



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Carolini Esmeriz da Rosa

**PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS POR *Bacillus* sp.
P45 EM SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2020

Carolini Esmeriz da Rosa

**PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS POR *Bacillus* sp.
P45 EM SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

da Rosa, Carolini Esmeriz
Produção de peptídeos antimicrobianos por *Bacillus*
sp. P45 em subprodutos da indústria avícola. /
Carolini Esmeriz da Rosa. -- 2020.
91 f.
Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. *Bacillus*. 3.
Bioconversão. 4. Resíduos avícolas. I. Brandelli,
Adriano, orient. II. Título.

“Lembra-te que és pó, e ao pó hás de voltar”

Gênesis 3, 19

“Somos feitos de poeira das estrelas”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

A Deus. Obrigada por sua graça e amor infinito.

A minha família, especialmente aos meus pais e meu irmão, pelo apoio e incentivo constante durante em toda a minha vida, até quando minhas decisões me levavam para longe.

Ao meu namorado, André, por seu companheirismo, apoio, compreensão nas minhas ausências e por ser refrigerio em meus momentos difíceis. Obrigada Habibo!

Ao meu orientador, professor Adriano Brandelli, pelo aceite em teu grupo de pesquisa, por tua orientação, por todos os teus ensinamentos, pelos momentos de discussões e por tua paciência. Tu és fonte de inspiração, e é uma alegria e um privilégio ser tua aluna. Obrigada Sor!

Ao professor Alexandre Fuentefria, que acreditou em mim e abriu as portas da instituição. Obrigada de todo coração professor.

Aos colegas do Laboratório 218, vocês certamente são um presente que eu recebi! Cristian, Henrique, Diego, Maria, Palmira, Paolo, Isadora, Carolina, Flávio e Priscilla e Jamile, obrigada por toda ajuda e ensinamentos, por me acalmarem quando eu achava que não conseguiria, pelas risadas, debates e café compartilhados. Sou grata por ter dividido essa etapa da minha vida com vocês!

À minha colega Fernanda, por sempre me puxar para realidade, pelas longas conversas virtuais e por mesmo sem estarmos no mesmo lab ou na mesma área foi uma linda companhia nessa caminhada!

As minhas amigas de MG, Camila, Jadiane, Débora e Verônica obrigada por me apoiarem tanto numa das maiores decisões da minha vida! Obrigada por torcerem sempre por mim, por se alegrarem comigo nas vitórias. Obrigada pela amizade que apesar da distância, quando estamos juntas parece que nada mudou!

Amo vocês!

A amiga querida Laila, pela compreensão das minhas ausências, tanto online quanto fisicamente. Por tantos anos de amizade, obrigada por me ensinar tanto. E a minha irmã de coração, Verônica Maia, por esses 18 anos de amizade. Por ter me incentivado ao ponto de me acolher na tua casa, para que esse sonho fosse realizado. Obrigada bebê, te amo!

Aos professores e colegas que não esmorecem em defender a educação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e referência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS POR *Bacillus* sp. P45 EM SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA¹

Autor: Carolini Esmeriz da Rosa

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

RESUMO

Destacada mundialmente como uma das maiores produtoras e exportadoras de carne de frango, a indústria brasileira enfrenta o desafio de gerir resíduos e subprodutos da avicultura, como materiais ricos em queratina. Nesse contexto, o bioprocessamento de alguns desses subprodutos com bactérias do gênero *Bacillus* sp. configurou-se como uma alternativa ao acúmulo e descarte inadequado desses resíduos. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a produção de compostos antimicrobianos de *Bacillus* sp. P45 quando cultivado em BHI e em substratos queratinosos da indústria avícola como penas (MMP) e farinha de penas (MMFP). Dos meios de cultura foram coletadas oito alíquotas, em tempos diferentes, para monitoramento do crescimento bacteriano, atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, bem como para quantificação de proteínas solúveis e aminoácidos. Observou-se que os meios de cultura em BHI e MMFM de *Bacillus* sp. P45 apresentou atividade inibitória contra a cepa indicadora, atingindo 3200 AU e 800 AU, respectivamente. A quantificação de aminoácidos livres revelou valores semelhantes em MMFM e MMF, enquanto as determinações de proteínas solúveis em MMFM foram 83% maiores do que as encontradas em MMF. A espectrometria de MALDI-TOF sugere a presença de surfactina, fengicina e iturina nas culturas de MMFM e BHI. A análise do genoma corrobora esses resultados e indica uma nova identificação para a linhagem. Concluiu-se que a concentração de proteínas solúveis encontradas em farinha de penas é um fator determinante para a atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. P45. Assim, a farinha de penas é sugerida como um substrato potencial para a produção de peptídeos antimicrobianos, no entanto mais estudos devem ser realizados para determinar outros fatores que podem afetar a produção dos peptídeos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98 p.) Agosto, 2020.

PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES BY *Bacillus* sp. P45 IN BY-PRODUCTS OF THE POULTRY INDUSTRY¹

Author: Carolini Esmeriz da Rosa

Advisor: Prof. Dr. Adriano Brandelli

ABSTRACT

Highlighted worldwide as one of the largest producers and exporters of chicken meat, the Brazilian industry faces the challenge of managing poultry waste and by-products, as materials rich in keratin. In this context, the bioprocessing of some of these by-products with bacteria of the genus *Bacillus* sp. configured as an alternative to the accumulation and improper disposal of this waste. Thus, the objective of this work was to identify and evaluate the production of antimicrobial compounds from *Bacillus* sp. P45 when grown in BHI and keratinous substrates of the poultry industry such as feathers (MMP) and feather meal (MMFP). From the culture media, eight aliquots were collected, at different times, for monitoring bacterial growth, antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, as well as for quantification of soluble proteins and amino acids. It was observed that the culture media in BHI and MMFM of *Bacillus* sp. P45 showed inhibitory activity against the indicator strain, reaching 3200 AU and 800 AU, respectively. The quantification of free amino acids revealed similar values in MMFM and MMF, while the determinations of proteins soluble in MMFM were 83% higher than those found in MMF. MALDI-TOF spectrometry suggests the presence of surfactin, fengicin and iturin in MMFM and BHI cultures. Genome analysis corroborates these results and indicates a new identification for the strain. It was concluded that the concentration of soluble proteins found in feather meal is a determining factor for the antimicrobial activity of *Bacillus* sp.P45. Thus, feather meal is suggested as a potential substrate for the production of antimicrobial peptides, however further studies must be carried out to determine other factors that may affect the production of the peptides.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98 p.) August, 2020.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Proteases	4
3.1.1 Classificação e mecanismos de ação	4
3.1.1.1 Queratinases e micro-organismos queratinolíticos	6
3.1.1.1.1 Aplicações das queratinases	8
3.2 Queratinas	10
3.2.1 Resíduos Avícolas	11
3.3 Gênero <i>Bacillus</i>	14
3.3.1 Peptídeos Antimicrobianos	15
3.3.2 <i>Bacillus</i> sp. P45	18
3.4 Biosurfactantes e lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus</i> sp	20
3.4.1 Iturina	21
3.4.2 Fengicina	22
3.4.3 Surfactina	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Meios de cultura	26
4.2 Micro-organismos	26
4.2.1 Micro-organismo – <i>Bacillus</i> sp P45	26
4.2.2 Micro-organismo indicador	26
4.2.3 Manutenção e estoque de micro-organismos	26
4.3 Curva de crescimento	27
4.3.1 Preparação do pré-inóculo	27
4.3.2 Curva de crescimento e amostragem	27
4.3.3 Determinação do número de células viáveis	27
4.3.4 Determinação de atividade antimicrobiana	28

4.3.5	Determinação da concentração de aminoácidos livres	28
4.3.6	Determinação da concentração de proteínas solúveis	29
4.4	Índice de emulsão.....	29
4.5	Obtenção do sobrenadante bruto.....	30
4.5.1	Preparação do pré-inóculo.....	30
4.5.2	Obtenção do sobrenadante.....	30
4.6	Purificação Parcial.....	30
4.6.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio	31
4.6.2	Cromatografia de gel filtração	32
4.6.3	Identificação por MALDI-TOF MS (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz) 32	
4.7	Sequenciamento e montagem do genoma	33
4.7.1	Comparação entre genomas.....	33
4.7.2	Identificação de cluster gênicos de metabólitos secundários.	34
4.8	Análise Estatística	34
5.	RESULTADOS	
5.1	Curvas de crescimento de <i>Bacillus</i> sp. P45.....	35
5.2	Determinação da atividade antimicrobiana.....	36
5.3	Determinação da concentração de proteínas solúveis	37
5.4	Determinação da concentração de aminoácidos livres.	38
5.5	Índice de emulsificação.....	39
5.6	Identificação dos compostos por espectrometria de massas	41
5.7	Montagem e anotação do genoma da bactéria <i>Bacillus</i> sp. P45	42
5.7.1	Clusters de metabólitos secundários.....	46
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÕES	58
8.	PERSPECTIVAS	59
9.	REFERÊNCIAS	60
10.	APÊNDICE	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagens obtidas para a hibridização DNA-DNA in silico comparando-se a bactéria <i>Bacillus</i> sp. P45 com algumas das linhagens mais próximas a ela	46
Tabela 2: Clusters gênicos de metabólitos secundários identificados na linhagem <i>Bacillus</i> sp. P45.....	47
Tabela 3: Análise estatística da quantificação de proteínas solúveis no cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em BHI	74
Tabela 4: Análise estatística da quantificação de proteínas solúveis no cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMFP	74
Tabela 5: Análise estatística da quantificação de proteínas solúveis no cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMP	74
Tabela 6: Análise estatística da quantificação de aminoácidos livres no cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em BHI	75
Tabela 7: Análise estatística da quantificação de aminoácidos livres no cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMFP	75
Tabela 8: Análise estatística da quantificação de aminoácidos livres no cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMP	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de um peptídeo, mecanismo de ação das endopeptidases, classificação e modo de ação das exopeptidases.	6
Figura 2: Estrutura de α -queratina e β -queratina	11
Figura 3: Quantidade de cabeças de frango abatidas por ano	12
Figura 4: Peso acumulado, em milhões de toneladas, de cabeça de frango ao longo dos anos.....	12
Figura 5: Peso acumulado das penas de frango, em milhões de quilos, durante os anos de 2015 e 2019.....	13
Figura 6: Fluxograma da classificação dos peptídeos antimicrobianos de origem bacteriana.....	17
Figura 7: Estrutura química das iturinas.....	22
Figura 8: Estrutura química das fengicinas.....	23
Figura 9: Estrutura química das surfactinas.....	25
Figura 10: Esquema da purificação parcial das proteínas.....	31
Figura 11: Comparativo entre as curvas de crescimento de <i>Bacillus</i> sp. P45 em caldo infusão cérebro coração (BHI), meio mínimo mineral farinha de pena (MMFP) e meio mínimo mineral pena (MMP)	35
Figura 12: Comparativo da atividade antimicrobiana do sobrenadante, do cultivo nos três diferentes meios de cultura (BHI, MMFP e MMP)	36
Figura 13: Comparativo da quantificação da concentração de proteínas solúveis nos três meios de cultivo diferentes (BHI, MMFP e MMP)	37
Figura 14: Comparativo da quantificação da concentração de aminoácidos livres nos três meios de cultivo diferentes (BHI, MMFP e MMP)	38
Figura 15: Comparativo do índice de emulsão do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em BHI.	39
Figura 16: Comparativo do índice de emulsão do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMFP.....	39
Figura 17: Comparativo do índice de emulsão do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMP.....	40

Figura 18: Fotografia da análise da atividade de emulsão, em triplicata, dos compostos bioativos produzidos a partir do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMFP	40
Figura 19: Espectro por MALDI-TOF-MS dos lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus</i> sp. P45 em MMFP	41
Figura 20: Espectro por MALDI-TOF-MS dos lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus</i> sp. P45 em BHI.....	42
Figura 21: Representação gráfica obtida através do software BRIG com comparação entre as sequências genômicas de 8 linhagens próximas de <i>Bacillus</i> com a bactéria <i>Bacillus</i> sp. P45	44
Figura 22: Árvore filogenética de máxima parcimônia, inferida a partir de 500 réplicas de <i>bootstrap</i> mostrando a possível relação evolutiva da linhagem <i>Bacillus</i> sp. P45 com aquelas pertencentes às espécies próximas, considerando a sequência nucleotídica do gene <i>rpoB</i> . Os números nos nós identificam a sua porcentagem de suporte.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANOVA	Análise de variância
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
CodY	Proteína reguladora
-COOH	Ácido carboxílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MALDI-TOF MS	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
GRAS	Generally recognized as safe, Geralmente reconhecido como seguro
GTP	Trifosfato de guanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
MM	Meio mínimo mineral
MMFP	Meio mínimo mineral farinha de pena
MMP	Meio mínimo mineral pena
BHI	Brain-heart infusion, Infusão de cérebro e coração
SPNRs	Sintetases peptídicas não ribossômicas
UA	Unidades de atividade antimicrobiana
UFC	Unidades formadoras de colônia
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
BSA	Bovine Serum Albumin, Albumina de soro bovino
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Gln	Glicina
Glu	Ácido glutâmico
Ile	Isoleucina
Orn	Ornitina
Pro	Prolina
Ser	Serina

Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Leu	Leucina
Asp	Ácido aspártico
<i>m/z</i>	Razão massa carga
OD	Densidade óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
g	Força g
TFA	Ácido tricloroacético
λ	Comprimento de onda
N	Normal
%	Percentual
®	Marca registrada

1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira se consolida com o passar dos anos. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2020) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2020) evidenciam o Brasil como o terceiro maior produtor de carnes de frango no cenário mundial. O aumento do consumo e a mudança nos hábitos alimentares dos brasileiros estão entre os fatores que promoveram esse crescimento. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal - (ABPA), em 2019 cada cidadão brasileiro consumiu em média 42,84 kg de carne de frango. Consequente à alta produção, há um aumento na geração de resíduos e subprodutos dessa atividade pecuarista, tais como cama de aviário, vísceras, carcaças, bicos, sangue e penas (ZHU et al., 2010). Destacando-se dentre os resíduos oriundos dessa atividade agropecuarista, estima-se que 7 a 10% do peso de uma carcaça de ave seja constituída por penas (BRANDELLI, 2008; DAROIT, 2011).

