



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

SIMONE KUBENECK

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE
QUERATINASES E POSTERIOR APLICAÇÃO COMO BIOFERTILIZANTES**

ERECHIM

2022

SIMONE KUBENECK

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE
QUERATINASES E POSTERIOR APLICAÇÃO COMO BIOFERTILIZANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como
requisito para a obtenção do título de Engenheira
Ambiental e Sanitarista.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel

ERECHIM

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Kubeneck, Simone

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO
DE QUERATINASES E POSTERIOR APLICAÇÃO COMO
BIOFERTILIZANTES / Simone Kubeneck. -- 2022.

38 f.:il.

Orientadora: Doutora Helen Treichel

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,
Erechim,RS, 2022.

1. Processo fermentativo. 2. Mudanças de tomate. 3.
Enzimas. 4. Pelos Suínos. I. Treichel, Helen, orient.
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

SIMONE KUBENECK

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE
QUERATINASES E POSTERIOR APLICAÇÃO COMO
BIOFERTILIZANTES**

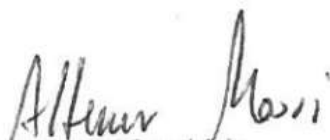
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como
requisito para a obtenção do título de Engenheira
Ambiental e Sanitarista.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 15/08/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel - UFFS
Orientadora



Prof. Dr. Altemir José Mossi – UFFS
Avaliador



Documento assinado digitalmente
CHARLINE BONATTO
Data: 29/08/2022 15:41:42-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ma. Charline Bonatto – UFFS
Avaliadora

Dedico este trabalho aos meus pais Loreci e Wilson Kubeneck, pois foi graças aos seus esforços que hoje estou concluindo esse curso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela minha vida e por ter me mostrado o caminho certo, me ajudando a alcançar todos os objetivos que tive ao longo desse curso e chegar até aqui. Minha eterna gratidão aos meus pais Loreci e Vilson Kubeneck, por terem me apoiado desde o início e me motivado a continuar nos momentos de maior dificuldade. Graças ao apoio e os esforços de vocês hoje estou finalizando um curso de graduação. Muito obrigado Pai e Mãe por me permitirem ter essa oportunidade.

Agradeço ao meu namorado, amigo e parceiro Everton por estar me apoiando durante este período e por todas as vezes que teve que me levar a Universidade, principalmente nos fins de semana. Obrigado por além de ser namorado, ser parceiro e estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e vibrando comigo nos momentos de alegria.

Gostaria de agradecer a todos os professores em que tive aula durante a graduação, em especial a minha orientadora, Professora e Doutora Helen Treichel, muito obrigada por me aceitar como voluntária no início do curso e ter me permitido conhecer o mundo da pesquisa e da ciência, compartilhando conhecimentos que levarei para a vida toda e sendo uma inspiração como professora, amiga e pesquisadora.

Aos meus amigos, meu muito obrigado, em especial a minha amiga Caroline Dalastra, que de colega virou uma amiga para vida toda e que sou muito grata pela nossa amizade. Aos colegas e amigos do LAMIBI, muito obrigado pelas trocas e experiências vividas em laboratório, em especial a Aline Frumi Camargo e a Thamarys Scapini pelas louças lavadas, por terem compartilhado seus conhecimentos e que além de colegas se tornaram amigas.

Também gostaria de agradecer aos técnicos e funcionários da UFFS, principalmente ao Naudio por todo auxílio prestado durante a realização deste trabalho, estando sempre disposto para sanar as minhas dúvidas e colaborando com o trabalho.

Por fim, a todos que fizeram parte de maneira direta ou indireta deste trabalho, deixo aqui meus agradecimentos.

RESUMO

A agroindústria possui participação significativa na economia do País, e os setores frigoríficos responsáveis pelo processamento de carne fazem parte deste setor. O consumo de proteína animal na alimentação vem crescendo constantemente, conforme a Associação Brasileira de Proteína Animal somente em 2020 o consumo de carne chegou a aproximadamente 46 kg/hab. Indústrias frigoríficas responsáveis pelo processamento da carne, tem grande geração de resíduos como pelos suínos, penas de frango, cascos dentre outros, que são ricos em queratina e por conta disso são considerados resíduos de difícil degradação por enzimas comuns e pela ação microbiana, tornando o descarte incorreto desse resíduo um problema ambiental. Devido a elevada quantia de queratina presente nestes resíduos, pelos suínos e penas de frango podem ser utilizados como fontes únicas de carbono e nitrogênio em processos fermentativos de baixo custo para a produção de enzimas como as queratinases, devido a sua capacidade de hidrolisar resíduos com queratina. Nesse contexto, este trabalho objetivou a utilização de pelos suínos para a obtenção de enzimas queratinases e a posterior aplicação do extrato enzimático e dos pelos suínos, em conjunto com microrganismos, como biofertilizantes no crescimento de mudas de tomate, uma vez que este extrato é considerado uma fonte de nutrientes. Portanto, os pelos suínos foram utilizados como substrato em processos fermentativos microbianos em estado sólido e estado submerso, e a partir da melhor condição e tempo de fermentação os extratos enzimáticos obtidos, assim como pelos suínos e microrganismo produtor de queratinase foram aplicados diretamente no solo, afim de avaliar a ação dos mesmos no desenvolvimento de mudas de tomate. Como resultados, foram obtidas atividades queratinolíticas de até 591,51 U/g e o desenvolvimento de forma normal de mudas tomate ao serem aplicados tratamentos tendo como matéria prima os pelos suínos, mesmos tendo valores de altura e diâmetro inferiores ao controle negativo, o qual não havia tratamento. Trazendo uma forma mais econômica e ambientalmente amigável de dispor e utilizar esses resíduos provenientes da agroindústria.

Palavras-chave: processo fermentativo; mudas de tomate; enzimas; pelos suínos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microrganismos utilizados no estudo (A) <i>Aspergillus</i> sp. (B) microrganismo 6B .	16
Figura 2: Processo fermentativo em estado sólido.....	18
Figura 3: Danificações apresentadas nas mudas de tomate devido a variação de temperatura. Da esquerda para direita: (a) Controle negativo; (b) Controle positivo; (c) Pelo + ; (d) Extrato extraído; (e) Extrato extraído e centrifugado	27
Figura 4: Mudas de tomate com tratamento aplicados e com 75 dias de cultivo. Da esquerda para direita: (a) Controle negativo; (b) Controle positivo; (c) Pelo + Microrganismo; (d) Extrato extraído; (e) Extrato extraído e centrifugado.....	31
Figura 5: Cepas de microrganismos do gênero <i>Trichoderma</i> spp.....	31
Figura 6: Microrganismo 6B	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade queratinolítica obtida por meio de processos fermentativos microbianos após 3 dias de fermentação.	21
Tabela 2: Resultados do acompanhamento da altura das mudas de tomate por 75 dias.	25
Tabela 3: Resultados do acompanhamento do diâmetro das mudas de tomate em 75 dias.	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 MICRORGANISMOS	15
3.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	16
3.2.1 Substrato utilizado nas fermentações.....	16
3.2.2 Redução da carga microbiana dos resíduos	16
3.2.3 Fermentação em estado submerso	16
3.2.4 Fermentação em estado sólido.....	17
3.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	18
3.4 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	19
3.5 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO E DE PELOS SUÍNOS EM PLANTAS	19
3.5.1 Avaliação da eficiência da aplicação dos extratos enzimáticos e dos pelos suínos no crescimento de mudas de tomate	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	21
4.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	22
4.3 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO E DE PELOS SUÍNOS NO CRESCIMENTO DE PLANTAS.....	24
4.4 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO 6B	31
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

O setor da agroindústria possui participação significativa no setor econômico do Brasil, entre os segmentos que fazem parte desse setor tem-se os setores frigoríficos responsáveis pelo processamento de carne. O consumo de proteína de animal na alimentação vem crescendo constantemente, conforme a Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA (2020), a produção de carne de frango e carne suína aumentaram cerca de 5,37 e 21,77%, respectivamente desde 2015, sendo os consumos de carne suína e de frango de aproximadamente 16 e 46 kg/hab., respectivamente.

