,00	65,52	7,57
Etanol	683,33	6,91	1250,00	46,37	3,45	1,36	34,48	5,36
Acetona e NaCl	750,00	5,84	2233,33	127,13	0,00	0,04	106,90	14,08
Acetona e (NH ₄) ₂ SO ₄	950,00	6,10	1216,67	52,01	0,00	0,00	155,17	13,43
Etanol e NaCl	700,00	5,06	733,33	18,81	275,86	2,72	62,07	10,52
Etanol e (NH ₄) ₂ SO ₄	250,00	2,43	683,33	21,71	0,00	0,32	65,52	9,24
NaCl	466,67	5,15	483,33	11,10	0,00	0,40	51,72	0,53
(NH ₄) ₂ SO ₄	216,67	2,93	216,67	5,50	0,00	0,00	3,45	1,87

* Atividade relativa extrato bruto: 0,00%; FP extrato bruto: 1,00

Para a fase precipitada do extrato advindo da FES houve um ensaio que apresentou atividade relativa de 275,86% ($v v^{-1}$) utilizando etanol e NaCl como agentes precipitantes, com rendimento enzimático de 187,93% ($v v^{-1}$). Juntamente a esse pico de atividade alcançou-se um fator de purificação enzimática (FP) de 2,72 vezes. Esse mesmo ensaio para sua respectiva fase sobrenadante alcançou 62,07% ($v v^{-1}$) de atividade relativa, porém com um fator de purificação bem mais elevado que o anterior (10,52 vezes). Para o contraste entre estes resultados, hipotetiza-se que a enzima possa ter precipitado junto com os interferentes enzimáticos, acarretando baixos FP e elevada concentração enzimática; por outro lado, na fase sobrenadante houve FP elevados pela ausência desses mesmos interferentes, mas redução da atividade enzimática pela baixa concentração de enzimas (Tabela 1) (Golunski et al. 2011).

Na FS o comportamento das precipitações se mostrou bem diferente que para a FES. No entanto, ambas as fases precipitada e sobrenadante apresentaram semelhanças entre os ensaios analisados. O ensaio utilizando acetona e NaCl resultou na maior atividade relativa na fase sobrenadante, com 2233,33% ($v v^{-1}$); já para a fase precipitada a maior AR foi com acetona e $(NH_4)_2SO_4$, alcançando 950,00% ($v v^{-1}$). Apesar disso, os fatores de purificação foram bem distintos entre si, obtendo 127,13 e 6,10 vezes, respectivamente. Isso ocorreu possivelmente pela precipitação dos interferentes enzimáticos no processo. Ainda, todos os ensaios das fases precipitada e sobrenadante tiveram rendimento enzimático acima de 100%. Rendimentos maiores de 100% podem ser devido à remoção de metabólitos inibidores das enzimas ou à alta concentração de sal que ajuda a preservar a conformação enzimática, mantendo-a na forma ativa (Pan et al. 2001).

O sulfato de amônio é um dos sais mais utilizado para precipitação de queratinases (Faray e Hassan 2004; Anbu et al. 2008; Kim 2007; Rahayu et al. 2012; Hamiche et al. 2019). Rahayu et al. (2012) obtiveram $0,118 U mL^{-1}$ de atividade de queratinases precipitando-as com 50% de $(NH_4)_2SO_4$ ($w v^{-1}$), atingindo 3,38% de rendimento enzimático. Faray e Hassan (2004) precipitaram queratinases de *Aspergillus oryzae* com $(NH_4)_2SO_4$, acetona ou etanol a 50%. O estudo obteve atividades relativas de 103,93%, 109,18% e 107,85%, respectivamente. Já no presente trabalho, encontramos incrementos enzimáticos mais elevados do que outros estudos que também precipitaram queratinases com sais e solventes orgânicos.

O uso de sais e solventes orgânicos nos processos de precipitação enzimática promovem o aumento da força iônica do sistema e reduzem a constante dielétrica, promovendo interações proteína-proteína que se destacam das interações água-proteína, resultando em agregados proteicos que precipitam (McPherson 2004; Kramer et al. 2012; Zhang et al. 2007; Möller et al. 2012).