Essas estruturas epidérmicas são compostas essencialmente por queratinas, que são proteínas fibrosas insolúveis, caracterizadas como recalcitrantes devido à resistência à degradação por proteases comuns (DAROIT; BRANDELLI, 2014). Aliando o alto teor proteico, as propriedades recalcitrantes e a quantidade gerada de penas ao seu manejo sustentável, a gestão desse resíduo configura-se como desafiadora (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015). Técnicas de descarte como a incineração e o descarte ambiental apresentam diversas desvantagens, como por exemplo altos custos, alto consumo energético e geração de compostos tóxicos, sendo consideradas como obsoletas e ecologicamente inadequadas (BHARI et al., 2018). Comumente as penas têm sido empregadas na formulação de rações animais, na forma de farinha de penas, através de um processo de hidrólise sobre pressão, seguido de secagem e moagem (SINHORINI, 2013; MACHADO, 2018). Apesar do emprego na alimentação animal, a farinha de pena apresenta como desvantagem a baixa digestibilidade associada à destruição de aminoácidos essenciais (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

Uma alternativa de gerenciamento mais barata e ecologicamente segura para esses resíduos tem sido a bioconversão microbiana. Tal processo utiliza micro-organismos e sua capacidade metabólica com o objetivo de transformar compostos residuais em produtos de valor agregado (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015). Alguns estudos observaram que a bioconversão microbiana de penas e

farinha de penas originam proteases e hidrolisados proteicos. Estes últimos apresentam potenciais propriedades bioativas e conseqüentemente diversas aplicabilidades, tais como na indústria cosmética, terapêutica, fertilizantes e como aditivos mais digeríveis em rações animais (FAKHFAKH et al., 2013; BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015; MOKREJS et al., 2017; CALLEGARO, 2018; NURDIAWATI et al., 2018).

Diversos membros do gênero *Bacillus* spp. destacam-se por serem relevantes produtores de queratinases e, além disso, esse grupo bacteriano tem sido objeto de interesse devido à sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos (PARRADO et al., 2014; GECECKAS et al., 2018). Esses últimos são substâncias produzidas por microrganismos ou por síntese química que inibem o crescimento de outros microrganismos, sendo associados aos sistemas de defesa e resposta ou estresse (CORNFORTH; FOSTER, 2013; MULLIS et al., 2019). Dentre esses compostos, podemos destacar os lipopeptídeos, que podem apresentar diversas atividades biológicas tais como ação antibacteriana, antifúngica e antiviral (COCHRANE; VEDERAS, 2016; ZHAO et al., 2017).

Isolado a partir do trato intestinal de *Piaractus mesopotamicus*, peixe encontrado na bacia amazônica, *Bacillus* sp. P45 é capaz de utilizar materiais queratinosos, tais como penas e farinha de penas, como fonte de carbono, nitrogênio e energia (MOTTA; CLADERA-OLIVERA; BRANDELLI, 2004; DAROIT, 2011). Durante cultivos nestes substratos, o micro-organismo sintetiza peptídeos antimicrobianos e enzimas queratinolíticas. Essas características sugerem a aplicação de *Bacillus* sp. P45 e produtos do seu metabolismo em processos industriais, na bioconversão microbiana. Apesar dos crescentes estudos acerca da utilização de subprodutos da indústria avícola como fonte de hidrolisados proteicos, seu potencial como substrato para produção de peptídeos antimicrobianos necessita ser mais elucidado. Diante disso, o presente estudo objetivou caracterizar e analisar a produção de peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana, obtidos a partir da estirpe *Bacillus* sp. P45, quando cultivado em substratos queratinosos, como penas e farinha de penas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção e o potencial antimicrobiano de peptídeos bioativos produzidos pelo *Bacillus* sp. P45 em substratos de penas e farinha de pena.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Analisar a curva de crescimento, mudanças no conteúdo de proteínas e aminoácidos, durante a incubação de *Bacillus* P45 empregando como substrato pena e farinha de pena;
- 2.2.2 Avaliar a produção de peptídeos antimicrobianos frente ao microrganismo indicador, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, a partir da hidrólise de pena e farinha de pena por *Bacillus* sp. P45 cultivado em farinha de pena e pena;
- 2.2.3 Purificar parcialmente e caracterizar os peptídeos produzidos por *Bacillus* sp. P45 a partir do cultivo em farinha de pena;
- 2.2.4 Validar as informações obtidas a partir da análise e comparação do genoma de *Bacillus* sp. P45.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, caracterizam-se como um grupo de enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e peptídeos (Figura 1-a). Devido às consequências dessa hidrólise, estão associadas a diversos processos fisiológicos, como por exemplo na modificação e regulação da atividade proteica, na capacidade sintética, nos processos inflamatórios, no ciclo celular. (RAO et al., 1998; VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS & VINCENT, 2014; MACHADO et al., 2016; GURUMALLESH et al., 2019).

Além de diferirem quanto à fonte de origem, podendo serem obtidas a partir de plantas, animais ou microrganismos, as proteases também podem se distinguir quanto a outras propriedades singulares, tais como estrutura, tamanho molecular, características elétricas, especificidade e atividade catalítica (RAO et al., 1998; SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016; SINGH et al., 2016; SHARMA et al., 2017).

Enquanto que a produção de proteases originárias de plantas é dependente de condições ambientais adequadas, de espaço cultivável e de tempo, o uso de animais para a produção de proteases está relacionada ao abate animal e a legislação de abate vigente. Por sua vez, as proteases microbianas destacam-se das demais, em função da rápida produção, não havendo necessidade de amplo espaço de cultivo, podendo ser produzido em abundância, com fácil regulação e alta estabilidade (RAO et al., 1998; GURUMALLESH et al., 2019).

Diante do exposto, as enzimas proteolíticas têm sido objeto de estudo para aplicação nas mais diversas atividades comerciais, como por exemplo, na indústria de alimentos, farmacêutica, química e do couro (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS & VINCENT, 2014; CONTESINI; MELO; SATO, 2018; GURUMALLESH et al., 2019).

3.1.1 Classificação e mecanismos de ação

Trata-se de um desafio classificar as proteases, uma vez que essas enzimas apresentam diversas estruturas, características e modos de ação entre si. Nesse sentido, uma das formas de categorizar essas enzimas hidrolíticas variam

de acordo com os seguintes critérios: (i) o tipo e o local de reação catalisada pela protease; (ii) grupo funcional presente no sítio catalítico (em serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases, treonino-proteases e melatoproteases); (iii) relações evolutivas quanto a estrutura (RAO et al., 1998; GURUMALLESH et al., 2019).

Outra maneira possível de catalogar as peptidases é segundo o proposto pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB, onde as enzimas podem ser classificadas em seis grupos (as oxido-redutases, as transferases, as hidrolases, as liases, as isomerases e as ligases), de acordo com o tipo de reação que a enzima catalisa, a natureza e as propriedades químicas do sítio catalítico, além dos mecanismos catalíticos e estruturas proteicas. Dentro da classe das hidrolases, mais especificamente no subgrupo 4 encontram-se as proteases (CORNISH-BOWDEN, 2014; SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2014).

Nesse sentido, as proteases podem ser subdivididas em dois grupos: as endopeptidases e as exopeptidases, segundo o local onde ocorre a clivagem da ligação peptídica. Composto o grupo das exopeptidases estão as enzimas que agem nas ligações peptídicas de peptídeos/proteínas, nas regiões amino ou carboxi terminais (N- ou C-terminal) (FIGURA 1-c). As exopeptidases que removem um, dois ou três aminoácidos da porção N-terminal, podem ser denominadas de amino-peptidases, dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases, respectivamente (RAO et al., 1998; SILVERTHORN, 2010; GURUMALLESH et al., 2019).

Por sua vez, as endopeptidases clivam as ligações internamente na cadeia polipeptídica, entre o agrupamento amino e a porção carboxílica (Figura 1-b). Segundo o banco de dados online de peptidases e inibidores de peptidases, o MEROPS, essas enzimas podem ser subdivididas em sete subclasses, de acordo com o mecanismo catalítico e a natureza do grupo reativo: asparagino-endopeptidases, aspartato-endopeptidases, cisteíno-endopeptidases, glutamato-endopeptidases, metalo-endopeptidases, serino-endopeptidases e treonina-endopeptidases. Vale ressaltar que a descoberta de novas peptidases é um processo contínuo, bem como a elucidação completa dos seus mecanismos catalíticos (RAO et al., 1998; FEDATTO, 2004; MÓTYÁN; TÓTH; TÓZSÉR, 2013; GURUMALLESH et al., 2019).

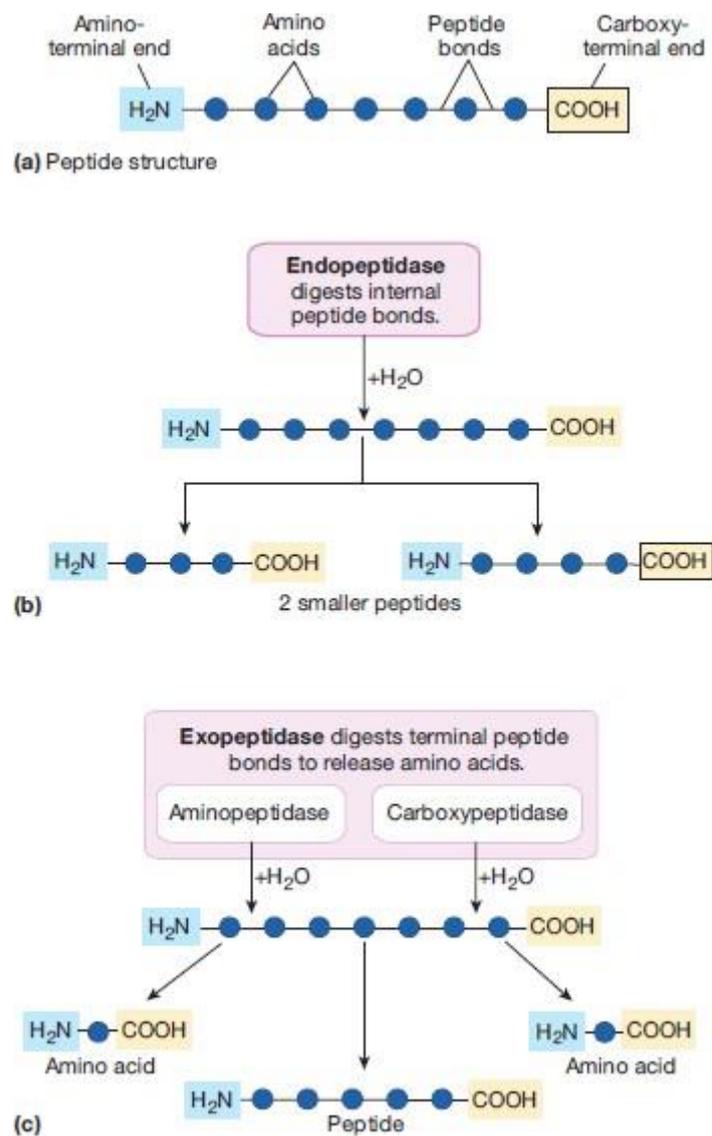


Figura 1: Estrutura de um peptídeo (a); mecanismo de ação das endopeptidasas (b) e classificação e modo de ação das exopeptidasas (c). (Imagem extraída de SILVERTHORN, 2010).

3.1.1.1 Queratinases e micro-organismos queratinolíticos

Apesar da alta estabilidade, insolubilidade e resistência a certas proteases, observa-se que as queratinas não se acumulam no ambiente, indicando a presença de decompositores naturais, tais como os micro-organismos. Induzidos pela presença de queratina no substrato, os micro-organismos queratinolíticos podem produzir queratinases, que são enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas nas queratinas, sendo os produtos utilizados como fonte de carbono,

nitrogênio, e energia para seu crescimento e manutenção (RIFFEL et al., 2003; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010; ELÍADES et al., 2010; BACH et al., 2011).

Conforme o micro-organismo queratinolítico, as características físico-químicas e bioquímicas expressas pelas queratinases variam. Predominantemente os micro-organismos apresentam queratinases extracelulares, no entanto já foram descritas proteases intracelulares (BANERJEE et al., 2014).

Essa premissa também se aplica para outras propriedades, tais como a massa molecular, que varia entre 15 e 250 kDa, apesar da grande maioria das queratinases apresentar massas inferiores a 50 kDa. A maioria dessas proteases são alcalinas ou neutras, apresentando faixas de pH ótimo entre 7,5 e 9,0; contudo percebe-se que existe estabilidade da atividade em uma ampla faixa de pH, variando desde 2,0 até 13,0. As queratinases ainda apresentam tolerância a temperaturas médias a altas (30 a 100 °C), dependendo da origem do isolado (RAO et al., 1998; BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010; GOPINATH et al., 2015; SINGH et al., 2016; DORRA et al., 2018).

O mecanismo queratinolítico microbiano ainda não foi completamente elucidado, entretanto sabe-se que o processo se baseia em uma ação sinérgica/simultânea de queratinases com outras enzimas, denominadas de redutases, para a redução das ligações peptídicas e das pontes dissulfeto, acarretando na queratinólise. Esse mecanismo pode ser dividido em duas fases: a sulfitolise e proteólise (PRAKASH; JAYALAKSHMI & SREERAMULU, 2010; BANERJEE et al., 2014; LANGE; HUANG & BUSK, 2016; NAVONE & SPEIGHT, 2018; DE PAIVA et al., 2019). Durante a sulfitolise as ligações dissulfeto sofrem redução, facilitando a ação das demais proteases na degradação da queratina (BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010).