O processo produtivo dos setores agroindustriais possui diversas etapas, desde a criação dos animais até a chegada ao consumidor, dentre eles o setor de abate é responsável pela retirada de pelos suínos, penas de frango, cascos, bicos e sangue. Muitos resíduos gerados nesse setor, como as penas de frango e pelos suínos são de difícil degradação devido a sua composição, sendo geralmente destinados a aterros ou incineração, o que pode ocasionar a liberação de gases tóxicos na atmosfera (ACDA, 2010; HASSAN *et al.*, 2020). Além disso, quando esses resíduos são descartados de forma incorreta, pode haver o acúmulo deles no meio ambiente podendo resultar na poluição de ecossistemas, tornando-se um problema ambiental (SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

Uma alternativa a este problema, é a realização de uma abordagem biotecnológica utilizando esses resíduos para a obtenção de produtos de alto valor agregado. Os pelos suínos e penas de frango são considerados de difícil degradação devido a proteína presente em sua composição. A queratina presente nesses resíduos é uma proteína complexa e rígida, composta de longas ligações dissulfeto, ligações cruzadas e pontes de hidrogênio (GUPTA; RAMNANI, 2006; ONIFADE *et al.*, 1998), e devido a essas ligações presentes nos pelos e penas, os mesmos são considerados polímeros naturais (WANG *et al.*, 2016).

A queratina é classificada pela sua estrutura podendo se apresentar nos formatos α -hélice ou β -folha, também denominadas de α -queratina e β -queratina, respectivamente, e ainda a queratina é dividida quanto a sua dureza, ou seja, quanto maior o teor de enxofre e ligações dissulfeto maior será a dureza do resíduo (GUPTA; RAMNANI, 2006; HASSAN *et al.*, 2020). Os pelos suínos e as penas de frango são classificados em α -queratinas duras e β -queratinas macias, respectivamente, e devido a sua estrutura complexa, esses resíduos acabam sendo resistentes ao ataque microbiano e de enzimas como a pepsina, tripsina e a papaína (DIPANKAR; BHAN, 2019).

Com base em sua composição, esses resíduos são chamados de resíduos queratinosos, e

na literatura é possível encontrar diversos estudos que fazem uso de resíduos desse tipo, como as penas, por exemplo na obtenção de produtos como rações para animais, produtos agrícolas (GUPTA; RAMNANI, 2006; HASSAN *et al.*, 2020) e na produção de enzimas utilizando-as como substratos em processos fermentativos de baixo custo (PRECZESKI *et al.*, 2020).

As queratinases são uma classe de enzimas capazes de hidrolisar resíduos com queratina em sua composição, como pelos suínos e penas de frango, devido a afinidade e alta especificidade dessa enzima por substratos desse tipo (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010; KOTHARI; RANI; GOYAL, 2017), atuando nas ligações peptídicas presentes na estrutura da queratina, transformando-a em uma estrutura mais simples (BHARI *et al.*, 2018; GOPINATH *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2020). A produção dessa enzima se dá por meio de microrganismos como bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos (DIPANKAR; BHAN, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2020). Diante disso, as queratinases microbianas atuam quebrando as ligações dissulfeto presentes na queratina, produzindo a enzima, e em sequência degradando-a (BHARI *et al.*, 2018; GOPINATH *et al.*, 2015; KOTHARI; RANI; GOYAL, 2017; SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

Com base nisso, as queratinases microbianas são consideradas enzimas economicamente viáveis, pois são produzidas utilizando resíduos queratinosos como única fonte de carbono e nitrogênio em processos fermentativos de baixo custo, sem a necessidade pré-tratamentos de alto custo, podendo serem utilizados após realizarem uma redução de carga microbiana (BHANGE; CHATURVEDI; BHATT, 2016; MAZOTTO *et al.*, 2013; PRECZESKI *et al.*, 2020; SRIVASTAVA *et al.*, 2020). Além disso, as queratinases microbianas obtidas a partir dos resíduos queratinosos podem ser aplicadas em outros processos, tais como, indústrias farmacêuticas e têxteis, na produção de rações, detergentes e em produtos agrícolas como biofertilizantes (DIPANKAR; BHAN, 2019).

No entanto, na literatura são encontrados diversos estudos que fazem uso destes resíduos na produção de ração animal, não havendo muitos estudos, exceto os que fazem uso de compostos e hidrolisados de penas frango no crescimento de plantas como grama Bengala e germinação de sementes de tomate (PAUL *et al.*, 2013; BERYL *et al.*, 2021), relatando a utilização de resíduos como os pelos suínos na produção enzimática e sua posterior aplicação como biofertilizantes, sendo esta uma alternativa para valorizar esse resíduo, uma vez que os pelos suínos são uma boa fonte de matéria prima para a produção de queratinases (PRECZESKI *et al.*, 2020).

A utilização das enzimas queratinases na produção de biofertilizantes é considerada uma alternativa promissora, uma vez que o hidrolisado obtido a partir da fermentação com

microrganismos e resíduos queratinosos é considerado uma fonte de nitrogênio (DIPANKAR; BHAN, 2019). O uso do hidrolisado de queratinases como fertilizantes possibilita o incremento de nutrientes e minerais como nitrogênio, fósforo e potássio do solo, favorecendo o crescimento de plantas (DIPANKAR; BHAN, 2019; PAUL *et al.*, 2013). Os microrganismos utilizados na produção do hidrolisado agem por meio de vários mecanismos, como por exemplo a fixação de nitrogênio, solubilização do fosfato por meio dos microrganismos, absorção de ferro, e a liberação metabólitos voltados ao crescimento da planta (BASU; RABARA; NEGI, 2017; BERYL *et al.*, 2021), ocorrendo a liberação e reciclagem de nutrientes e nitrogênio de forma lenta, reduzindo a utilização de fertilizantes químicos que podem prejudicar o meio ambiente (JEONG *et al.*, 2010; TAMREIHAO *et al.*, 2017).

Diante dos aspectos apresentados, pode-se considerar que a utilização de resíduos na produção de enzimas para aplicações posteriores na fabricação de bioprodutos tem se mostrado uma alternativa promissora na diminuição de problemas ambientais, como a contaminação de recursos hídricos e do solo por substâncias químicas e por resíduos de difícil degradação.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a produção de um extrato queratinolítico utilizando resíduos de pelos suínos provenientes da agroindústria e aplicação do extrato queratinolítico como biofertilizantes, com o intuito de valorizar esses resíduos e diminuir a carga de compostos químicos dispostos no solo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é a valorização de resíduos, como pelos suínos provenientes de processos agroindustriais na obtenção de enzimas queratinases para posterior aplicação como biofertilizantes.