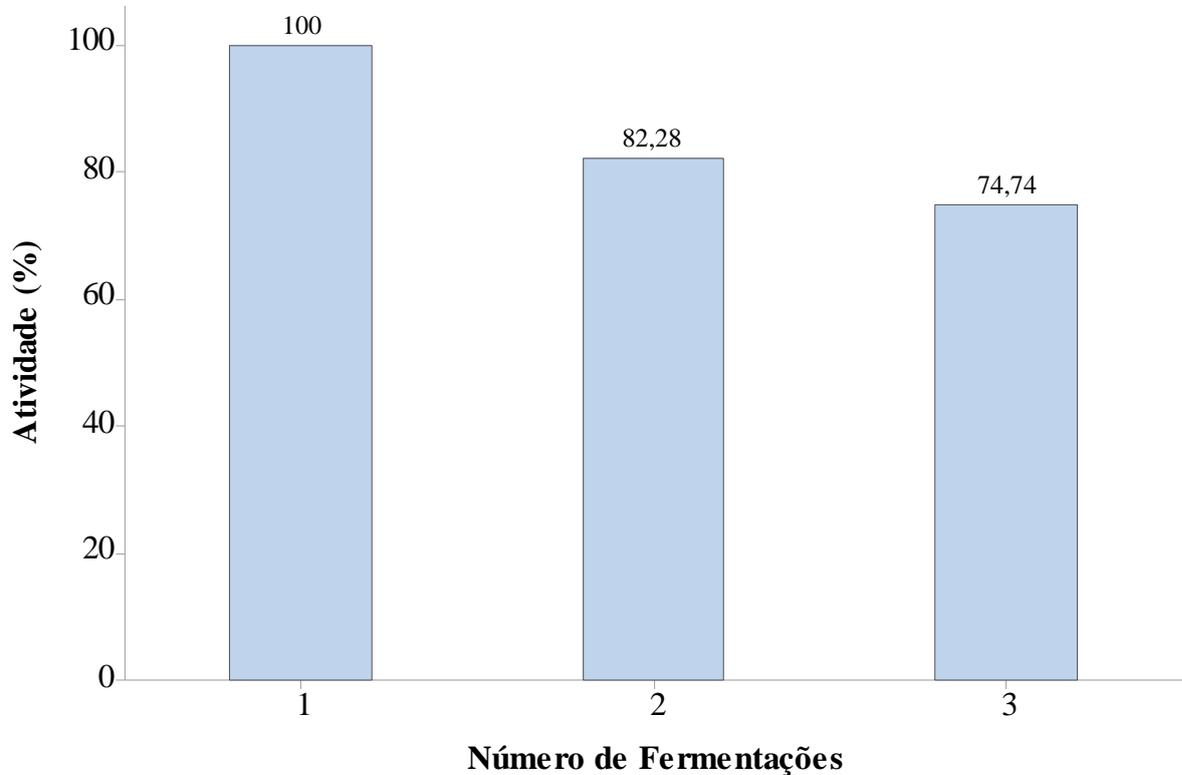
Geralmente, as enzimas são desnaturadas ou têm suas atividades diminuídas durante o contato prolongado com solventes orgânicos; no entanto, estes solventes podem causar ativação enzimática e deixar o sítio ativo da enzima exposto ao meio, facilitando o contato com o substrato, ao mesmo tempo em que moléculas do sal podem ficar aderidas à estrutura da enzima, elevando a força iônica do sistema (Chamorro et al. 1998). Ainda o peso molecular das enzimas produzidas pode variar conforme é modificado o meio de produção, já que moléculas maiores tem maior tendência de se agregarem do que proteínas menores, podendo não ocorrer a precipitação de todas as enzimas existentes no meio (Farinas et al. 2011).