Dentre os micro-organismos produtores de queratinases mais relevantes está o grupo bacteriano Gram-positivo, do gênero *Bacillus* (WERLANG & BRANDELLI, 2005; GIONGO, 2006; PILLAI & ARCHANA, 2008; CORRÊA; DAROIT; BRANDELLI, 2010; NAGAL & JAIN, 2010) .

Algumas espécies representantes de *Bacillus* com perfil queratinolítico são *Bacillus pumilus* (REDDY et al., 2017), *B. tequilensis* (JAOUADI et al., 2018), *B. polyfermenticus* (DONG; CHANG & CHEN, 2017), *B. amyloliquefaciens* (HAMICHE et al., 2019), *B. subtilis* (TIAN et al., 2019), *B. cereus* (AROKIYARAJ et al., 2019), *B. altitudinis* (PAWAR et al., 2018), *B. licheniformis* (ABDEL-FATTAH et al., 2018)

e *B. halodurans* (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS & VINCENT, 2014).

Outros gêneros bacterianos Gram-positivo, com perfil queratinolítico têm sido isolados (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010; VERMA et al., 2017), como por exemplo *Streptomyces* sp. (ALY & TORK, 2018), *Clostridium* sp. (IONATA et al., 2006), *Kocuria rosea* (BERNAL; DIAZ & COELLO, 2006), *Arthrobacter* sp. (BARMAN et al., 2017), *Actinomycetes* sp. (MUKHTAR et al., 2017) e *Microbacterium* sp. (LABA et al., 2015).

Embora o grupo das bactérias Gram-positivas seja mais expressivo, estudos com bactérias Gram-negativas têm aumentado. Isolados queratinolíticos têm sido registrados nos gêneros *Chryseobacterium* sp. (CHAUDHARI; CHAUDHARI & CHINCHOLKAR, 2013; KSHETRI et al., 2019), *Fervidobacterium* sp. (ROMRUEN; GONZALEZ & KANOKSILAPATHAM, 2016; KANG et al., 2020), *Vibrio* sp. (GRAZZIOTIN et al., 2007), *Serratia* sp. (FUKE et al., 2018; NARAYANAPP; NARAYANAPP & MARISWAMY, 2019), *Stenotrophomonas* sp. (JANG et al., 2017; SHAH & VAIDYA, 2017), *Lysobacter* sp. (PEREIRA et al., 2017) e *Pseudomonas* sp. (MOHAMAD; PHANG & ABD-AZIZ, 2017).

Além de organismos procariontes, alguns gêneros de fungos têm produzido queratinases, tais como *Aspergillus* sp. (EL-GHONEMY & ALI, 2017; PRECZESKI et al., 2020), *Fusarium* sp. (CĂLIN et al., 2017; PRECZESKI et al., 2020), *Onygena* sp. (HUANG et al., 2015; LANGE; HUANG & BUSK, 2016), *Doratomyces* sp. (GRADISAR et al., 2005), *Myrothecium* sp. (DA GIOPPO et al., 2009), *Trichoderma* sp. (BAGEWADI; MULLA & NINNEKAR, 2018) e *Trichophyton* sp. (AL-HASSANI; ABDUL-RAZZAK; ALI, 2019).

3.1.1.1.1 Aplicações das queratinases

Devido à sua ação hidrolítica e suas propriedades específicas, as enzimas proteolíticas destacam-se tanto nos processos fisiológicos como constituintes de grupos relevantes de enzimas comerciais (RAO et al., 1998; SARMIENTO; PERALTA & BLAMEY, 2015; THAKUR et al., 2018).

Como proposta alternativa ao processamento de materiais queratinosos, o uso de queratinases e micro-organismos queratinolíticos torna-se uma possibilidade de manejo, agregando valor, minimizando o custo e a poluição ambiental provocada por esses resíduos (BRANDELLI; DAROIT & RIFFEL, 2010;

DAROIT, 2011). As queratinases microbianas assemelham-se muito em suas aplicações, esses biocatalisadores atuam nas mais diversas áreas industriais, tais como alimentos, agroindústria, química, curtumes, farmacêutica, biomédica e bioenergia (BRANDELLI; DAROIT & RIFFEL, 2010).

Apesar da grande representatividade na indústria de detergentes, devido à eficácia na degradação de compostos proteicos, alta biodegradabilidade e relevante estabilidade térmica e de pH, as queratinases são também empregadas na área médica e farmacêutica, na formulação de novos cosméticos e fármacos para o tratamento de dermatoses simples como acne e cicatrizes, até na reutilização de folhas de raio-X e manejo de utensílios médicos contendo príons (BRANDELLI; DAROIT & RIFFEL, 2010; SRILAKSHMI et al., 2015; SINGH et al., 2016; VERMA et al., 2017). Associados a essas aplicações estão enzimas sintetizadas a partir de *Beauveria bassiana*, *B. licheniformis*, *Streptomyces* spp. (VILLA et al., 2013; BORGI & GARGOURI, 2014).

Embora as matrizes alimentícias sejam muito complexas quanto à composição, e isso caracterize uma dificuldade para o emprego de queratinases, essas proteases podem ser utilizadas na indústria alimentícia modificando as proteínas presentes no alimento e conseqüentemente alterando propriedades como solubilidade, emulsificação, digestibilidade, coagulação e formação de espumas e géis (LACOU et al., 2015; CONTESINI; MELO & SATO, 2018).

Estudos indicam que proteases produzidas a partir de *Bacillus* sp. podem ser utilizadas como coagulantes alternativos na indústria de leite e derivados lácteos (LEMES et al., 2016). Percebeu-se que quando aplicadas individualmente ou concomitantemente com outras proteases, as queratinases alteram o sabor, a textura e a maturação de diversos alimentos, como por exemplo queijos e cárneos (MATHIAS et al., 2017; SAINI; SAINI & DAHIYA, 2017; CONTESINI; MELO & SATO, 2018; TRABELSI et al., 2019).

Com a finalidade de associar um produto final de melhor qualidade ao menor impacto ambiental possível, as queratinases empregadas durante o processo de fabricação do couro caracterizam-se como uma alternativa ao uso de compostos químicos tóxicos. Queratinases produzidas a partir de *Streptomyces*, atuam em diversas etapas do processo, tais como o remolho, depilação e purga, hidrolisando a queratina e elastina, proteínas fibrosas e recalcitrantes, componentes principais do couro (CHOUDHARY; JANA & JHA, 2004; SOUZA,

2010; ARUNA; SHAH & BIRMOLE, 2014; LI et al., 2018).

Outra área gradualmente elucidada é a biorremediação. Alguns estudos relacionam enzimas proteolíticas a tratamentos de águas residuais ou conversão de subprodutos industriais (SALGADO et al., 2016; RIZK; ELDOURGHAMY & ELGAMAL, 2017; JARDINE et al., 2018). As aplicações podem ser realizadas na forma purificada da enzima ou até mesmo da exposição direta de micro-organismos queratinolíticos ao substrato (BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010). As queratinases atuam como biorremediadores degradando os efluentes da indústria avícola, tais como penas, unhas e bicos (BRANDELLI, DAROIT & RIFFEL, 2010; ALIPOUR et al., 2016).

3.2 Queratinas

Abundantemente encontradas nos vertebrados, compondo desde estruturas celulares até penas, bicos, cabelos, unhas e cascos, as queratinas são proteínas fibrosas, compostas por 18 diferentes aminoácidos, formando estruturas proteicas com massa molecular variando entre 10 e 68 kDa (BRANDELLI; DAROIT & RIFFEL, 2010; FERRARO; ANTON & SANTÉ-LHOUELIER, 2016; WANG et al., 2016).

Essas proteínas são altamente estáveis, insolúveis em água e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas comuns, tais como tripsina e papaína (BRANDELLI, 2008). Essa recalcitrância das queratinas é resultante do alto grau de empacotamento dessas proteínas, em α -hélice ou β -pregueada, favorecido pela abundância de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, em cadeias polipeptídicas altamente enoveladas. Por sua vez, a insolubilidade é uma característica apresentada em virtude do alto conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, presente no interior e superfície proteicas (FERRARO; ANTON & SANTÉ-LHOUELIER, 2016; WANG et al., 2016).

Quanto à estrutura, as queratinas podem ser classificadas em α -queratina (α -hélice) e β -queratina (β -folhas) (Figura 2), apresentando variações tanto nas estruturas secundárias, quanto na quantidade e composição de resíduos de aminoácidos, tais como cisteína e ligações dissulfeto (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

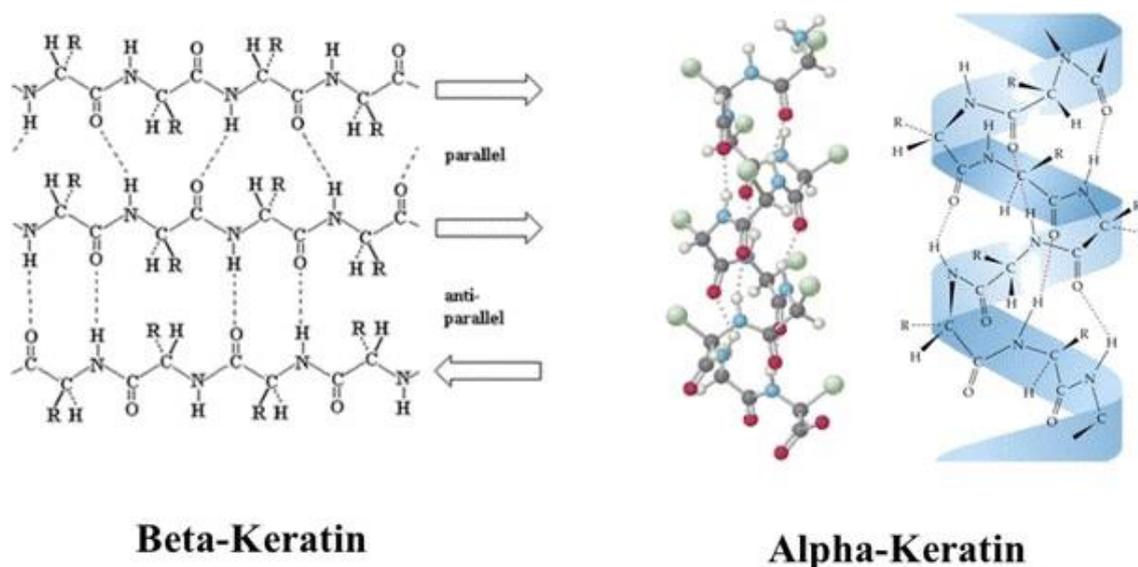


Figura 2: Estrutura de α -queratina e β -queratina, no lado direito e esquerdo, respectivamente. (Imagem extraída de GIUFFRIDA; MAZZOLI; PESSIONE, 2018).

3.2.1 Resíduos Avícolas

Nos últimos anos a indústria avícola brasileira tem se destacado no mercado internacional. De acordo com o IBGE (2020), o Brasil mantém em média uma produção anual de aproximadamente 5,7 bilhões de cabeças de frangos abatidos desde 2015 até 2019. Em 2019, foram 5,81 bilhões de cabeças abatidas, totalizando 13,57 milhões de toneladas de carcaças, ocupando assim o 3º lugar no ranking mundial de produção de carne de frango (IBGE, 2020; EMBRAPA, 2020) (Figuras 3 e 4).

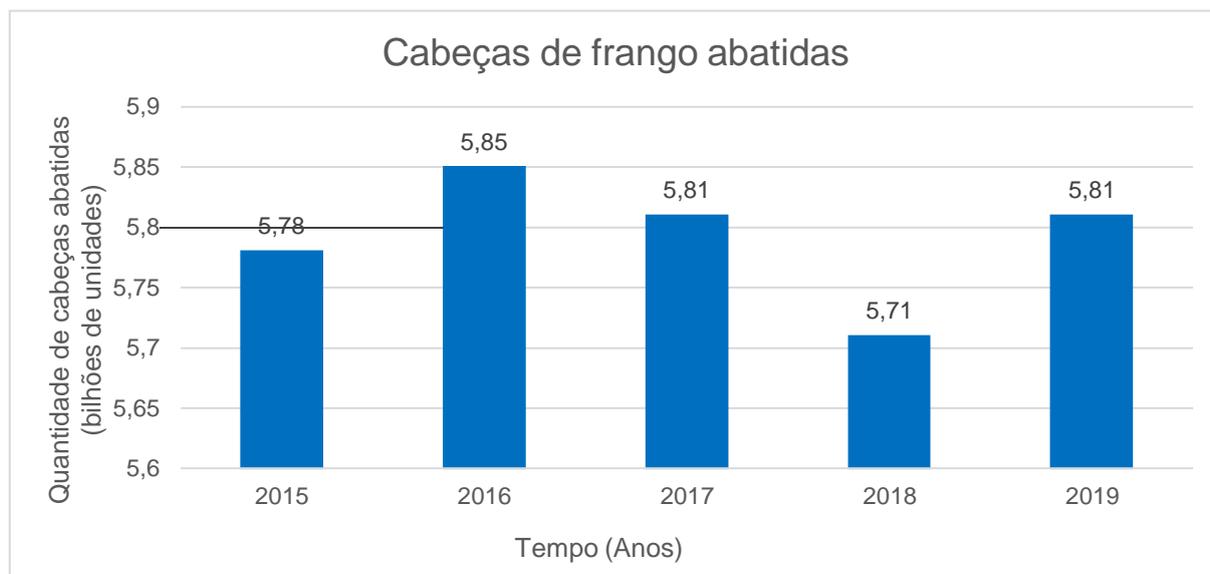


Figura 3: Quantidade de cabeças de frango abatidas por ano, desde de 2015 até 2019. (Imagem produzida pela autora, baseado nos dados do IBGE, 2020).