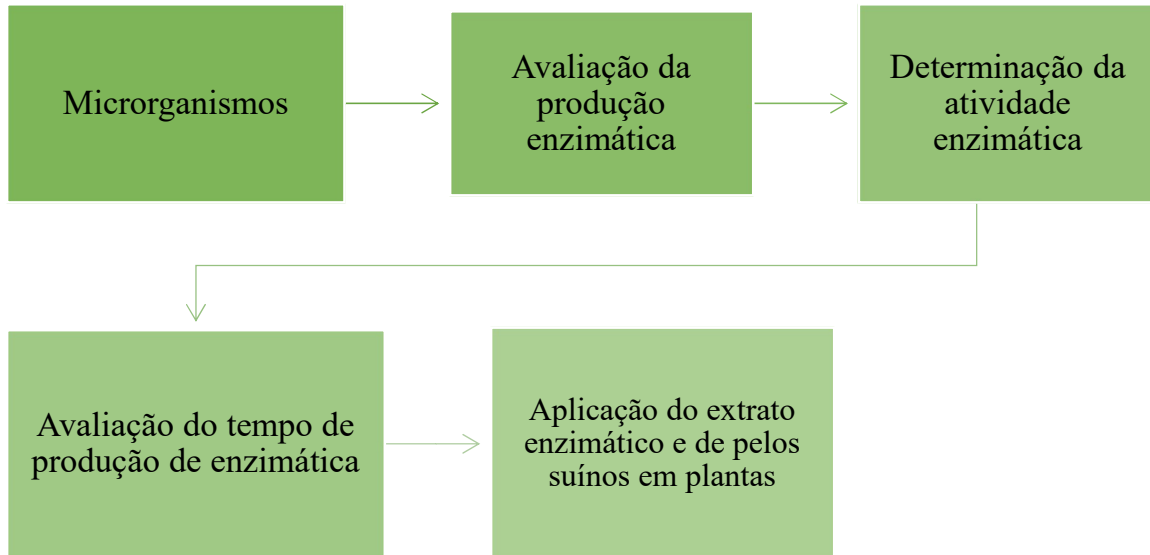
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir queratinases por meio de fermentação submersa e em estado sólido utilizando pelos suínos e isolados fúngicos;
- Avaliar cinética de fermentação e o aumento da massa de substrato por meio do acompanhamento do processo fermentativo;
- Avaliar o potencial do extrato enzimático, dos pelos suínos e microrganismo produtor de queratinase como biofertilizante, aplicando-o no cultivo de mudas de tomate.

3 METODOLOGIA

No Fluxograma 1 é apresentada a sequência de etapas que foram seguidas para a realização deste trabalho. As metodologias aplicadas em cada processo demonstrado no fluxograma estão descritas abaixo.

Fluxograma 1: Sequência de processos realizados no desenvolvimento do trabalho.

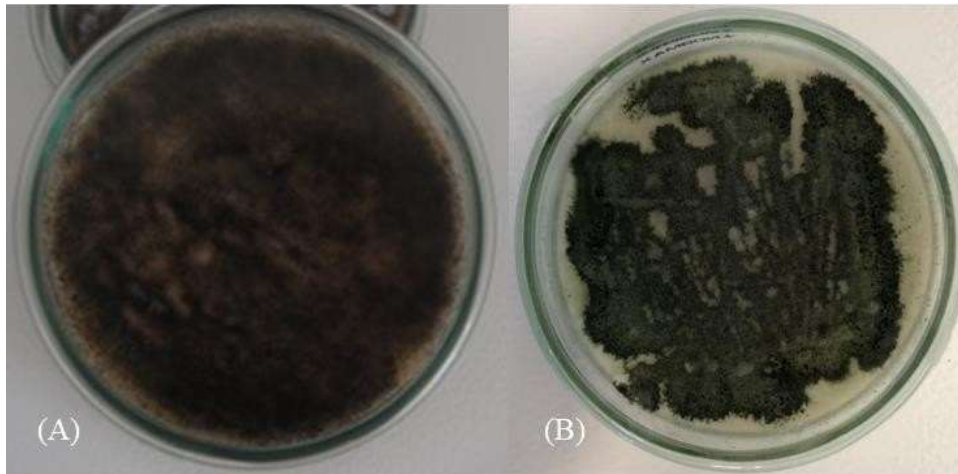


Fonte: A autora

3.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados neste estudo fazem parte do Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI) da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim. Para a realização deste estudo foram utilizados dois microrganismos obtidos em estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Aspergillus* sp. e o microrganismo denominado 6B pelo grupo de pesquisa do LAMIBI, os quais foram isolados de penas de frango previamente dispostas em solos de propriedades rurais locais. Ambos os microrganismos são demonstrados na Figura 1.

Figura 1: Microrganismos utilizados no estudo (A) *Aspergillus* sp. (B) Microrganismo 6B



Fonte: A autora

3.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

3.2.1 Substrato utilizado nas fermentações

A avaliação da produção da enzima queratinase foi realizada usando pelos suínos como substrato, através de processos fermentativos em estado sólido e submerso. Os pelos suínos utilizados neste estudo foram cedidos por uma agroindústria local e armazenados em embalagens de polietileno a 4°C até sua utilização.

3.2.2 Redução da carga microbiana dos resíduos

Os resíduos queratinosos passaram por uma redução de carga microbiana para serem utilizados nos processos fermentativos. Essa redução consistiu na lavagem dos pelos suínos em água corrente e posteriormente secá-los a 70°C por aproximadamente 4 horas em estufa (Adaptado de RAI; KONWARH; MUKHERJEE, 2009).

3.2.3 Fermentação em estado submerso

O processo fermentativo em estado submerso foi realizado conforme a metodologia descrita por Preczeski e colaboradores (2020), sendo o meio composto por 10 g/L de pelos

suínos, 0,1 L de tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,5 e inóculo com células viáveis dos microrganismo com potencial de produção de queratinases, sendo este composto do conteúdo de cerca de 4 placas de petri contendo os microrganismos. O meio foi incubado em agitador orbital a 28°C e 150 RPM por nove dias. A atividade queratinolítica foi determinada em 3, 6 e 9 dias (Adaptado de BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018).

3.2.4 Fermentação em estado sólido

3.2.4.1 Teor de umidade dos resíduos

O teor de umidade dos pelos suínos foi determinado a partir da secagem de aproximadamente 0,5 gramas de pelo suíno em um cadinho por 4 horas a 105 °C em mufla (Adaptado de ABNT, 1986). A porcentagem de umidade foi calculada por meio da equação 1.

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \left(1 - \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2}\right)\right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

M3: Massa final do cadinho + amostra após 4 horas;

M2: Massa de amostra de pelo colocada no cadinho;

M1: Massa do cadinho após 1 hora na mufla.

Com base na porcentagem de umidade dos pelos suínos, por meio da equação 2, foi possível determinar a quantidade de água a ser adicionada ao meio fermentativo para que o mesmo tenha 50% de umidade.

$$\text{Massa de água a ser adicionada} = \frac{U \times (MS + MA) - MAP}{1 - U} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

U: Umidade desejada, sendo essa de 50%, logo U= 0,50; MS: Massa de pelo que se deseja usar para a fermentação;

MAP: Massa de pelo que deve ser adicionada para corrigir a umidade do resíduo.

3.2.4.2 Processo fermentativo

A fermentação em estado sólido foi realizada a partir de uma adaptação da metodologia

de Rai, Konwarh e Mukherjee (2009), em que o meio fermentativo foi composto por aproximadamente 2,5 g de pelos suínos com 50% de umidade, o qual foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e em seguida adicionado o inóculo com células do microrganismo com potencial de produção de queratinases. O meio foi incubado em BOD com umidificação a 28°C por 3 dias, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2: Processo fermentativo em estado sólido.