É interessante observar ainda, que para as enzimas produzidas em FES os melhores agentes precipitantes foram etanol e NaCl enquanto para as produzidas em FS os precipitantes que mais elevaram a atividade queratinolítica foram acetona e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Isso sugere que diferentes sistemas fermentativos utilizando mesmo substrato e microrganismo podem resultar em um pool enzimático que se difere entre si pela afinidade por sais e solventes no processo de precipitação.

4.4 REUSO DO PELO SUÍNO

A reutilização de pelos suínos para produção de queratinases foi avaliada durante três ciclos fermentativos consecutivos. A produção enzimática na terceira fermentação manteve 74,74% da atividade queratinolítica inicial (Figura 6). Estudos demonstram que é possível realizar ciclos no decorrer de processos biotecnológicos, mantendo ao final uma porcentagem da produção de compostos de interesse muito semelhante à primeira produção. Neste estudo, a hipótese para a redução da produção de queratinases durante os ciclos fermentativos foi baseada na composição da estrutura do pelo suíno. Quanto mais o resíduo é reutilizado, menor o número de ligações que precisam ser rompidas por queratinases, criando uma maior necessidade de produção de outras proteases que não são de interesse para este estudo (Yamamura et al. 2002; Babaki et al. 2016; Andrade et al. 2017).

Figura 6: Porcentagem de atividade enzimática mantida em cada um dos três processos fermentativos consecutivos com reuso do pelo suíno, considerando a 1^o fermentação como 100% de atividade de queratinases.



Esse resultado do reuso de pelos suínos se torna importante para o desenvolvimento de processos em escala industrial. Os substratos podem ser reutilizados sem perda significativa de atividade enzimática, sem necessidade de esterilização a alta pressão e temperatura, sem suplementação de fontes de carbono e nitrogênio e com o uso de um resíduo agroindustrial com alto potencial poluidor.

5 CONCLUSÃO

A produção de queratinases por fungos utilizando penas de frango e pelos suínos como substrato foi avaliada neste estudo, pois estes ainda são resíduos agroindustriais pouco valorizados devido suas características recalcitrantes. Do total, 2 fungos apresentaram capacidade de degradação de constituintes de queratina e consequente produção de queratinases, sendo eles *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp. No entanto, *Fusarium oxysporum* foi o fungo mais promissor, alcançando elevadas atividades enzimáticas tanto em FS como em FES, tendo pelo suíno e pena de frango como substratos queratinosos.

Com o método de precipitação enzimática alcançou-se valores proeminentes de atividade relativa com elevados fatores de purificação enzimática, observando que as enzimas produzidas em FES e FS possuem comportamentos diferentes frente aos agentes precipitantes utilizados. Ainda, foi possível utilizar o pelo suíno em 3 ciclos consecutivos, mantendo em torno de 75% da atividade inicial, evidenciando um processo industrial de produção enzimática. É importante salientar que o uso de resíduos industriais é primordial na preservação dos ambientes naturais e na minimização dos custos de produção de biocompostos que podem ser empregados no tratamento de várias problemáticas atuais.