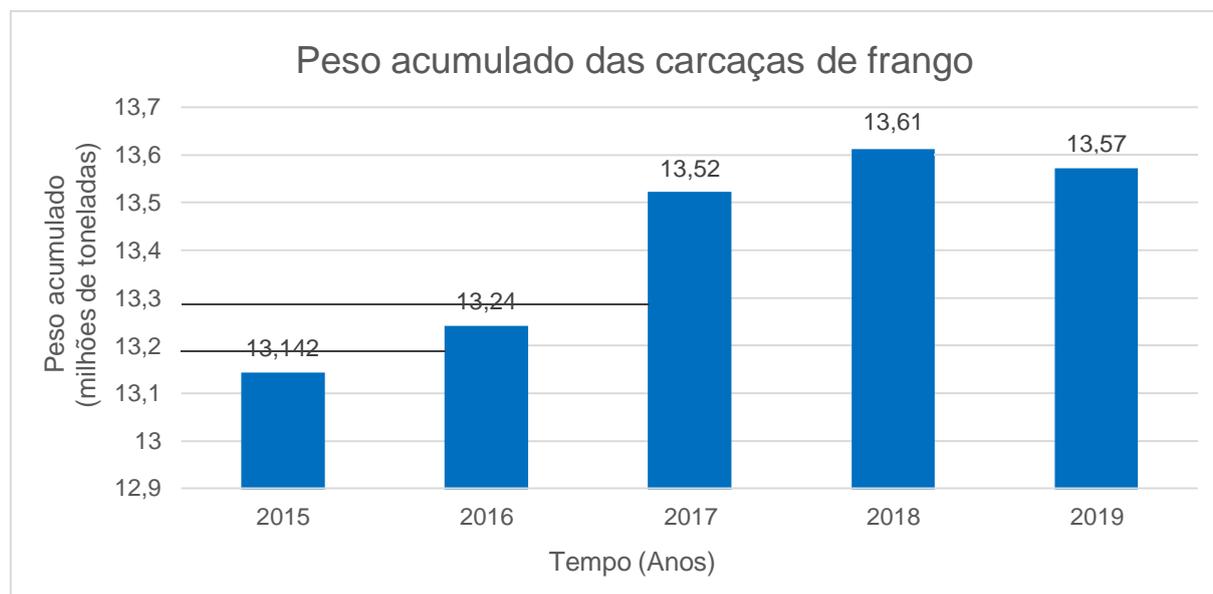


Figura 4: Peso acumulado, em milhões de toneladas, das carcaças de frango ao longo dos anos. (Imagem produzida pela autora, baseado nos dados do IBGE, 2020).

Como consequência da expansão avícola brasileira, há a geração de grande quantidade de resíduos e subprodutos, tais como cama de aviário, vísceras, carcaças, bicos, sangue e penas. Estima-se que 7 a 10% do peso de uma carcaça de frango seja representado pelas penas. Diante disso, em 2019 foram produzidos

entre 949,9 a 1.357 milhões de quilos de pena (ONIFADE et al., 1998; BRANDELLI, 2008; BRANDELLI; SALA & KALIL, 2015) (Figura 5).

As penas são, por definição, apêndices epidérmicos das aves, que quando frescas são constituídas por cerca de 1% de gordura, 9% de água e 90% de queratina. Essas proteínas recalcitrantes são constituídas principalmente por α -queratinas, com teores que variam de 41 a 67% do volume total, enquanto que as β -queratinas constituem cerca de 33 a 38% (BARONE; SCHMIDT & LIEBNER, 2005; FRASER & PARRY, 2008; SUNADA et al., 2014; LANGE; HUANG & BUSK, 2016; MACHADO, 2018).

A recalcitrância das penas, aliada à sua alta produção e o manejo indevido, constroem um cenário ambiental preocupante. O acúmulo, armazenamento e descarte inapropriado desses resíduos acarreta diversos impactos ambientais negativos. Comumente destinado a aterros sanitários, a decomposição anaeróbia desse material queratinoso, associada ao seu grande volume provocam a geração de compostos tóxicos, como o sulfeto de hidrogênio (H_2S) e amônia (NH_3) (DAROIT, 2011). Outro destino das penas é a incineração, que, embora seja um método eficiente, caracteriza-se por ser um processo lento, oneroso e com elevadas taxas de emissão de CO_2 (BLAKE & DONALD, 1992; SANDER; WARBINGTON & MYERS, 2002; MARCONDES et al., 2008; MATSUI et al., 2009; GWYTHYER et al., 2011).

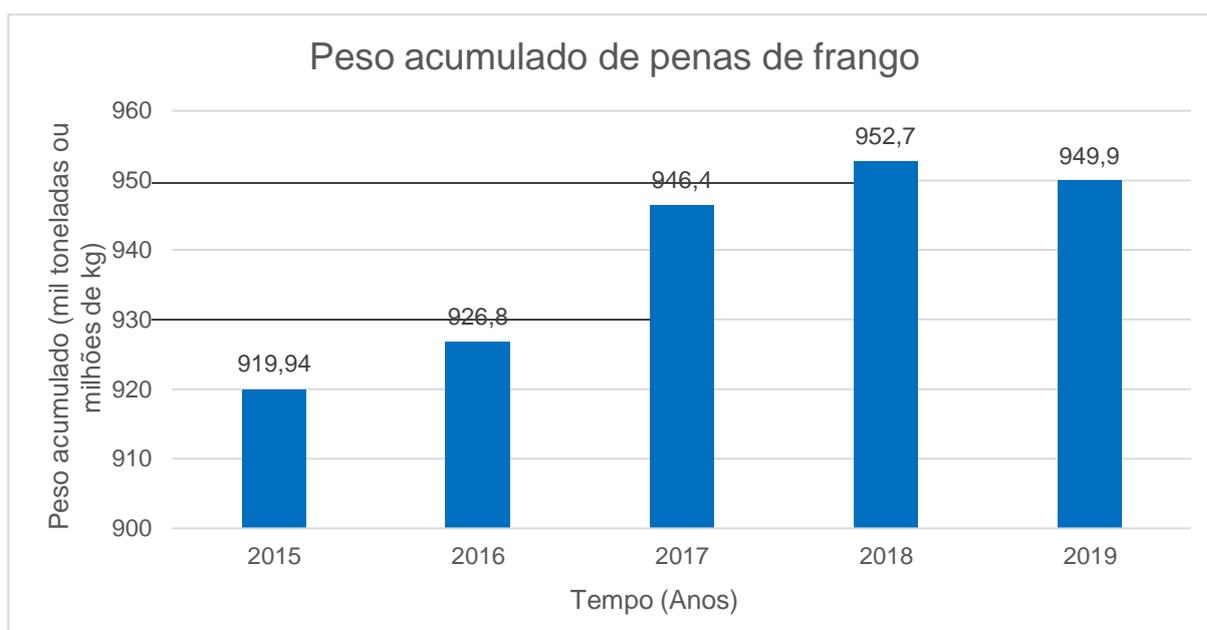


Figura 5: Peso acumulado das penas de frango, em milhões de quilos, durante os anos de 2015 a 2019. (Imagem produzida pela autora, baseado nos dados do IBGE, 2020).

Outro método empregado no manejo desses resíduos são tratamentos hidrotérmicos, onde as penas são cozidas sob alta pressão e moídas, originando a farinha de penas, subproduto utilizado como suplemento de rações animais. Como desvantagens, o processo pode apresentar uma alta demanda de energia elétrica e mecânica e a destruição de aminoácidos essenciais (metionina, lisina e triptofano) dando origem a um subproduto com baixa digestibilidade, qualidade nutricional e valor agregado (ONIFADE et al., 1998; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011; MACHADO, 2018).

Considerando as desvantagens apresentadas, tais como impactos ambientais e financeiros, a baixa rentabilidade e qualidade dos subprodutos produzidos, a indústria avícola enfrenta o desafio de desenvolver novas ferramentas de manejo destes resíduos queratinosos, que combinem o consumo máximo possível do resíduo, atendendo as regulamentações ambientais vigentes, e a questão financeira do processo, maximizando os lucros e minimizando os custos (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015; RIEGER et al., 2017).

Sabe-se que penas e demais resíduos queratinosos são decompostos naturalmente no ambiente, através do processo biocatalítico realizado por enzimas produzidas por agentes biológicos (ONIFADE et al., 1998; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010). O emprego de micro-organismos queratinolíticos na síntese das queratinases microbianas tem sido objeto de interesse devido a resultados como por exemplo, o aumento da digestibilidade, maior aproveitamento do resíduos, baixo custo e menor impacto ambiental (BRANDELLI; SALA & KALIL, 2015; PACHECO et al., 2016; RIEGER et al., 2017; CALLEGARO; WELTER & DAROIT, 2018; CALLEGARO; BRANDELLI & DAROIT, 2019).

3.3 Gênero *Bacillus*

A diversidade do gênero *Bacillus* é enorme, embora existam algumas características mais comuns, eventualmente as bactérias pertencentes a esse gênero não as apresentam. Entretanto frequentemente apresentam morfotipo de bastonetes, são Gram-positivas, quimio-heterotróficas, mesófilicas, com flagelos peritríquios, não capsulares, aeróbias ou anaeróbias facultativas e geralmente catalase positivas (LOGAN & DE VOS, 2015).

Apesar do seu habitat natural ser o solo, podem ser ubiquamente encontradas, devido sua capacidade esporogênica e por utilizar como fonte de energia e carbono diferentes tipos de substratos. Usualmente constituem colônias redondas brancas, contudo podem apresentar diferentes características fenotípicas, uma vez que se trata de um gênero amplo, compreendendo mais de 200 espécies (SANSINENA & ORTIZ, 2011; LIPPOLIS et al., 2013; PARRADO et al., 2014; LOGAN & DE VOS, 2015).

Bacillus apresentam altas taxas de crescimento e conseqüentemente ciclos fermentativos menores, quando comparados com outros gêneros. Secretam proteínas extracelulares, algumas linhagens possuem status GRAS de segurança alimentar e são importantes produtores de enzimas, como as queratinases, e metabólitos secundários com propriedades bioativas, apresentando mais de 800 tipos diferentes, como por exemplo os peptídeos antimicrobianos (LIPPOLIS et al., 2013; PARRADO et al., 2014; SAXENA, 2015).

Nesse sentido, dentre as espécies do gênero *Bacillus* com perfil queratinolítico e, destacam-se *B. subtilis* (SANGHVI et al., 2016), *B. cereus* (VIJAYARAGHAVAN, LAZARUS & VINCENT, 2014; AROKIYARAJ et al., 2019), *B. halodurans* (PRAKASH; JAYALAKSHMI & SREERAMULU, 2010), *B. pumilus* (REDDY et al., 2017), *B. amyloliquefaciens* (HAMICHE et al., 2019) e *Bacillus* sp. P45 (DAROIT, 2011).

Alguns representantes do gênero produtores de peptídeos antimicrobianos são *B. subtilis* (CHENG et al., 2017), *B. cereus* (BASIT et al., 2018), *B. amyloliquefaciens* (REGMI et al., 2017), *B. halodurans* (DANESH; MAMO & MATTIASSON, 2011), *B. coagulans* (ABDHUL et al., 2015; RIAZI et al., 2009) e *B. licheniformis* (ABDEL-MOHSEIN et al., 2011; SUMI et al., 2015).

3.3.1 Peptídeos antimicrobianos

Define-se como peptídeos antimicrobianos, biomoléculas oriundas da união de resíduos de aminoácidos através de ligações peptídicas, que apesar de serem quimicamente variados, apresentam diversas atividades biológicas associadas tais como, ações antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral (REDDY; YEDERY & ARANHA, 2004; BAHAR; REN, 2013; KANG et al., 2017).

Podendo ser sintetizados por organismos eucariontes e procariontes, os

peptídeos antimicrobianos (AMPs), atuam de formas diferentes. Enquanto que os organismos eucariontes apresentam essas biomoléculas associadas à imunidade inata, nos procariotos, os AMPs estão relacionados ao sistema de defesa, competição entre organismos e obtenção de nutrientes (HEGEDÜS & MARX, 2013; SUMI et al., 2015; EGAN et al., 2016; MAHLAPUU et al., 2016; MERGAERT, 2018;).

Tais moléculas possuem características estruturais variáveis, contudo geralmente são catiônicas, de natureza anfifílica, com tamanhos variando entre 5 a 100 resíduos de aminoácidos, em estruturas de α -hélices, β -folhas ou ambas, ocorrendo em arranjos lineares ou cíclicos (JENSSEN, HAMILL & HANCOCK, 2006; MOJSOSKA, ZUCKERMANN & JENSSEN, 2015; HANCOCK, HANEY & GILL, 2016; BISWARO et al., 2018).

Segundo Hegedus & Marx (2013), existem desafios em classificar os peptídeos antimicrobianos devido à grande variedade de estruturas, funções, efeitos biológicos e demais características. Os AMPs bacterianos podem ser divididos em dois grupos, lineares e cíclicos. Dentro dessa categorização, as classes são subdivididas quanto ao modo de síntese: os ribossomais e os não-ribossomais (Figura 6) (HANCOCK & CHAPPLE, 1999; MAHLAPUU et al., 2016; ABDEL MONAIM et al., 2019).