Fonte: A autora

A extração enzimática foi realizada adicionando 75 mL de tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,5 ao meio fermentativo e incubado em agitador orbital a 150 RPM, 28°C por 1 hora. Posteriormente, a fração sólida foi separada da fração líquida por meio de centrifugação a 2000 RPM, 4°C por 10 minutos.

3.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação de atividade queratinolítica foi realizada conforme adaptação da metodologia de Bressollier e colaboradores (1999), a qual consiste em uma mistura contendo 0,013 g de azoqueratina (SIGMA-ALDRICH Keratin Azure K8500) como substrato padrão, 3,2 mL de tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,5 e 0,8 mL do extrato enzimático. A reação ocorreu em banho ultratermostático a 50°C por 1 hora. Posteriormente, a reação foi cessada com 0,8 mL de ácido Tricloroacético 10% e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que resulta em um aumento na absorbância de 0,01 U após um processo reacional de uma hora. A atividade queratinolítica para o processo em estado sólido foi calculada por meio da equação 3.

$$\text{Atividade queratínolítica: } \frac{\frac{\left(\frac{ABS}{0,01}\right)}{[Massa\ de\ pelo / Volume\ de\ tampão\ na\ extração]}}{Alíquota\ de\ enzima / (Volume\ de\ tampão + Volume\ de\ ácido)} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

Massa de pelo: é quantidade de pelos suínos utilizada no meio fermentativo;

Volume de tampão na extração: quantia de tampão Tric HCl adicionado ao meio para o processo de extração da enzima;

ABS: Valor de absorbancia obtida no espectofotometro;

Alíquota de enzima: No caso do estudo é de 0,8 mL;

Volume de tampão + Volume de ácido: é a quantia de tampão adicionada a mistura da reação (3,2 mL) e o volume de ácido adicionado para cessar a reação (0,8 mL).

Já para o processo fermentativo em estado submerso, a atividade queratinolítica foi calculada por meio da equação 4:

$$\text{Atividade queratinolítica: } \left(\frac{\left(\frac{ABS}{0,01}\right)}{Alíquota\ de\ enzima / (Volume\ de\ tampão + Volume\ de\ ácido)} \right) \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

Alíquota de enzima: No caso do estudo é de 0,8 mL;

Volume de tampão + Volume de ácido: é a quantia de tampão adicionada a mistura da reação (3,2 mL) e o volume de ácido adicionado para cessar a reação (0,8 mL).

3.4 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Com base nos melhores resultados obtidos, foi realizada uma avaliação do tempo de produção da enzima. Para isso, foi realizada uma fermentação de 72 horas, sendo determinada a atividade enzimática a cada 24 horas, com o valor inicial de concentração de substrato (2,5 gramas) e com o dobro do valor inicial de concentração de substrato (5 gramas).

3.5 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO E DE PELOS SUÍNOS EM PLANTAS

A partir da melhor condição de produção enzimática, o extrato enzimático obtido e os

pelos suínos foram aplicados em mudas de tomate do tipo salada, variedade Super Marmande (*Lycopersicon esculentum* Mill). As mudas possuíam idade aproximada de 35 dias ao serem plantadas, sendo provenientes de viveiro certificado e cultivadas em bandejas de polietileno. O plantio das mudas ocorreu no dia 21 de abril de 2022.

Para realizar a aplicação dos extratos enzimáticos e dos pelos suínos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos, conforme descritos na sequência, sendo 5 repetições por tratamento e 1 planta por unidade experimental, plantados em vasos com capacidade volumétrica de 25 litros. Os tratamentos utilizados foram misturados ao solo e aplicados na proporção de 20g de tratamento para 20 kg de terra (Adaptado de BERYL *et al.*, 2021), sendo os tratamentos:

1. Controle negativo: somente terra;
2. Controle positivo: A terra com adição de pelos suínos com correção de umidade;
3. Pelo + Microrganismo: A terra com adição de pelos suínos contendo inóculo do microrganismo produtor de queratinase previamente fermentado por 24 horas;
4. Extrato enzimático extraído: A terra com a adição do extrato enzimático sem o processo de centrifugação descrito no item 3.2.4.2;
5. Extrato enzimático extraído e centrifugado: A terra com a adição do extrato enzimático extraído e centrifugado, conforme o item 3.2.4.2.

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, nas dependências da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim – RS, Brasil (27° 43' 37,97" S – 52° 17' 16,23" O). O solo utilizado para o preenchimento dos vasos foi coletado de 0 a 20 centímetros, nas dependências da área experimental da UFFS, Campus Erechim. As plantas foram irrigadas por sistema de gotejamento.

3.5.1 Avaliação da eficiência da aplicação dos extratos enzimáticos e dos pelos suínos no crescimento de mudas de tomate

A eficiência da aplicação dos tratamentos descritos no item 3.5, na promoção do crescimento das plantas, foi avaliada por meio da evolução do crescimento do diâmetro do caule e da altura das mudas de tomate (BISWAS *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2021), desse modo com o auxílio de um paquímetro digital e de uma trena metálica foi determinado o diâmetro do caule aproximadamente 5 cm acima do colo da muda de tomate e altura da planta mensurando-a do seu colo até o ápice, respectivamente, a cada 15 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A produção da enzima queratinase avaliada em processos fermentativos microbianos em estado sólido e em estado submerso com dois microrganismos distintos, resultou em atividades queratinolítica elevadas para a fermentação em estado sólido, como descrito na Tabela 1, chegando a valores de atividade de aproximadamente 7 e 13 vezes maior que os valores de atividade obtidos para fermentação submersa com o microorganismo *Aspergillus* sp. e 6B, respectivamente, em 3 dias de fermentação.

Tabela 1: Atividade queratinolítica obtida por meio de processos fermentativos microbianos após 3 dias de fermentação.

Atividade queratinolítica		
Microrganismos	Fermentação em estado sólido	Fermentação em estado submerso
	Atividade (U/g)	Atividade (U/mL)
<i>Aspergillus</i> sp.	214,48 \pm 26,81	31,67 \pm 0,92
6B	591,51 \pm 42,34	47,92 \pm 26,81

Fonte: A autora

Mazotto e colaboradores (2013) observaram fenômeno semelhante ao realizar a comparação de produção de queratinases em processos fermentativos em estado sólido e em estado submerso, utilizando penas de frango e 4 cepas distintas de *Aspergillus niger*, em seu estudo. Os autores obtiveram atividade queratinolítica 7 vezes maior no processo fermentativo em estado sólido com a cepa *Aspergillus niger* 3T5B8 em 7 dias de fermentação, se comparado com a fermentação submersa submerso, obtendo uma atividade queratinolítica de 172,7 U/mL (MAZOTTO *et al.*, 2013).

Em outro estudo mais recente Bagewadi, Mulla e Ninnekar (2018), fizeram uso de uma cepa de *Trichoderma harzanium* e resíduos de penas de frango na produção de queratinases em processos fermentativos em estado sólido e submerso e também obtiveram atividades queratinolíticas maiores para o processo em estado sólido, cerca de 1,8 vezes maior em relação a processo submerso, resultando em uma atividade de 1320 U/g em 8 dias de fermentação.