6 TRABALHOS FUTUROS

- Realizar FS e FES com outros fungos potencialmente queratinolíticos isolados de resíduos;
- Concentrar as enzimas produzidas pelo método SAB (Sistema Aquoso Bifásico);
- Estudar com mais detalhes as diferenças existentes no processo de precipitação para os extratos enzimáticos provenientes da FS e FES;
- Avaliar a produção de queratinases em FES com *Fusarium oxysporum* após 9 ou mais dias de processo fermentativo utilizando pena de frango e pelo suíno;
- Avaliar o reuso do substrato fermentativo da FES;
- Analisar a possibilidade de ampliação de escala da produção de queratinases;
- Avaliar a estabilidade enzimática de queratinases em diferentes temperaturas e tempos de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Fattah, A., El-Gamal, M., Ismail, S.A., Emran, M.A., Hashem, A.M. (2018). Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16, 311-318.
- Adler, S.A., Slizyte, R., Honkapää, K., Løes, A. (2018). In vitro pepsin digestibility and amino acid composition in soluble and residual fractions of hydrolyzed chicken feathers. *Poultry Science Journal*, 97, 3343-3357.
- Agrahari, S., Wadhwa, N. (2010). Degradation of chicken feather a poultry production by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur Poultry Processing Plant. *International Journal of Poultry Science*, 9, 482-489.
- Anbu, P., Hilda, A., Sur, H., Hur, B., Jayanthi, S. (2008). Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. *International Biodeterioration and Biodegradation.*, 62, 287-292.
- Andrade, T.A., Errico, M., Christensen, K.V. (2017). Castor Oil Transesterification Catalysed by Liquid Enzymes: Feasibility of Reuse under Various Reaction Conditions. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 913-918.
- Anitha, T.S., Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification*, 88, 214-220.
- BAAP – Associação Brasileira de Proteína Animal: Relatório Anual. (2018). <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>.
- Babaki, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Mohammadi, M., Yousefi, P., Mohammadi, J., Brask, J. (2016). Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, *t*-butanol and blue silica gel contents. *Renewable Energy*, 91, 196-206.
- Bagewadi, Z.K., Mulla, S.I., Ninnekar, H.Z. (2018). 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*, 6, 4828-4839.
- Baaka, N., Haddar, W., Ticha, M.B., Amorim, M.T.P., M'Henni, M.F. (2017). Sustainability issues of ultrasonic wool dyeing with grape pomace colourant. *Natural Product Research*, 31, 1655-1662.
- Beres, C., Freitas, S.P., Godoy, R.L.O., Oliveira, D.C.R., Deliza, R., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C., Cabral, L.M.C. (2019). Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value?. *Journal of Functional Foods*, 56, 276-285.
- Bhange, K., Chaturvedi, V., Bhatt, R. (2015). Potential biofilm dispersal by a partially purified keratinase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* strain Kb2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 801-805.

- Bohacz, J., Kornilowicz-Kowalska, T. (2012). Species diversity of keratinophilic fungi in various soil types. *Central European Journal of Biology*, 7, 259-266.
- Botella, C., Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26, 100-106.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S.J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73, 3-12.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., Verneuil, B. (1999). Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2570-2576.
- Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Doni, M.B., Arsene, M., Oancea, F., Jecu, L., Lazăr, V. (2017). Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 101-112.
- Cervantes-González, E., Rojas-Avelizapa, L., Cruz-Camarillo, R., Rojas-Avelizapa, N.G. (2009). Effect of keratinous waste addition on improvement of crude oil hydrocarbon removal by a hydrocarbon-degrading and keratinolytic mixed culture. *International Biodeterioration and Biodegradation.*, 63, 1018-1022.
- Chamorro, S., Alcántara, A.R., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V. (1998). Biotransformations catalyzed by *Candida rugosa* lipase partially purified by precipitation and by organic solvents treatment. *Stability and Stabilization of Biocatalysis*, 15, 741-746.
- Choińska-Pulit, A., Łaba, W., Rodziewicz, A. (2019). Enhancement of pig bristles waste bioconversion by inoculum of keratinolytic bacteria during composting. *Waste Management*, 84, 269-276.
- De Paris Júnior, O., Scapini, T., Camargo, A.F., Venturin, B., Dalastra, C., Kubeneck, S., Czapela, F.F., Preczeski, K.P., Stefanski, F.S., Korf, E.P., Valério, A., Di Luccio, M., Mossi, A.J., Fongaro, G., Treichel, H. (2019). Removal of chromium from wastewater by swine hair residues applied as a putative biofilter. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 33014–33022.
- Drevelegka I., Goula, A.M. (2020). Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 149, 107845.
- Egüés, I., Serrano, L., Amendola, D., De Faveri, D.M., Spigno, G., Labidi, J. (2013). Fermentable sugars recovery from grape stalks for bioethanol production. *Renewable Energy*, 60, 553-558.
- Farag, A.M., Hassan, M.A. (2004). Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 85-93.