Os AMPs ribossômicos são sintetizados através da tradução do mRNA associado a um ribossomo, formando cadeias peptídicas, que são liberadas no citosol, onde essa molécula pode sofrer modificações pós-traducionais, definindo sua forma e função. Essa via é conhecida como via ribossomal e os peptídeos por ela produzidos, com perfil antimicrobiano, são conhecidos como bacteriocinas. No entanto, os AMPs não-ribossomais não necessitam de moléculas de mRNA para sua síntese. Nessa via sintética utilizam-se metabólitos secundários chamados de sintetases peptídicas não ribossômicas (SPNR). Essas enzimas possuem a capacidade de introduzir aminoácidos na cadeia peptídica, modificando-se, sem a necessidade de modificações pós-traducionais (ABDEL MONAIM et al., 2019; VASILCHENKO & VALYSHEV, 2019).

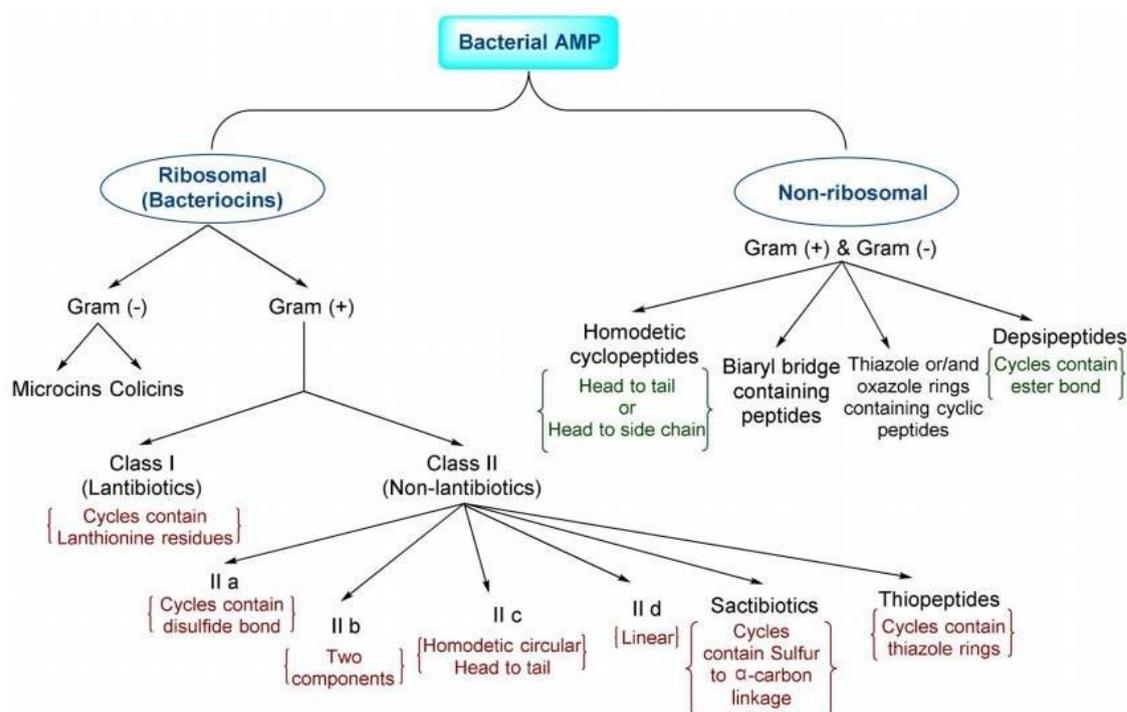


Figura 6: Fluxograma da classificação dos peptídeos antimicrobianos de origem bacteriana (Imagem extraída de ABDEL MONAIM et al., 2019).

De forma geral, a habilidade dos AMPs em destruir uma célula alvo está associada com sua capacidade de interação eletrostática entre membranas. Existem dois mecanismos de ação empregados pelos AMPs, a permeabilização direta da membrana citoplasmática da célula alvo e a ação em alvos intracelulares. A permeabilização consiste, inicialmente, nas interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os peptídeos e a membrana celular do organismo alvo, seguidos pela formação de poros e canais iônicos, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequente lise celular (LEE, HALL & AGUILAR, 2016; BECHINGER & GORR, 2017; KANG et al., 2017; MATSUZAKI, 2019).

Interferência em atividades enzimáticas celulares, clivagem de moléculas de rRNA 16S, degradação de DNA e lise celular através da inibição da síntese de peptidoglicano, são exemplos da ação dos AMPs em alvos intracelulares (RILEY, 1998; HANCOCK & CHAPPLE, 1999; KANG et al., 2017).

Em função de suas características e propriedades, os AMPs apresentam amplo espectro de ação e diversas aplicabilidades. Abrangendo desde bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, até fungos, protozoários e vírus, essas

moléculas podem ser empregadas na indústria de alimentos, biotecnologia, médica e terapêutica. Os AMPs configuram-se como uma alternativa ao uso de antibióticos e aditivos químicos, constituindo tratamentos mais baratos e com menos reações adversas (REDDY; YEDERY & ARANHA, 2004; MAHLAPUU et al., 2016; MATHUR et al., 2017; DIVYASHREE et al., 2019).

Compondo o grupo dos AMPs sintetizados não ribossomalmente, destacam-se os lipopeptídeos, que além da atividade antimicrobiana, possuem capacidade de reduzir a tensão superficial entre compostos, podendo ser aplicados na biorremediação e bioprocessos, indústria farmacêutica e alimentícia (DIVYASHREE et al., 2019; MATSUZAKI, 2019).

3.3.2 *Bacillus* sp. P45

Isolada do trato intestinal do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*), encontrado na bacia amazônica (região próxima a Manaus; 3°06'S, 60°01'W), as bactérias de *Bacillus* sp. P45, apresentam 2,8 mm de comprimento e 0,8 mm de largura, são esporuladoras, catalases positivas, lecitinase e oxidase negativas (CLAUSS & BERKELEY, 1986; SIRTORI, 2006).

Bacillus sp. P45 é capaz de produzir peptídeos extracelulares que apresentam atividade antimicrobiana a uma ampla faixa de micro-organismos, compreendendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e até algumas leveduras, como por exemplo *Listeria monocytogenes*, *Erwinia carotovora*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Kluyveromyces marxianus* (SIRTORI, 2006; VERAS et al., 2016).

A atividade antimicrobiana desse peptídeo é relativamente estável, mantendo-se por 30 min entre 10 a 100 °C, e não sendo sensível a variações de pH. Esse peptídeo possui peso molecular que varia de 1450 a 1518,544 Da, sendo relativamente termoestável. O peptídeo purificado exibe concentração inibitória mínima contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, de 50 UA/mL (SIRTORI, 2006).

Capaz de degradar substratos compostos por proteínas recalcitrantes, como as queratinas, *Bacillus* sp. P45 produz uma protease de massa molecular de 26 kDa, que apresenta temperatura e pH ótimos em torno de 55 °C e pH 7,5-8,0, respectivamente (DAROIT; CORRÊA & BRANDELLI, 2009; DAROIT, 2011; LEMES, 2015). A termoestabilidade dessa protease pode sofrer alteração em

função da presença ou ausência de íons metálicos no meio reacional. Por exemplo, na presença de cálcio e magnésio, a termoestabilidade aumenta, elevando as temperaturas ótimas até 60 °C. Tais mudanças ocorrem devido a presença de sítios de ligação de cálcio, que contribuem para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa em temperaturas maiores, além da redução das taxas de autólises, (DAROIT, 2011)

Estudos evidenciam que *Bacillus* sp. P45 é capaz de utilizar, como única fonte de carbono, nitrogênio e enxofre moléculas de queratina, a partir da ação de suas queratinases (DAROIT, 2011). A queratinase P45 possui potenciais aplicações biotecnológicas, tais como o emprego na produção de coagulantes, que são fundamentais na indústria queijeira, e no bioprocessamento de materiais residuais oriundos da indústria avícola, tais como penas e farinhas de penas (BRANDELLI, 2008; BRANDELLI; DAROIT & RIFFEL, 2010; DAROIT, 2011; LEMES, 2015; LEMES et al., 2016).

3.4 Biossurfactantes e lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp.

Além de bacteriocinas e peptídeos antimicrobianos, *Bacillus* spp. podem sintetizar biossurfactantes, que são metabólitos secundários capazes de reduzir a tensão superficial de um líquido e a tensão interfacial entre líquidos ou entre líquidos e sólidos. Os biossurfactantes podem ser produzidos por diversos microorganismos, apresentam atividades biológicas e promovem a estabilidade de emulsões e formação de espumas (SAHARAN; SAHU & SHARMA, 2011; PEREZ, 2014; MNIF & GHRIBI, 2015; MATSUZAKI, 2019). Não sintetizados ribossomalmente, a produção dessas moléculas utiliza complexos multi-enzimáticos, os SPNRs. Compostos por porções hidrofílicas e hidrofóbicas, os biossurfactantes são anfipáticos, ocorrendo em arranjos lineares ou cíclicos, apresentando domínios catalíticos e variando em composição de aminoácidos e tamanho da cadeia de ácidos graxos (MITCHELL et al., 2012; ABDEL MONAIM et al., 2019).

Devido à sua alta complexidade química e estrutural, os biossurfactantes podem ser classificados em diversas formas, quanto o seu peso molecular, estrutura química, sequência, origem ou mecanismos de ação. Baseado na

estrutura e origem de síntese, esses compostos são divididos em: a) glicolipídeos, b) lipoproteínas ou lipopeptídeos, c) fosfolipídeos, ácidos graxos ou lipídeos naturais, d) biossurfactantes poliméricos, e e) biossurfactantes particulados (SHOEB et al., 2013; SOBRINHO et al., 2013; SHAH et al., 2016; HENKEL; HAUSMANN, 2019).

Indiferente da classificação empregada, os lipopeptídeos ou lipoproteínas são um dos grupos mais conhecidos e estudados dos biossurfactantes. Estruturalmente são metabólitos secundários de baixa massa molecular, constituídos por uma cadeia cíclica hidrofílica de 7 a 10 aminoácidos, ligada por uma ligação ester ou amida a um ácido graxo hidrofóbico. Essas moléculas são ciclizadas na porção C-terminal, através de uma ligação ester ou amida, onde a cauda lipídica é acrescentada através da acilação, realizada pelos SPNRs, do aminoácido na região N-terminal (COCHRANE & VEDERAS, 2016; ZHAO & KUIPERS, 2016; ZHAO et al., 2017, 2018).

O interesse nessas moléculas surfactantes vem aumentando devido às propriedades biológicas apresentadas. Além das atividades antimicrobianas, características surfactantes e citotóxicas, essas moléculas são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade, permitindo uma ampla produção e emprego na indústria, como por exemplo na indústria farmacêutica, cosmética e dermatológica, alimentícia, química, petrolífera e na fabricação de detergentes (SAHARAN; SAHU & SHARMA, 2011; SHOEB et al., 2013; SHAH et al., 2016; HENKEL & HAUSMANN, 2019).

Membros do gênero *Bacillus* são reconhecidos como sintetizadores de lipopeptídeos, que segundo sua composição e sequência de aminoácidos podem ser divididos em três categorias: em iturinas, fengicinas e surfactinas (MATSUZAKI, 2019; MNIF & GHRIBI, 2015; ZHAO et al., 2017).

3.4.1 Iturinas

Comumente isolados a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, as iturinas são lipopeptídeos anfifílicos, não catiônicos, apresentando a menor massa molecular das três classes, cerca de 1,1 kDa. São cíclicos por meio de uma ligação amina entre a porção N-terminal de um grupo amino de um ácido graxo e a porção C-terminal de um aminoácido da cadeia

peptídica (MNIF & GHRIBI, 2015; COCHRANE & VEDERAS, 2016).

Caracterizados como heptapeptídeos, possuem parte da cadeia peptídica composta por sete aminoácidos ligada a uma cauda hidrofóbica (ácido graxo β – amino) com cerca de 14 a 17 carbonos. Compondo a sequência de sete aminoácidos tem-se (L)Asn - (D)Tyr - (D)Asn - (L)Gln - (L)Pro - (D)Asn - (L)Ser (WANG et al., 2015; COCHRANE & VEDERAS, 2016; ZHAO et al., 2018). A estrutura química desse composto sintetizado não ribossomalmente está ilustrado na Figura 7.

Eventualmente, alterações podem ocorrer tanto na sequência do heptapeptídeo, quanto nas cadeias de ácido graxo, gerando a formação de compostos homólogos. Por exemplo, a inversão das posições dos aminoácidos Ser e Asn, das posições 6 e 7 para 7 e 6, que acarretará na geração de micosubtilina (PATEL, AHMED & ESWARI, 2015; ZHAO et al., 2017). Nesse sentido, tem-se a produção de outros compostos variantes, como por exemplo Iturina A, C e D, Bacilomicina D, Bacilomicina F, Bacilomicina L, Bacilopeptina e Micosubtilina (MNIF & GHRIBI, 2015; COCHRANE & VEDERAS, 2016; ZHAO et al., 2017).

O modo de ação das iturinas frente a micro-organismos caracteriza-se pela formação de poros e aumento da permeabilidade celular, que ocorre através da interação dos compostos lipopeptídicos com a membrana citoplasmática da célula alvo. Devido a essa característica, as iturinas exibem ampla atividade biológica frente a fungos e leveduras, além de atividade citotóxicas, hemolítica e antibacteriana (MNIF & GHRIBI, 2015; COCHRANE & VEDERAS, 2016).