Essa diferença de atividade enzimática entre ambos os processos fermentativos pode estar atrelada ao fato do processo fermentativo em estado sólido se igualar ao ambiente natural que o microrganismo é cultivado, e, portanto, torna o processo de produção enzimática mais eficiente por tornar possível a esporulação do microrganismo ao estar em contato com o resíduo, o que não ocorre no processo em estado submerso por ser um meio totalmente diferenciado habitat natural do microrganismo e com maiores teores de umidade (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022; SINGHANIA *et al.*, 2009). Ainda em relação a avaliação da produção da enzima pelos dois processos fermentativos, para o processo em estado submerso as atividades queratinolíticas em 6 e 9 dias de fermentação foram inferiores as atividades obtidas em 3 dias de fermentação para ambos os microrganismos, sendo essas iguais a $7,25^{\pm 2,58}$ e $12,08^{\pm 3,08}$ para o microrganismo *Aspergillus* sp. em 6 e 9 dias, respectivamente. Para o microrganismo 6B os resultados obtidos em 6 e 9 dias de fermentação em estado submerso foram iguais a $10,33^{\pm 6,33}$ e $11,25^{\pm 0,75}$, respectivamente.

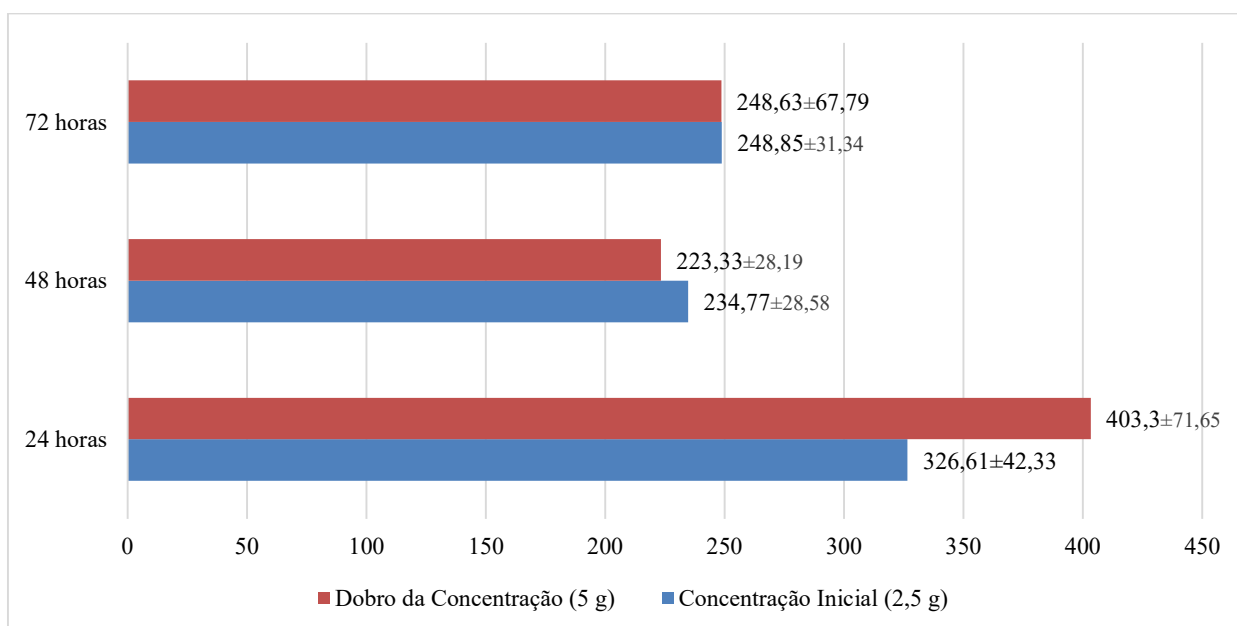
Diante disso, para dar seguimento ao trabalho e com base nos resultados de atividade queratinolítica descritos na Tabela 1, os próximos testes foram realizados com o microrganismo 6B em fermentação em estado sólido por apresentar uma atividade maior em comparação com o *Aspergillus* sp.

4.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A avaliação do tempo de produção enzimática realizada durante 72 horas com meios compostos de 2,813 e 5,765 gramas de pelos suínos resultou em atividades queratinolíticas elevadas nas primeiras 24 horas de fermentação chegando a atividades iguais a $326,61^{\pm 42,33}$ U/g e $403,30^{\pm 71,65}$ U/g, respectivamente.

Já para as demais horas de fermentação se observou atividade queratinolíticas menores e próximas em relação as atividades obtidas em 24 horas de fermentação, como pode ser visto no gráfico 1, tanto para a concentração inicial de substrato como para o dobro da concentração.

Gráfico 1: Atividades queratinolíticas obtidas no processo de acompanhamento da fermentação.



Fonte: A autora

Ao comparar os resultados obtidos em 48 e 72 horas de fermentação com os resultados obtidos na Tabela 1 para o processo em estado sólido, pode se observar uma diminuição dos valores de atividade queratinolítica em 72 horas de fermentação com o microrganismo 6B. Essa diferença nos valores de atividade enzimática pode estar atrelada a fatores externos ao processo, como a temperatura ambiente estar abaixo de 20°C.

A temperatura é uma das variáveis consideradas de extrema importância para processos fermentativos em estado sólido, diante disso é necessário que a temperatura esteja dentro de faixas ótimas dos microorganismos e das enzimas de interesse no estudo, como faixas de temperatura entre 20 e 50 °C (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022).

Oliveira, Souza e Castro (2019), obtiveram valores de atividade enzimática satisfatórios ao realizar a fermentação em estado sólido em temperaturas acima de 24°C, utilizando farinha de penas de frango e *Aspergillus niger* na produção de queratinase e alcançando valores de atividade de até 21,25 U/g em 72 horas de fermentação, comprovando esse fenômeno.

Portanto, a partir dos resultados de atividade queratinolítica obtidos no acompanhamento do tempo de fermentação, para dar seguimento ao processo de aplicação no crescimento de plantas foi determinado que para a obtenção dos extratos enzimáticos seriam realizadas fermentações em estado sólido com duração de 24 horas, uma vez que nas primeiras 24 horas foram obtidas as maiores atividades queratinolíticas.

4.3 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO E DE PELOS SUÍNOS NO CRESCIMENTO DE PLANTAS

A aplicação dos tratamentos citados no item 3.5 ao solo com o objetivo de auxiliar no crescimento de mudas de tomate do tipo salada, variedade Super Marmande (*Lycopersicon esculentum* Mill) apresentou resultados de crescimento satisfatórios, já que as mudas de tomate se desenvolveram de maneira normal, podendo destacar o tratamento denominado “pelo + microrganismo”, o qual se trata somente do pelo em conjunto com o inóculo do microrganismo fermentado durante 24 horas previamente, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados do acompanhamento da altura das mudas de tomate por 75 dias.

Tratamento	Altura (cm)					
	5 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
Controle negativo	18,06 \pm 1,22	20,82 \pm 1,45	28,82 \pm 2,02	40,88 \pm 3,90	54,32 \pm 3,49	78,42 \pm 5,23
Controle positivo	18,22 \pm 1,21	21,26 \pm 1,11	26,52 \pm 1,43	35,06 \pm 3,32	44,6 \pm 3,77	59,56 \pm 4,73
Pelo + Microrganismo	17,72 \pm 4,54	22,16 \pm 1,33	29,32 \pm 1,86	39,7 \pm 3,29	53,60 \pm 4,29	77,58 \pm 6,29
Extrato enzimático extraído ^{1*}	19 \pm 1,12	22,42 \pm 1,28	28,84 \pm 2,21	36,18 \pm 1,55	50,64 \pm 1,98	70,16 \pm 1,82
Extrato enzimático extraído e centrifugado ^{2*}	18,54 \pm 1,06	21,7 \pm 1,77	26,92 \pm 1,17	36,84 \pm 1,09	51,42 \pm 1,91	71,28 \pm 1,35

Fonte: A autora.