- Farinas, C.S., Scarpelini, L.M., Miranda, E.A., Bertuccio Neto, V. (2011). Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 17-26.
- Fraser, R.D.B., MacRae, T.P., Parry, D.A.D., Suzuki, E. (1971). *The structure of feather keratin*. *Polymer*, 12, 35-56.
- Fraser, R.D.B., Parry, D.A.D. (2008). Molecular packing in the feather keratin filament. *Journal of Structural Biology*, 162, 1-13.
- Freitas, J.A.S., Silva, V.R., Luz, F.B., Zwrites, A.L. (2018). Soil carbon and physical-mechanical properties after successive applications of swine and poultry organic waste. *Agricultural Research in the Tropics*, 48, 390-398.
- Ganaie, M.A., Sood, S., Rizvi, G., Khan, T.A. (2010). Isolation and identification of keratinophilic fungi from different soil samples in Jhansi City (India). *Plant Pathology*, 9, 194-197.
- Golunski, S.M., Astolfi, V., Carniel, N., Oliveira, D., Di Luccio, M., Mazutti, M.A., Treichel, H. (2011). Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78, 261-265.
- Guerra-Rivas, C., Vieira, C., Rubio, B., Martínez, B., Gallardo, B., Mantecón, A.R., Lavín, P., Manso, T. (2016). Effects of grape pomace in growing lamb diets compared with vitamin and grape seed extract on meat shelf life. *Meat Science*, 116, 221-229.
- Gupta, R., Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 21-33.
- Hamiche, S., Mechri, S., Khelouia, L., Annane, R., Hattab, M.E., Badis, A., Jaouadi, B. (2019). Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 759-769.
- Herrmann, H., Aebi, U. (2004). Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 749-89.
- Huang, Y., Busk, P.K., Herbst, F.A., Lange, L. (2015). Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 9635-9649.
- Huggins, M.L. (1956). The structure of alpha keratin. *Chemistry*, 43, 204-209.
- Ismail, A.S., Housseing, M.M., Abo-Elmagd, H., El-Sayed, N., Habib, M. (2012). Novel keratinase from *Trichoderma harzianum* MH-20 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 70, 14-19.
- Kachuei, R., Emami, M., Naeimi, B., Diba, K. (2012). Isolation of keratinophilic fungi from soil in Isfahan, province, Iran. *Journal De Mycologie Medicale*, 22, 8-13.

- Kalaikumari, S.S., Vennila, T., Monika, V., Chandraraj, K., Gunasekaran, P., Rajendhran, J. (2019). Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. *Journal of Cleaner Production*, 208, 44-53.
- Kannani, M., Ancy, R.J. (2012). Keratin Degradation and Enzyme Producing Ability of *Aspergillus Flavus* and *Fusarium Solani* From Soil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4, 3245-3248.
- Kim, J. (2007). Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03. *Mycobiology*, 35, 219-225.
- Kornilłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*, 31, 1689-1701.
- Kramer, R.M., Shende, V.R., Motl, N., Pace, C.N., Scholtz, J.J. (2012). Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophysical Journal*, 102, 1907-1915.
- Kunert, J. (1976). Keratin decomposition by dermatophytes. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 16, 97-105.
- Łaba, W., Kopéc, W., Chorążyk, D., Kancelista, A., Piegza, M., Malik, K. (2015). Biodegradation of pretreated pig bristles by *Bacillus cereus* B5esz. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 100, 446-423.
- Lange, L., Huang, Y., Busk, P.K. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature - a new hypothesis of industrial relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2083-2096.
- Lopes, F.C., Silva, L.A.D., Tichota, D.M., Daroit, D.J., Velho, R.V., Pereira, J.Q., Corrêa, A.P.F., Brandelli, A. (2011). Production of Proteolytic Enzymes by a Keratin-Degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Research*, 2011, 1-9.
- Maitig, A.M.A., Alhoot, M.A.M., Tiwari, K. (2018). Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Fungal Isolates of Soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12, 2059-2067.
- Mazotto, A.M., Couri, S., Damaso, M.C.T., Vermelho, A.B. (2013). Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 189-195.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34, 254-265.
- Möller, J., Schroer, M.A., Erlkamp, M., Grobelny, S., Paulus, M., Tiemeyer, S., Wirkert, F.J., Tolan, M., Winter, R. (2012). The Effect of Ionic Strength, Temperature, and Pressure on the Interaction Potential of Dense Protein Solutions: From Nonlinear Pressure Response to Protein Crystallization. *Biophysical Journal*, 102, 2641-2648.
- Monod, M. (2008). Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*, 166, 285-294.