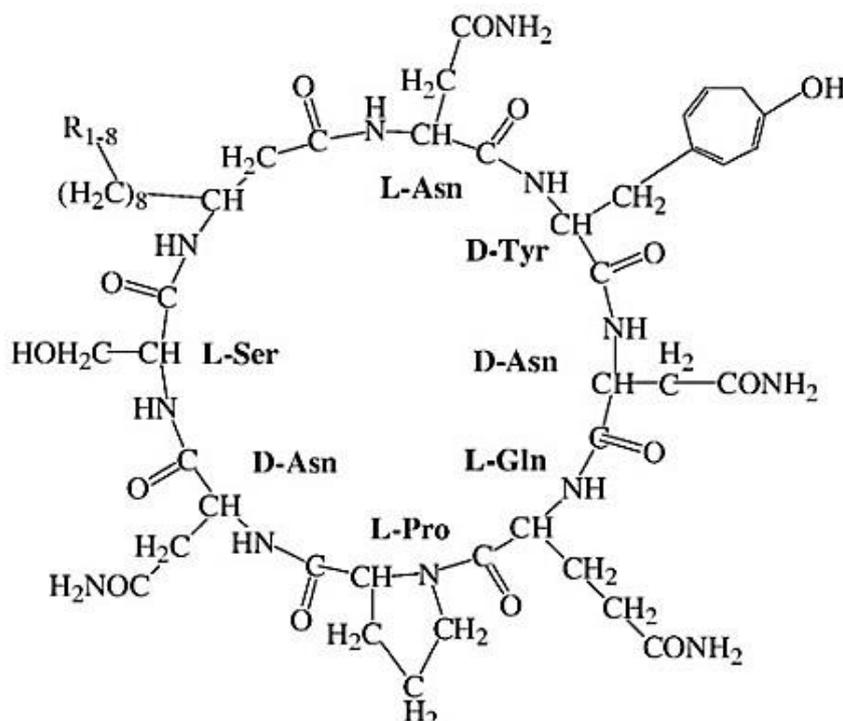


Figura 7: Estrutura química das Iturinas (Imagem extraída de WANG et al., 2015).

3.4.2 Fengicinas

Conhecidos como fengicinas ou plipastatinas, caracterizam-se por ser uma classe lipopeptídeos cíclicos, de cadeia peptídica composta por 10 aminoácidos ((L)Glu - (D)Orn - (L)Tyr - (D)Thr - (L)Glu - (D)Ala - Val - (L)Pro - (L)Gln - (D)Tyr - (L)-Ile) com um anel de lactona, e um ácido graxo β -hidróxi presente na porção final N-terminal da molécula, com tamanhos variando entre 14 e 19 átomos de carbono (WANG et al., 2015; COCHRANE & VEDERAS, 2016).

A estrutura cíclica (Figura 8) se forma a partir da reação entre o grupo $-OH$ da cadeia lateral da Tirosina (Tyr) e o grupo $-COOH$ na região C-terminal da Isoleucina (Ile), nas posições 3 e 10, respectivamente, via uma ligação de lactona. (COCHRANE & VEDERAS, 2016). Existem duas variantes principais da fengicina, devido a mudanças na sequência de aminoácidos, tanto na cadeia do β -hidróxiácido graxo quanto na peptídica, por exemplo, a alteração do aminoácido na posição 6 do anel peptídico origina a Fengicina A e a Fengicina B (MNIF & GHRIBI, 2015). Recentemente uma nova molécula de fengicina foi isolada, a partir de *B*.

amyloliquefaciens, onde na posição 6 foi encontrado ácido aminobutírico ao invés da Alanina ou Valina (CHEN et al., 2010). A presença eventual de aminoácidos como Ornitina e allo-Treonina caracteriza-se como uma particularidade da classe (MNIF & GHRIBI, 2015).

Embora o mecanismo de ação ainda não tenha sido completamente elucidado e compreendido, acredita-se que seja um lipopeptídeo capaz de causar alterações na membrana, promovendo um aumento da permeabilidade (GONZÁLEZ-JARAMILLO et al., 2017), induzindo a apoptose e necrose (ZHAO et al., 2017). Apesar de serem menos hemolíticas e citotóxicas que as iturinas e surfactinas, e serem inativas frente a bactérias e leveduras, as fengicinas exibem alta atividade antifúngica, particularmente contra fungos filamentosos (ZHAO et al., 2017), tornando-se uma alternativa aos defensivos agrícolas utilizados na agricultura para o controle de fitopatógenos (MEENA & KANWAR, 2015).

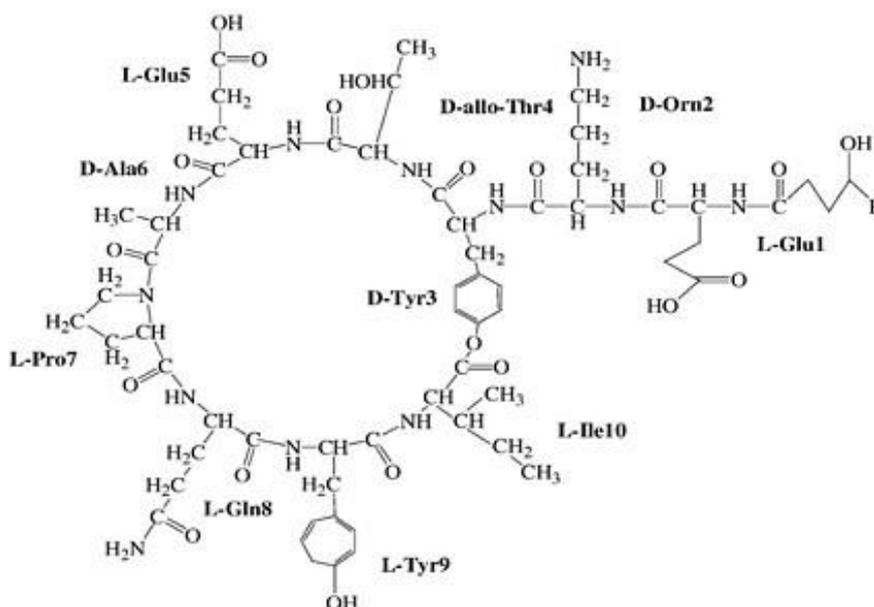


Figura 8: Estrutura química das Fengicinas. (Imagem extraída de WANG et al., 2015).

3.4.3 Surfactinas

Isolada pela primeira vez em 1968 e comumente descrita como a classe mais estudada e numerosa dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp., as surfactinas caracterizam-se como lipoheptapeptídeos cíclicos anfipáticos, com massa molecular de aproximadamente 1050 Da e sintetizados a partir de um complexo multi-enzimático, codificado pelo operon *Sfr*, denominado como surfactina sintetase (DEY et al., 2015; MEENA & KANWAR, 2015).

A sequência de 7 aminoácidos ((L)Glu - (L-)Leu - (D-)Leu - (L-)Val - (L-)Asp - (D)Leu - (L-)Leu)) compõe a cadeia peptídica, que une-se a um ácido graxo β -hidroxilado, com cadeia de 12 a 16 átomos de carbono, através de uma ligação lactona (PEREZ, 2014; WANG et al., 2015; ZHAO et al., 2017, 2018). A estrutura química está representada na Figura 9. Assim como em outras classes lipopeptídicas, alterações na estrutura resultam em novas isoformas, nesse sentido mudanças de aminoácidos na posição envolvida na formação do anel lactâmico com o ácido graxo (β -hidroxi), originam as surfactinas A, B e C. L-leucina, L-valina e a L-isoleucina, são os resíduos de aminoácidos que diferem na estrutura associada a formação anel lactâmico junto ao ácido graxo β -hidróxi, compondo respectivamente a surfactina A, a surfactina B e surfactina C (WANG et al., 2015; ZHAO et al., 2017).

Estudos indicam que esses lipopeptídeos interagem com porções lipídicas da membrana da célula alvo, podendo agir como detergente em altas concentrações, e em baixas concentrações formando poros condutores de íons na membrana celular, levando à permeabilização, ruptura e extravasamento celular. A penetração da membrana pode ser facilitada quando o lipopeptídeo está associado ao cátion Ca^{2+} (DELEU et al., 2013; COCHRANE & VEDERAS, 2016;).

Apesar do seu potencial hemolítico, as surfactinas possuem alta atividade surfactante, sendo capaz de reduzir em até 2,6x N/m a tensão superficial da água (COCHRANE & VEDERAS, 2016; MNIF & GHRIBI, 2015). Sintetizadas a partir de diversas espécies de *Bacillus* sp.: *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*, as surfactinas caracterizam-se como moléculas bioativas, uma vez que exibem diversas funções biológicas, que incluem atividade antibacteriana (FAN et al., 2017; HORNG et al., 2019), atividade antifúngica (JIANG et al., 2016), antiviral (YUAN et al., 2018, 2019), antitumoral e

antimicoplasma (VOLLENBROICH et al., 1997; MEENA; SHARMA & KANWAR, 2020). Sua aplicação é sugerida como agentes de biocontrole, na agricultura, nas indústrias farmacêutica, alimentícia e petrolífera (GUDIÑA et al., 2013). Estudos indicam que existe uma relação sinérgica entre as famílias de lipopeptídeos, o que aumentaria a atividades biológicas apresentadas por esses, como por exemplo a ação conjunta da surfactina e da iturina no combate a fungos é relativamente maior do que esses peptídeos agindo de forma isolada (FARZANEH et al., 2016; KALAI-GRAMI et al., 2016; MIHALACHE et al., 2018).

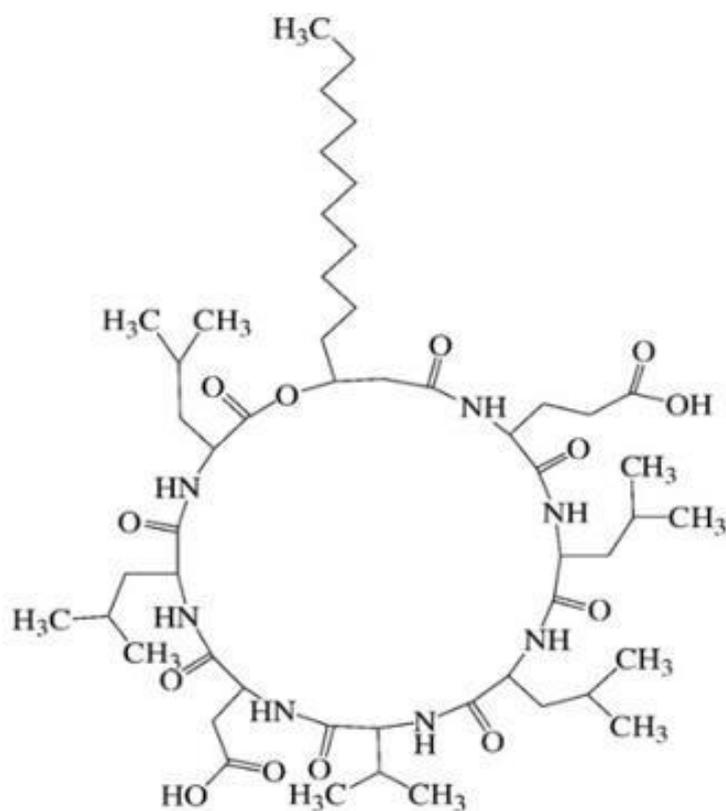


Figura 9: Estrutura química das Surfactinas. (Imagem extraída de WANG et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultura

Para a realização do presente estudo foram utilizados como meios de cultivo o meio mínimo mineral de pena (MMP), meio mínimo mineral de farinha de pena (MMFP) e caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI). MMP e MMFP foram compostos por 0,5 g/L de NaCl, 0,3 g/L de K₂HPO₄, 0,4 g/L de KH₂PO₄, 1,9 g/L de NH₄CL e 10 g/L de pena/farinha de pena em água destilada (DAROIT, 2011). O caldo BHI foi preparado segundo instruções do fabricante: 37 g/L em água destilada. O meio sólido de BHI, foi constituído acrescentado de 2% de ágar-ágar ao caldo BHI. Todos os meios foram submetidos a esterilização em autoclave por 15 min a 121°C. As penas foram obtidas por doação do grupo Aviário Porto-Alegrense (Avipal S.A.) e a farinha de penas a partir de doações da empresa Bunge.

4.2 Micro-organismos

4.2.1 Micro-organismo – *Bacillus* sp. P45

Bacillus sp. P45 foi isolado do intestino do peixe amazonense *Piaractus mesopotamicus* e cedida pelo Prof. Dr Spartaco Astolfi Filho, docente da Universidade Federal do Amazonas – UFA.

4.2.2 Micro-organismo indicador

Listeria monocytogenes ATCC 7644 foi escolhida como micro-organismo indicador devido a sua importância na indústria alimentar e sua relevância na área médica. A linhagem foi obtida a partir da bacterioteca do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – ICTA/UFRGS.

4.2.3 Manutenção e estoque dos micro-organismos

O *Bacillus* sp. P45 foi mantido em placas de BHI, a 4 °C e quinzenalmente era inoculado em novas placas de BHI, incubadas por 24 h a 30 °C. Para a cultura

indicadora, *L. monocytogenes*, a temperatura de incubação foi de 37 °C. Ambas as culturas foram armazenadas a -20 °C em caldo BHI contendo 20% (v/v) de glicerol.

4.3 Curva de crescimento

Para avaliar a dinâmica do crescimento e produção do peptídeo antimicrobiano, inicialmente foi realizada uma curva de crescimento de *Bacillus* sp. P45 a 30 °C em BHI, MMP e MMFP, durante 72 h.

4.3.1 Preparação do pré-inóculo

O microrganismo produtor foi inoculado e cultivado por 24 h em placas de ágar BHI a 30 °C. Após esse período, as colônias foram raspadas delicadamente da placa, depositadas em tubos contendo solução salina 0,85% (8,5 g/L NaCl) estéril e misturadas até a obtenção de uma suspensão homogênea padronizada com uma OD de 0,5, em um comprimento de onda de 600 nm. Essa padronização corresponde, aproximadamente a 10^8 UFC/mL.