^{1*} Extrato enzimático proveniente do processo fermentativo em estado sólido, sendo que no processo de extração enzimática foi apenas adicionado o tampão Tris HCl ao meio e incubado em agitador orbital por 1 hora.

^{2*} Extrato enzimático proveniente do processo fermentativo em estado sólido, sendo que no processo de extração enzimática foi adicionado o tampão Tris HCl ao meio, incubado em agitador orbital por 1 hora e após centrifugado, sendo utilizado a porção líquida como tratamento no crescimento das mudas de tomate.

Ao comparar o tratamento “pelo + microrganismo” com o controle negativo, o qual não possuía nenhum tipo de tratamento, pode se observar valores de altura muito próximos podendo ser considerado um tratamento eficiente, devido a esta proximidade. Estudos recentes, como o de Beryl e colaboradores (2021), o qual aplicaram compostos de penas de codorna em conjunto com inóculo de cepas de bactérias do gênero *Bacillus* sp. na germinação de sementes de tomate e acompanharam o crescimento das mudas, obtiveram alturas de até 26,44 centímetros para as mudas de tomate, constatando que compostos que possuem queratina podem ser considerados fontes de nutrientes em conjunto com microrganismos produtores de queratinases.

Além disso, a diferença obtida com a aplicação do tratamento “pelo + microrganismo” em relação aos demais tratamentos pode estar relacionada com a ação microbiana promovida pelo microrganismo 6B, podendo ocorrer a liberação de nutrientes como carbono solúvel e nitrogênio que estimulam o crescimento de plantas (PAUL *et al.*, 2013).

Alguns microrganismos são destacados na literatura por possuírem ações microbianas que estimulam o desenvolvimento de plantas, como microrganismos do gênero *Trichoderma* sp., pois possuem a capacidade de aumentar a absorção de nutrientes como cádmio, arsênio, cobalto, magnésio e zinco dentre outros nutrientes, além de aumentar a eficiência do uso de nitrogênio pela planta, sendo os nutrientes solubilizados do próprio solo em que o microrganismo é inoculado (HARMAN *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2019; TARIQJAVEED *et al.*, 2021).

Em relação aos demais tratamentos como “extrato enzimático extraído” e “extrato enzimático extraído e centrifugado”, em que houve a aplicação do extrato enzimático líquido em ambos os tratamentos, se obteve alturas muito próximas entre os tratamentos, no entanto suas alturas foram menores em relação ao “controle negativo” e o tratamento “pelo + microrganismo”.

No entanto, ao mensurar o diâmetro do caule, se obteve resultados relativamente maiores em relação aos tratamentos “pelo + microrganismo” e “controle positivo”, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados do acompanhamento do diâmetro das mudas de tomate em 75 dias.

Tratamento	Diâmetro (mm)					
	5 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
Controle negativo	3,41 ±0,16	3,86 ±0,21	4,19 ±0,16	5,09 ±0,51	5,56 ±0,50	6,80 ±0,60
Controle positivo	3,74 ±0,09	3,86 ±0,33	3,99 ±0,17	4,03 ±0,38	4,92 ±0,73	5,51 ±0,43
Pelo + Microrganismo	4,08 ±0,12	3,81 ±0,17	4,29 ±0,14	4,91 ±0,30	5,93 ±0,89	6,08 ±0,43
Extrato enzimático extraído ^{1*}	3,67 ±0,07	3,56 ±0,11	4,11 ±0,21	4,33 ±0,18	5,03 ±0,28	6,10 ±0,40
Extrato enzimático extraído e centrifugado ^{2*}	3,46 ±0,27	4,18 ±0,53	4,38 ±0,37	5,11 ±0,30	4,91 ±0,35	6,21 ±0,48

Fonte: A autora.

^{1*} Extrato enzimático proveniente do processo fermentativo em estado sólido, sendo que no processo de extração enzimática foi apenas adicionado o tampão Tris HCl ao meio e incubado em agitador orbital por 1 hora.

^{2*} Extrato enzimático proveniente do processo fermentativo em estado sólido, sendo que no processo de extração enzimática foi adicionado o tampão Tris HCl ao meio, incubado em agitador orbital por 1 hora e após centrifugado, sendo utilizado a porção líquida como tratamento no crescimento das mudas de tomate.

Alguns estudos, como o de Paul e colaboradores (2013) que fizeram o uso de hidrolisado de penas de frango fermentado com *Paenibacillus woosongensis* TKB2 no crescimento de gramas Bengala, observaram que após a aplicação do hidrolisado, houve um aumento significativo da raiz em comparação com a planta controle, chegando a crescimentos de até 19,95 centímetros. Diante disso, no caso desse estudo os “extratos enzimáticos extraídos” e “extraído e centrifugado” atuaram nas mudas de tomate, de forma que promovessem o aumento do diâmetro do caule.

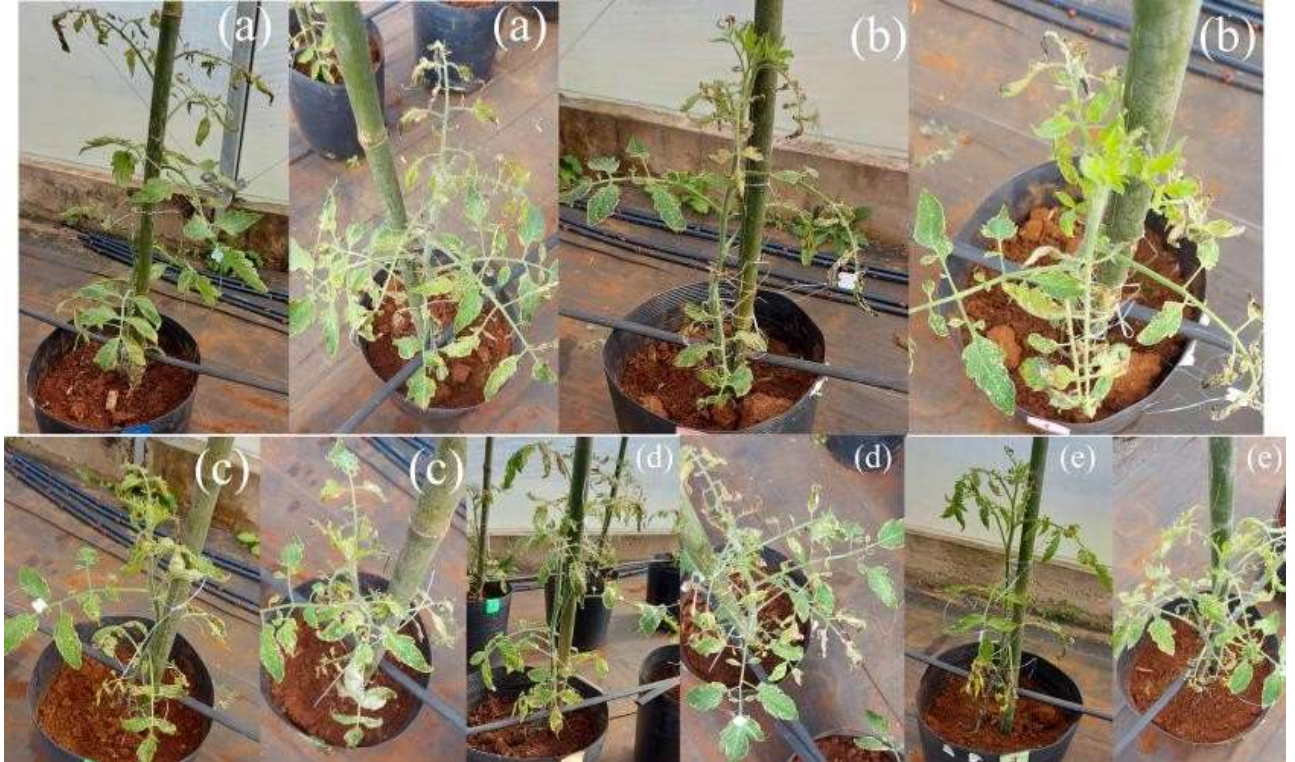
Conforme Bhari, Kaur e Singh (2021) hidrolisados obtidos por meio de alguns resíduos queratinosos, são ricos em aminoácidos como lisina, leucina, isoleucina dentre outros, que possuem papel fundamental na fisiologia de plantas, como na formação de tecidos vegetais e síntese de vitaminas e proteínas além de regular funções vitais das plantas (SEDERA *et al.*, 2010 *apud* BHARI; KAUR; SINGH, 2021; DU JARDIN, 2015; POPKO *et al.*, 2018). Diante disso, a aplicação de ambos os tratamentos pode resultar em diâmetros maiores devido a fácil disponibilidade de aminoácidos que auxiliem no desenvolvimento das raízes das plantas, por ser um tratamento aplicado de forma líquida.