- Oliveira, A.P., Módenes, A.N., Bragião, M.E., Hinterholz, C.L., Trigueros, D.,E.G., Bezerra, I.G.O. (2018). Use of grape pomace as a biosorbent for the removal of the Brown KROMKGT dye. *Bioresource Technology Reports*, 2, 92-99.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., Al-Zarban, S. (1998). 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*, 66, 1-11.
- Pan, I., Yao, H., Li, Y. (2001). Effective extraction and purification of b-xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 196-201.
- Paul, T., Jana, A., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., DasMohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C. (2014). Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning technique towards dairy industries. *Journal of Cleaner Production*, 76, 140-153.
- Pauling, L., Corey, R.B., Branson, H.R. (1951). The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Chemistry*, 37, 205-211.
- Pond, W.G., Maner, J.H., Harris, D.L. (1991). *Pork Production Systems: Efficient Use of Swine and Feed Resources*. New York: Springer.
- Preczeski, K.P., Kamanski, A.B., Scapini, T., Camargo, A.F., Modkoski, T.A., Rossetto, V., Venturin, B., Mulinari, J., Golunski, S.M., Mossi, A.J., Treichel, H. (2018). Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 851-857.
- Queiroga, A.C., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2012). Potential use of wool-associated *Bacillus* species for biodegradation of keratinous materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 70, 60-65.
- Rahayu, S., Syah, D., Suhartono, M.T. (2012). Degradation of keratin by keratinase and disulfide reductase from *Bacillus* sp. MTS of Indonesian origin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 152-158.
- Reddy, M.R., Reddy, K.S., Chouhan, Y.R., Bee, H., Reddy, G. (2017). Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. *Bioresource Technology*, 243, 254-263.
- Sala, L., Gautério, V.G., Younan, F.F., Brandelli, A., Moraes, C.C., Kalil, S.J. (2014). Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. *Process Biochemistry*, 49, 2016-2024.
- Sharma, R., Devi, S. (2018). Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17, 19-45.
- Srivastava, B., Khatri, M., Singh, G., Arya, S.K. (2020). Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119847.

- Starón, P., Kowalski, Z., Starón, A., Banach, M. (2017). Thermal treatment of waste from the meat industry in high scale rotary kiln. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 1157-1168.
- Teles, A. S.C., Chávez, D.W.H., Oliveira, R.A., Bom, E.P.S., Terzi, S.C., Souza, E.F., Gottschalk, L.M.F., Tonon, R.V. (2019). Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International*, 120, 441-448.
- Venturin, B., Camargo, A.F., Scapini, T., Mulinari, J., Bonatto, C., Bazotti, S., Siqueira, D.P., Collca, L.M., Alves Jr, S.L., Bender, J.P., Steinmetz, R.L.R., Kunz, A., Fongaro, G., Treichel, H. (2018). Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production purposes. *Bioresource Technology*, 266, 116-124.
- Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., Meyers, M.A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229-318.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K., Tamiya, E. (2002). Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 1138-1143.
- Zhang, F., Skoda, M.W.A., Jacobs, R.M.J., Martin, R.A., Martin, C.M., Schreiber, F. (2007). Protein Interactions Studied by SAXS: Effect of Ionic Strength and Protein Concentration for BSA in Aqueous Solutions. *Journal of Physical Chemistry, B*, 111, 251-259.