4.3.2 Curva de crescimento e amostragem

Uma alíquota de 1 ml do pré-inóculo foi adicionada a frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL dos três meios utilizados, MMP, MMFP e BHI. Os frascos então foram incubados a 30 °C e mantidos sob agitação (125 rpm) durante 72 h. Durante esse período, em oito pontos (0, 4, 8, 24, 32, 48, 56 e 72 h) foram coletadas alíquotas para os testes subsequentes. O momento da transferência da alíquota do pré-inóculo foi considerado o ponto zero da curva. O experimento foi realizado em triplicada para cada meio de cultivo.

4.3.3 Determinação do número de células viáveis

A determinação do número de células viáveis por mL (UFC/mL) foi realizada pela técnica de micro-diluição, onde 100 µL de cada meio de cultura foram diluídos de 10^2 a 10^6 , em tubos previamente preparados com 9,9 e 9,0 mL de solução salina 0,85%. Após as diluições, alíquotas de 10 µL de cada diluição foram

depositadas em placas de BHI e incubadas a 30 °C por 24 h. A contagem foi realizada com auxílio de um contador de colônias, enumerando nas diluições a quantidade de colônias entre 0 e 200.

4.3.4 Determinação de atividade antimicrobiana

O método de diluição seriada foi utilizado para a determinação do número de unidades de atividade por mL (UA/mL), de acordo com o método descrito por Motta & Brandelli (2002), com algumas modificações. Alíquotas foram coletas em cada ponto e em cada meio de cultura, centrifugadas a 10.000 x g, durante 15 min e 4 °C. Filtrou-se o sobrenadante e o pellet descartado. Em placas de microtitulação (96 poços) o sobrenadante foi sucessivamente diluído na proporção 1:1 em solução salina estéril (NaCl 0,85%), obtendo-se assim as seguintes diluições: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e assim sucessivamente. Alíquotas de 10 µL de cada uma das diluições foram inoculadas diretamente sobre placas de BHI, previamente inoculadas com uma solução salina (NaCl 0,85%) contendo cerca de 10⁸ UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. O valor designado como UA/mL foi definido como o inverso recíproco da última diluição onde se obteve um halo de inibição bem definido.

4.3.5 Determinação da concentração de aminoácidos livres

Diante disso a quantidade de grupos amino livres foi determinada pelo método de Sun et al. (2006), com modificações.

Três soluções foram utilizadas: Solução A: solução tampão acetato (4 N), com pH 7,0; Solução B: 50% etanol; e a Solução C ou solução de trabalho. A solução A foi preparada dissolvendo acetato de sódio em água milli-Q, ajustando o pH em 7,0 com ácido acético ou hidróxido de sódio. A solução B foi produzida misturando etanol e água ultrapura (purificador Milli-Q), numa proporção 1:1, indiferente do volume necessário. A solução de trabalho ou solução C foi realizada dissolvendo 0,5 g de ninidrina e 75 mg de hidridantina em 18,75 mL de DMSO e aspergindo gás nitrogênio por 2 minutos sobre o líquido. Após esse período, 11,25 mL da solução A foram adicionados à solução de trabalho e aspergido gás nitrogênio por mais 2 minutos. O procedimento consistiu em misturar 500 µL da

amostra de interesse mais 1 mL da solução C, levando-se a mistura ao banho seco a 100 °C por 10 minutos e, ao final desse período, a mesma foi transferida para o gelo. Após o resfriamento da amostra, pipetou-se 1 mL desta em tubos contendo 5 mL de solução B, homogeneizou-se o tubo e realizou-se leitura da absorbância em um comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro. A determinação de aminoácidos livres foi realizada pela comparação da absorbância frente a uma curva de calibração de L-leucina.

4.3.6 Determinação da concentração de proteínas solúveis

A fim de estimar a concentração de proteínas solúveis em cada um dos oito tempos e em cada meio de cultivo, alíquotas foram coletas e submetidas ao método proposto por Lowry, Randall & Lewis (1951), com modificações.

Utilizou-se os seguintes reagentes: Solução 1 (Na_2CO_3 2% diluídos em NaOH 0,1M), solução 2 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% e $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1%), solução 3 (50 mL da solução 1 + 1 mL da solução 2) e o reagente de Folin-Ciocalteu (FC; 2 N), diluído (1:1) com água ultrapura.

Na reação misturou-se 1 mL da solução 3 com 20 μL da amostra. Depois de 10 minutos em temperatura ambiente, 100 μL do reagente FC, já pronto para uso, foram adicionados e deixou-se em temperatura ambiente por 30 minutos, em local escuro. O controle foi preparado com a substituição da amostra por água destilada.

As determinações de concentração foram realizadas em uma absorbância de 750 nm e o experimento executado em triplicata. Foi preparada uma curva padrão de 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), para interpretação dos resultados.

4.4 Índice de emulsão

A capacidade emulsificante foi testada a partir dos sobrenadantes obtivos do cultivo de *Bacillus* sp. P45 nos diferentes cultivos, utilizando o método, com algumas alterações, segundo Velho et al. (2011). Alíquotas foram retiradas dos oito tempos estipulados, dos três cultivos e submetidas a centrifugação (10.000 x g, 15 min a 4 °C). Dois mL dos sobrenadantes, filtrados em membranas de 0,22 μm

(Millipore, EUA) foram misturados com 3 mL de xileno, homogeneizadas por 2 min e mantidas em repouso por 24 h. Logo após o acréscimo do xileno e depois desse período de descanso, a altura da coluna de emulsão foi medida e o índice de emulsificação calculado, de acordo com a seguinte fórmula:

$$E24 = (He) \times 100/(Ht)$$

Onde, E24 = índice de emulsão, He = altura da camada de emulsão e Ht = altura total.

4.5 Obtenção do sobrenadante bruto

Após avaliação inicial das análises descritas anteriormente, decidiu-se realizar a purificação parcial e produção de peptídeos antimicrobianos em MMFP após 48 h de cultivo.

4.5.1 Preparação do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado como descrito no item 4.3.1

4.5.2 Obtenção do sobrenadante

Alíquotas de 1 mL do pré-inóculo foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, já contendo 100 mL de MMFP e BHI. As culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação (125 rpm), durante 48 h. Após esse período, os cultivos foram submetidos a centrifugação (10.000 g, 4 °C, 15 min), o pellet foi descartado e o sobrenadante filtrado através de filtros de celulose com poros de 0,22 µm. O filtrado foi mantido sob refrigeração a 4 °C até sua utilização.

4.6 Purificação parcial dos peptídeos bioativos sintetizados por *Bacillus* sp. P45

A purificação parcial da substância antimicrobiana, produzida por *Bacillus*

sp. P45 a partir do seu cultivo em MMFP e BHI, foi realizada com base em Sirtori (2006). A figura 10 ilustra o esquema de purificação parcial adotado e adaptado.

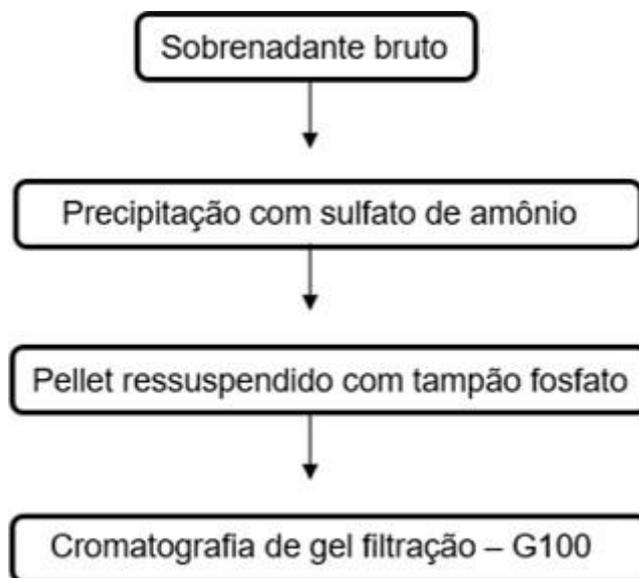


Figura 10: Esquema da purificação parcial de proteínas.

4.6.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

Inicialmente, foi determinado o melhor intervalo de precipitação com sulfato de amônio através da precipitação fracionada. Com base em estudos anteriores, a precipitação foi realizada com uma concentração de saturação de 30%. Nesse sentido foi realizado um cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMFP durante 48 h a 30 °C. Após esse período, o cultivo foi submetido a centrifugação (10.000 g, 4 °C, 15 min), o pellet foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado, aos poucos e delicadamente, a quantidade calculada de sulfato de amônio sólido para atingir 30% de saturação (ENGLARD & SEIFTER, 1990). O acréscimo do sal foi realizado enquanto o cultivo estava imerso em banho de gelo e sob agitação magnética. Após isso, o recipiente foi mantido sob agitação durante 60 min, sendo em seguida reservado e mantido sob refrigeração overnight, aproximadamente 16 h.

Após esse período de descanso, procedeu-se à centrifugação (11.500 g, 4 °C, 20 min), sendo o sobrenadante descartado e o pellet suspenso com 1 mL de solução tampão fosfato (10 mM, pH 7,0).

4.6.2 Cromatografia de gel filtração

Após determinar o melhor intervalo para precipitação com sulfato de amônio e dissolver o pellet resultante, uma alíquota de 1 mL foi eluída em uma coluna de gel filtração (0,8 x 30 cm) Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão fosfato (10 mM, pH 7,0). Conforme a amostra era eluída na coluna, em um fluxo de ~20 mL/h, frações de 1 mL foram coletadas em microtubos tipo Eppendorf®. Posteriormente, foi determinada a absorbância em um comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro, e todas as frações foram testadas quanto à atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, de acordo como o descrito no item 4.3.4

4.6.3 Identificação por MALDI-TOF/MS (ionização e dessorção a laser assistida por matriz)

Para a identificação por MALDI-TOF/MS, seguiu-se o método realizado por Stincone et al., (2020), com modificações. Todas as frações (obtidas no item 4.6.2) que apresentaram atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* foram submetidas a ultracongelamento (-60°C) por 48 h e posterior liofilização. Após esse procedimento de retirada de água, as amostras foram agrupadas e designadas como Fração 1 e 2, para o cultivo em MMFP e BHI, respectivamente. As amostras liofilizadas e reunidas foram dissolvidas em 500 µL de uma solução 0,1% de TFA. Essa solução consistiu em 7 mL de água ultrapura misturados a 3 mL de acetonitrila, após a homogeneização 10 µL desse volume foram retirados e acrescentado 10 µL de TFA. Após esse procedimento as frações 1 e 2 foram levadas à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde os espectros de massa foram registrados utilizando um espectrômetro de massas, Bruker Autoflex Speed (Bruker Daltonik, Alemanha) operando no modo refletor positivo, com a fonte de íons 1 ajustada para 19,0 kV e a fonte 2 para 16,70 kV, com tensões de lente e refletor de 8,40 kV e 21,00 kV, nessa ordem. A matriz utilizada foi o HCCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico) em TA30 10,0 mg/mL (mistura de 1 µL de amostra com 1 µL de solução da matriz). A excitação a laser foi de 355 nm, tipicamente a 60% da saída máxima de 150 mJ, e 2000 disparos foram acumulados.

4.7 Sequenciamento e montagem do genoma

A partir do DNA total, foi realizado o sequenciamento genômico da linhagem *Bacillus* sp. P45 em plataforma Illumina® HiSeq, gerando duas bibliotecas com sequências de extremidades pareadas de 250 pb de comprimento (Illumina, San Diego, EUA). Em seguida, para remover os adaptadores utilizados para o sequenciamento, os arquivos FASTQ contendo as duas bibliotecas geradas foram submetidos à ferramenta de processamento Trimmomatic (BOLGER et al. 2014).

Após averiguar a qualidade das leituras (reads) no programa FastQC (ANDREWS, 2010), as sequências livres de adaptadores foram utilizadas para a montagem do genoma no programa SPAdes (BANKEVICH et al., 2012), utilizando os parâmetros padrão do algoritmo. Para avaliar a qualidade da montagem, o arquivo contendo os contigs foi submetido ao programa Quast 4.0 (GUREVICH et al., 2013), o qual fornece os dados em relação ao número de contigs gerados, seu comprimento médio, o número de contigs maiores o que 1kb, a relação CG (%) e o N50, que define a qualidade da montagem em termos de contiguidade.

Para o ordenamento dos contigs, foi utilizado o programa Mauve (DARLING et al., 2004), usando como referência o genoma da linhagem *Bacillus velezensis* FZB42, com o qual a linhagem *Bacillus* sp. P45 apresentou a maior identidade e cobertura de sequência, de acordo com o algoritmo BLAST, disponível no site do NCBI. A anotação automática do genoma foi realizada através da sua submissão ao servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (AZIZ et al., 2008).

4.7.1 Comparação entre genomas

Para a comparação entre o genoma da linhagem *Bacillus* sp. P45 e aquelas mais próximas, estabelecidas de acordo com o resultado do algoritmo BLASTN, foi utilizado o software BRIG (ALIKHAN et al., 2011), que, a partir do mesmo algoritmo permite a visualização de cada genoma como um anel em torno do genoma a ser analisado. De acordo com a intensidade das cores apresentadas em cada anel, é possível observar as zonas de maior ou menor correspondência naquele conjunto de dados.

A distância genética entre a sequência de *Bacillus* sp. P45 e aquelas oriundas

das espécies mais próximas a ela foi estabelecida utilizando-se a ferramenta GGDC 2.1 (Genome-to-genome Distance Calculator) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013), que calcula a porcentagem de hibridização DNA-DNA *in silico* entre dois conjuntos gênicos. Quando essa porcentagem é superior a 70%, infere-se que os genomas hibridizados pertencem à mesma espécie.