Além disso, devido a capacidade que os microrganismos possuem de transformar a queratina das penas em peptídeos mais acessíveis pode haver a melhoria das características do solo ao aplicar os extratos enzimáticos, influenciando de forma benéfica o desenvolvimento das mudas de tomate (BERYL *et al.*, 2021), pois ao comparar os tratamentos envolvendo pelos suínos com o controle positivo, o qual era composto somente por pelos suínos sem a adição de inóculo de microrganismo, se obteve os menores resultados de diâmetro e altura, comprovando que é necessário a ação do microrganismo para estes resíduos atuarem no desenvolvimento das plantas e na liberação de aminoácidos e nutrientes para o solo e a planta (JEONG *et al.*, 2010).

Ainda entre os fatores que puderam ocasionar a diferença entre os resultados de altura e diâmetro das mudas com e sem tratamentos aplicados é a variação de temperatura. Durante a realização do estudo as condições climáticas da região sul, principalmente no estado do Rio Grande do Sul tiveram muitas variações de temperatura, variando de 20°C a 4°C em tempos curtos, além da formação de geada, o que resultou em pequenas danificações nas mudas de tomate, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3: Danificações apresentadas nas mudas de tomate devido a variação de temperatura.

Da esquerda para direita: (a) Controle negativo; (b) Controle positivo; (c) Pelo +Microorganismo; (d) Extrato extraído; (e) Extrato extraído e centrifugado



Fonte: A autora.

Porém, com o aumento da temperatura as mudas retomaram o seu crescimento e se desenvolveram de maneira satisfatória com 75 dias de cultivo, como demonstrado na Figura 4.

Figura 4: Mudas de tomate com tratamento aplicados e com 75 dias de cultivo. Da esquerda para direita: (a) Controle negativo; (b) Controle positivo; (c) Pelo + Microrganismo; (d) Extrato extraído; (e) Extrato extraído e centrifugado.



Fonte: A autora.

Com base nos resultados obtidos na aplicação dos tratamentos no crescimento das mudas de tomate e por se tratar de um dos primeiros estudos a serem realizados utilizando os pelos suínos como matéria prima, se obteve resultados satisfatórios uma vez que as plantas se desenvolveram sem apresentar modificações negativas causadas pela aplicação dos tratamentos.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO 6B

Com base nos resultados de altura obtidos para o tratamento “pelo + microrganismo” ao serem aplicados nas mudas de tomate e por meio de análises visuais se estima que o microrganismo 6B utilizado neste estudo seja uma cepa do gênero *Trichoderma* spp. devido a semelhança com algumas cepas demonstradas na Figura 5.

Figura 5: Cepas de microrganismos do gênero *Trichoderma* spp.



Fonte: BRIDŽIUVIENĖ *et al.*, 2022; ZIN; BADALUDDIN, 2020.

O microrganismo 6B, demonstrado na Figura 6, além de ser semelhante as cepas demonstradas na Figura 5, ao ser aplicado nos pelos suínos em contato com o inóculo do 6B diretamente no solo para o crescimento das mudas de tomate resultou nos maiores valores de altura entre os tratamentos aplicados que possuem os pelos suínos como matéria prima. Este fato pode estar atrelado ao gênero do microrganismo, uma vez que *Trichoderma* spp. são considerados bons microrganismos para o crescimento de plantas, devido ao efeito causado de forma direta no desenvolvimento das mesmas (ZIN;BADALUDDIN, 2020).

Figura 6: Microrganismo 6B



Fonte: A autora.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A produção de queratinases utilizando pelos suínos, ainda é pouco relatada na literatura. Este estudo, mostrou que este resíduo pode ser utilizado como substrato para obtenção de enzimas queratinases por meio de processo fermentativo de baixo custo, uma vez que se trata de uma enzima de alto valor comercial e de baixa produção devido a sua alta especificidade. Também verificamos que os pelos suínos juntamente com o microrganismo pode auxiliar no crescimento de plantas, resultando no desenvolvimento de mudas de tomate de forma satisfatória.

Ainda, por ser um dos primeiros estudos a fazer a aplicação envolvendo este resíduo no crescimento de mudas de tomate, o mesmo permitiu a abertura para estudos futuros que envolvam desde o uso dos tratamentos testados neste estudo na germinação de sementes, até aplicação dos tratamentos em maior volume e de outras maneiras, como por exemplo o uso dos tratamentos líquidos na regagem das mudas, sem ser diretamente no solo, fornecendo uma destinação final mais nobre para os pelos suínos, que são considerados um problema ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Gráfico de Setores**. 2020. Disponível em: < <https://abpa-br.org/mercados/> >. Acesso em: 23 jul. 2022

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457**: Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização. 1986. 09 p.

ACDA, Menandro N. Waste chicken feather as reinforcement in cement-bonded composites. **Philippine Journal of Science**, vol. 139, no. 2, p. 161–166, 2010.

BAGEWADI, Zabin K.; MULLA, Sikandar I.; NINNEKAR, Harichandra Z. Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, vol. 6, no. 4, p. 4828–4839, 2018.

BASU, Supratim; RABARA, Roel; NEGI, Sangeeta. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, vol. 12, p. 43–49, 2017.

BERYL, Goldy Primo; THAZEEM, Basheer; UMESH, Mridul; SENTHILKUMAR, Kandasamy; KUMAR, Manickam Naveen; PREETHI, Kathirvel. Bioconversion of feather composts using proteolytic *Bacillus mycooides* for their possible application as biofertilizer in agriculture. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-15, 2021.

BHANGE, Khushboo; CHATURVEDI, Venkatesh; BHATT, Renu. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. **Biotechnology Reports**, vol. 10, p. 94–104, 2016.

BHARI, Ranjeeta; KAUR, Manpreet; SINGH, Ram Sarup. Chicken Feather Waste Hydrolysate as a Superior Biofertilizer in Agroindustry. **Current Microbiology**, vol. 78, no. 6, p. 2212–2230, 2021.

BHARI, Ranjeeta; KAUR, Manpreet; SINGH, Ram Sarup; PANDEY, Ashok; LARROCHE, Christian. Bioconversion of chicken feathers by *Bacillus aerius* NSMk2: A potential approach in poultry waste management. **Bioresource Technology Reports**, vol. 3, p. 224–230, 2018.

BISWAS, Ishita; MITRA, Debasis; SENAPATI, Ansuman; MITRA, Debanjan; CHATTARAJ, Sourav; ALI, Murshed; BASAK, Goutam; PANNEERSELVAM, Periyasamy; MOHAPATRA, Pradeep K. Das. Valorization of vermicompost with bacterial fermented chicken feather hydrolysate for the yield improvement of tomato plant: A novel organic combination. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, vol. 10, no. 1, p. 29–42, 2021.

BRANDELLI, Adriano; DAROIT, Daniel J.; RIFFEL, Alessandro. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 85, p. 1735–1750, 2010.

BRESSOLLIER, Philippe; LETOURNEAU, François; URDACI, Maria; VERNEUIL, Bernard. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, no. 6, p. 2570–2576, 1999.

BRIDŽIUVIENĖ, Danguolė; RAUDONIENĖ, Vita; ŠVEDIENĖ, Jurgita; PAŠKEVIČIUS, Algimantas; BAUŽIENĖ, Ieva; VAITONIS, Gintautas; ŠLEPETIENĖ, Alvyra; ŠLEPETYS, Jonas; KAČERGIUS, Audrius. Impact of Soil Chemical Properties on the Growth Promotion Ability of *Trichoderma ghanense*, *T. tomentosum* and Their Complex on Rye in Different Land-Use Systems. **Journal of Fungi**, vol. 8, no. 1, 2022.

CHILAKAMARRY, Chaitanya Reddy; MIMI SAKINAH, A. M.; ZULARISAM, A. W.; SIROHI, Ranjna; KHILJI, Irshad Ahamad; AHMAD, Noormazlinah; PANDEY, Ashok. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. **Bioresource Technology**, vol. 343, p. 126065, 2022.

DIPANKAR, Pankaj; BHAN, Chandra. Role of keratinase in bioremediation of feathers and hairs. In: BHATT, Pankaj. **Smart Bioremediation Technologies: microbial enzymes**. [S. I.]: Elsevier Inc., 2019. Cap. 5. p. 83-98.

DU JARDIN, Patrick. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, vol. 196, p. 3–14, 2015.

GOPINATH, Subash C.B.; ANBU, Periasamy; LAKSHMIPRIYA, Thangavel; TANG, Thean Hock; CHEN, Yeng; HASHIM, Uda; RUSLINDA, A. Rahim; ARSHAD, M. K. Md. Biotechnological aspects and perspective of microbial Keratinase production. **BioMed Research International**, vol. 2015, p. 1-10, 2015.

GUPTA, Rani; RAMNANI, Priya. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 70, p. 21–33, 2006.

HARMAN, Gary E.; HOWELL, Charles R.; VITERBO, Ada; CHET, Ilan; LORITO, Matteo. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 2, no. 1, p. 43–56, 2004.

HASSAN, Mohamed A.; ABOL-FOTOUH, Deyaa; OMER, Ahmed M.; TAMER, Tamer M.; ABBAS, Eman. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 154, p. 567–583, 2020.

JEONG, Jin Ha; LEE, O. Mi; JEON, Young-Dong; KIM, Jeong-Do; LEE, Na-Ri; LEE, Chung-Yeol; SON, Hong-Joo. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. **Process Biochemistry**, vol. 45, no. 10, p. 1738–1745, 2010.

KOTHARI, D.; RANI, A.; GOYAL, A. Keratinases. In: PANDEY, Ashok; NEGI, Sangeeta; SOCCOL, Carlos Ricardo. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: production, isolation and purification of industrial products**. [S. I.]: Elsevier Inc., 2017. Cap.19. p. 447-469.

MAZOTTO, Ana Maria; COURI, Sonia; DAMASO, Mônica C.T.; VERMELHO, Alane Beatriz. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 85, p. 189–195, 2013.

OLIVEIRA, Cassio Carmo de; SOUZA, Ana Karoliny Santos de; CASTRO, Ruann Janser Soares de. Bioconversion of Chicken Feather Meal by *Aspergillus niger*: Simultaneous Enzymes Production Using a Cost-Effective Feedstock Under Solid State Fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, vol. 59, no. 2, p. 209–216, 2019.

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**, vol. 66, p. 1–11, 1998.

PAUL, Tanmay; HALDER, Suman K.; DAS, Arpan; BERA, Surojit; MAITY, Chiranjit; MANDAL, Arpita; DAS, Partha S.; MOHAPATRA, Pradeep K. Das; PATI, Bikas R.; MONDAL, Keshab C. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 2, no. 1, p. 50–57, 2013.

POPKO, Małgorzata; MICHALAK, Izabela; WILK, Radosław; GRAMZA, Mateusz; CHOJNACKA, Katarzyna; GÓRECKI, Henryk. Effect of the new plant growth biostimulants based on amino acids on yield and grain quality of winter wheat. **Molecules**, vol. 23, no. 2, p. 1–13, 2018.

PRECZESKI, Karina Paula; DALASTRA, Caroline; CZAPELA, Fabiane Fernanda; KUBENECK, Simone; SCAPINI, Thamaris; CAMARGO, Aline Frumi; ZANIVAN, Jessica; BONATTO, Charline; STEFANSKI, Fábio Spitzza; VENTURIN, Bruno; FONGARO, Gislaine; TREICHEL, Helen. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as keratinase producers using swine hair from agroindustrial residues. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 8, p. 1–8, 2020.

RAI, Sudhir K.; KONWARH, Rocktotpal; MUKHERJEE, Ashis K. Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline β -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 45, no. 3, p. 218–225, 2009.

SINGH, Bansh Narayan; DWIVEDI, Padmanabh; SARMA, Birinchi Kumar; SINGH, Gopal Shankar; SINGH, Harikesh Bahadur. A novel function of N-signaling in plants with special reference to *Trichoderma* interaction influencing plant growth, nitrogen use efficiency, and cross talk with plant hormones. **3 Biotech**, vol. 9, no. 3, p. 1–13, 2019.

SINGHANIA, Reeta Rani; PATEL, Anil Kumar; SOCCOL, Carlos R.; PANDEY, Ashok. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 44, no. 1, p. 13–18, 2009.

SRIVASTAVA, Binti; KHATRI, Madhu; SINGH, Gursharan; ARYA, Shailendra Kumar. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. **Journal of Cleaner Production**, vol. 252, p. 1-26, 2020.

SUN, Zhongtao; LI, Xianyao; LIU, Kexin; CHI, Xiaoli; LIU, Liying. Optimization for production of a plant growth promoting agent from the degradation of chicken feather using keratinase producing novel isolate *Bacillus pumilus* JYL. **Waste and Biomass Valorization**, vol. 12, p. 1943–1954, 2021.

TAMREIHAO, K.; DEVI, Laishram Jaya; KHUNJAMAYUM, Rakhi; MUKHERJEE, Saikat; ASHEM, Roshan Singh; NINGTHOUJAM, Debananda S. Biofertilizing potential of feather hydrolysate produced by indigenous keratinolytic *Amycolatopsis* sp. MBRL 40 for rice cultivation under field conditions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 10, p. 317–320, 2017.

TARIQJAVEED, Muhammad; FAROOQ, Tahir; AL-HAZMI, Ahmad Saad; HUSSAIN, Muhammad Dilshad; REHMAN, Amin Ur. Role of *Trichoderma* as a biocontrol agent (BCA)

of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 183, no. May, p. 107626, 2021.

WANG, Bin; YANG, Wen; MCKITTRICK, Joanna; MEYERS, Marc André. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, vol. 76, p. 229–318, 2016.

ZIN, Nur A.; BADALUDDIN, Noor A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, vol. 65, no. 2, p. 168–178, 2020.