A fim de inferir a espécie da linhagem P45, partindo da identificação inicial da sequência genômica completa, realizada através do algoritmo BLASTN, foram selecionadas sequências nucleotídicas do gene que codifica para o rRNA 16S bacteriano e também as sequências do gene *rpoB*, que codifica para a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana, de *Bacillus* sp. P45 e de linhagens mais próximas a ela, pertencentes ao grupo de *B. subtilis*. A partir dessas sequências, foram obtidas árvores filogenéticas através dos métodos de *Neighbor joining*, para o gene codificante para o rRNA 16S, e máxima parcimônia, para o gene *rpoB*, ambos no programa MEGAX (KUMAR et al., 2018).

4.7.2. Identificação de clusters gênicos de metabólitos secundários

A identificação de clusters gênicos responsáveis pela produção de metabólitos secundários de origem não ribossomal foi efetuada através da ferramenta online AntiSMASH (WEBER et al., 2015), considerando um cluster gênico como presente quando a identidade com a sequência de referência revelou-se maior do que 65%, com uma cobertura de sequência maior de 85%.

4.8 Análise Estatística

Expressos em média \pm desvio padrão, os dados obtidos foram analisados através do teste de análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises foram repetidas ao menos três vezes.

5. RESULTADOS

5.1 Curvas de crescimento de *Bacillus* sp. P45

As curvas de crescimento de *Bacillus* sp. P45 em meio mínimo mineral farinha de pena (MMFP), meio mínimo mineral pena (MMP) e caldo infusão cérebro coração (BHI) estão apresentadas na Figura 11.

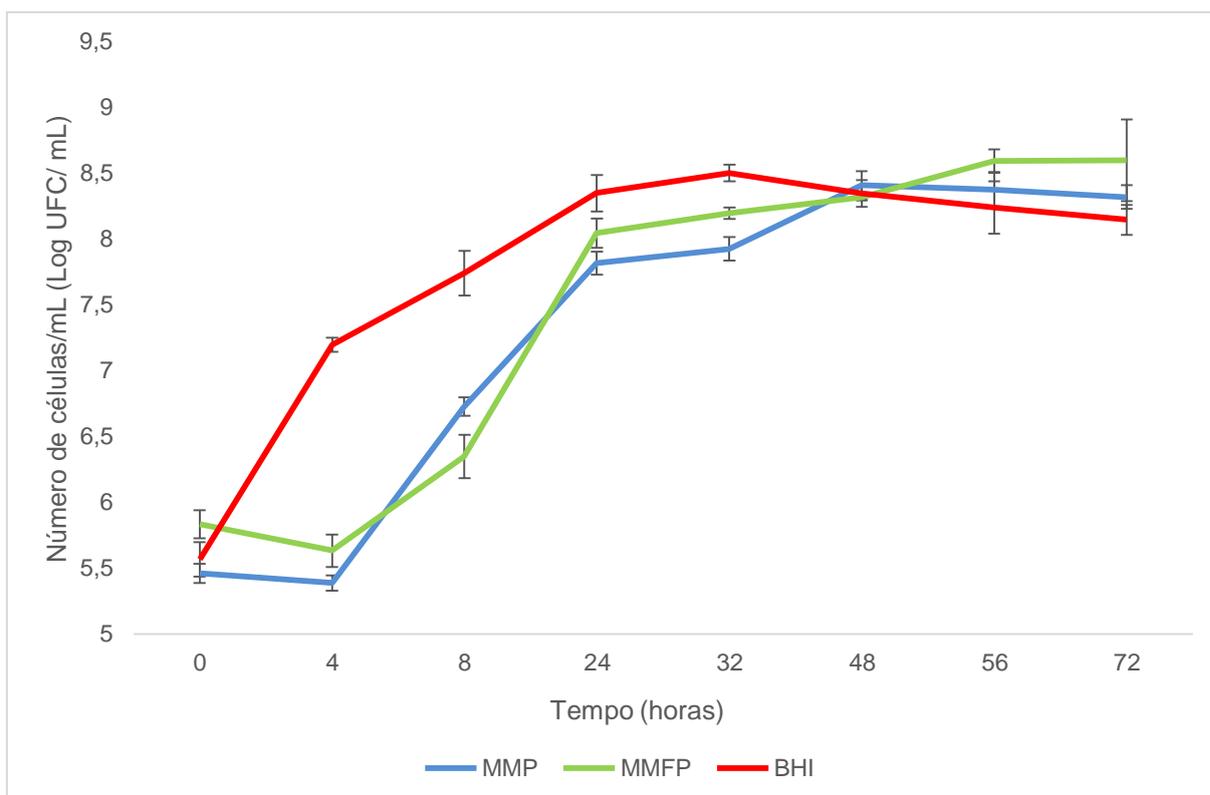


Figura 11: Curvas de crescimento de *Bacillus* sp. P45 em caldo infusão cérebro coração (BHI), meio mínimo mineral farinha de pena (MMFP) e meio mínimo mineral pena (MMP).

Quando incubada aerobiamente a 30 °C, durante 72 h sob agitação, observou-se que *Bacillus* sp. P45 em MMFP e MMP exibe comportamentos semelhantes. As curvas de crescimento nos meios queratinosos apresentaram as fases do crescimento microbiano evidenciadas. Pode-se perceber que esses cultivos exibem um período de adaptação, com baixa ou quase nenhuma divisão celular, denominada fase lag. Essa fase durou 4 h, após esse período, o cultivo seguiu para a fase exponencial ou fase log, onde há intensa divisão celular e crescimento populacional, terminando em 48 h após a inoculação, sendo seguida por uma fase estacionária crescente que se

mantem até 72 h, o fim do cultivo.

Em contrapartida, a curva de crescimento de *Bacillus* sp. P45 em BHI, diferiu das curvas de MMFP e MMP, não apresentando a fase lag, observando uma fase exponencial inicial que perdura até 32 h após do inóculo. Uma etapa estacionária decrescente de 12 h entre 32 e 48 h, seguida do início da fase de declínio.

5.2 Determinação da atividade antimicrobiana

Em BHI, a atividade antimicrobiana foi detectada a partir de 8 horas de incubação e a atividade máxima observada em 24 horas, fase exponencial da curva de crescimento, com um valor de 3200 UA/mL (Figura 12).

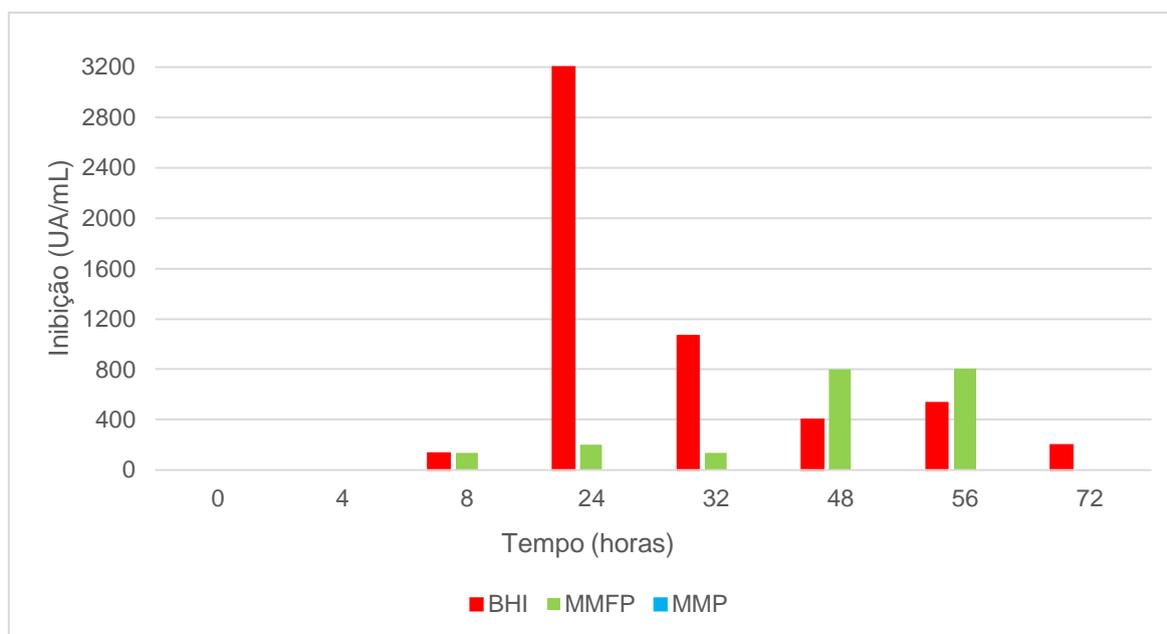


Figura 12: Comparativo da atividade antimicrobiana do sobrenadante, do cultivo nos três diferentes meios de cultura (BHI, MMFP e MMP).

Assim como em BHI, em MMFP a atividade antimicrobiana inicial ocorreu em 8 h, contudo sua maior atividade foi observada em 48 e 56 h, fase exponencial e estacionária, respectivamente, chegando a 800 UA/mL em ambas. O cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMP não apresentou em nenhum ponto da curva, atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644.

5.3 Determinação da concentração de proteínas solúveis

As análises de quantificação de proteínas solúveis totais revelaram que no cultivo em BHI, as concentrações de proteínas observadas foram superiores as apresentadas por MMFP e MMP. A figura 13 ilustra os dados obtidos.

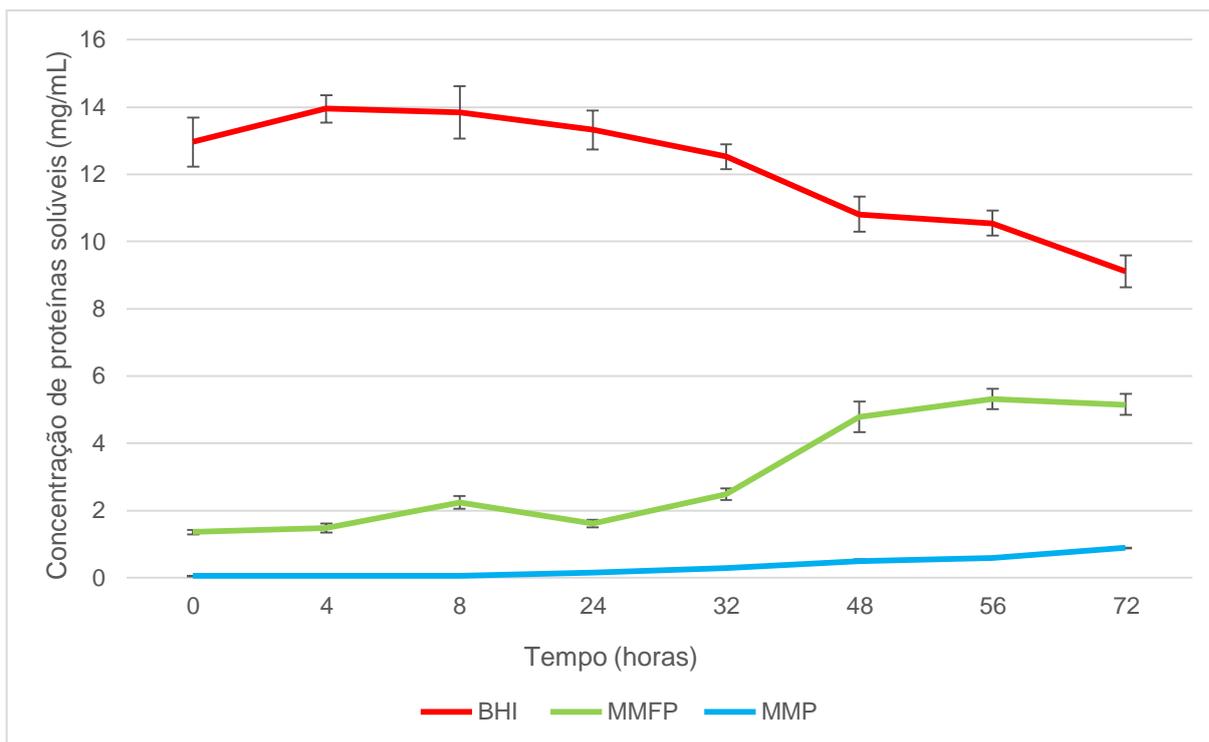


Figura 13: Comparativo da quantificação da concentração de proteínas solúveis nos três meios de cultivo diferentes (BHI, MMFP e MMP).

A concentração mínima observada em BHI foi 9,12 mg/mL em 72 h e quantificação máxima foi em 4 h a partir do inóculo, registrando um valor de 13,94 mg/mL, durante a fase log da curva de crescimento. Nos pontos 48 e 56 h, onde observou-se maior atividade antimicrobiana, em MMFP, as determinações obtidas nesse cultivo foram 4,78 e 5,31 mg/mL, respectivamente. Em contrapartida as menores concentrações para esse cultivo foram durante a fase lag, de 0 a 4 h, com valores de 1,36 e 1,48 mg/mL, respectivamente. A maior concentração registrada no cultivo MMP foi em 72 h, com 0,88 mg/mL, contrastando com a menor quantificação exibida no tempo 0 h, de 0,051 mg/mL de proteínas solúveis.

5.4 Determinação da concentração de aminoácidos livres

Semelhantemente à quantificação de proteínas solúveis, a leitura da reação de ninidrina evidenciou uma quantidade elevada de aminoácidos nos cultivos de *Bacillus* sp. P45 em BHI, atingindo concentrações 14,75 mg/mL em 56 h e 15,74 mg/mL em 72 h. As menores quantidades observadas nesse substrato foram 11,40 mg/mL em 24 h.

Os cultivos realizados em substratos queratinosos exibiram concentrações menores de aminoácidos livres, quando comparadas com as determinações em BHI, durante todo o período de análise, com um leve aumento a partir de 32 h em MMFP e 48 h e MMP, com valores de 1,93 mg/mL e 1,70 mg/mL, respectivamente. As menores quantificações para MMFP foi de 0,98 mg/mL em 8 h de cultivo, e de 1,47 mg/mL em MMP, no momento do inóculo. Esses resultados estão ilustrados na Figura 14.

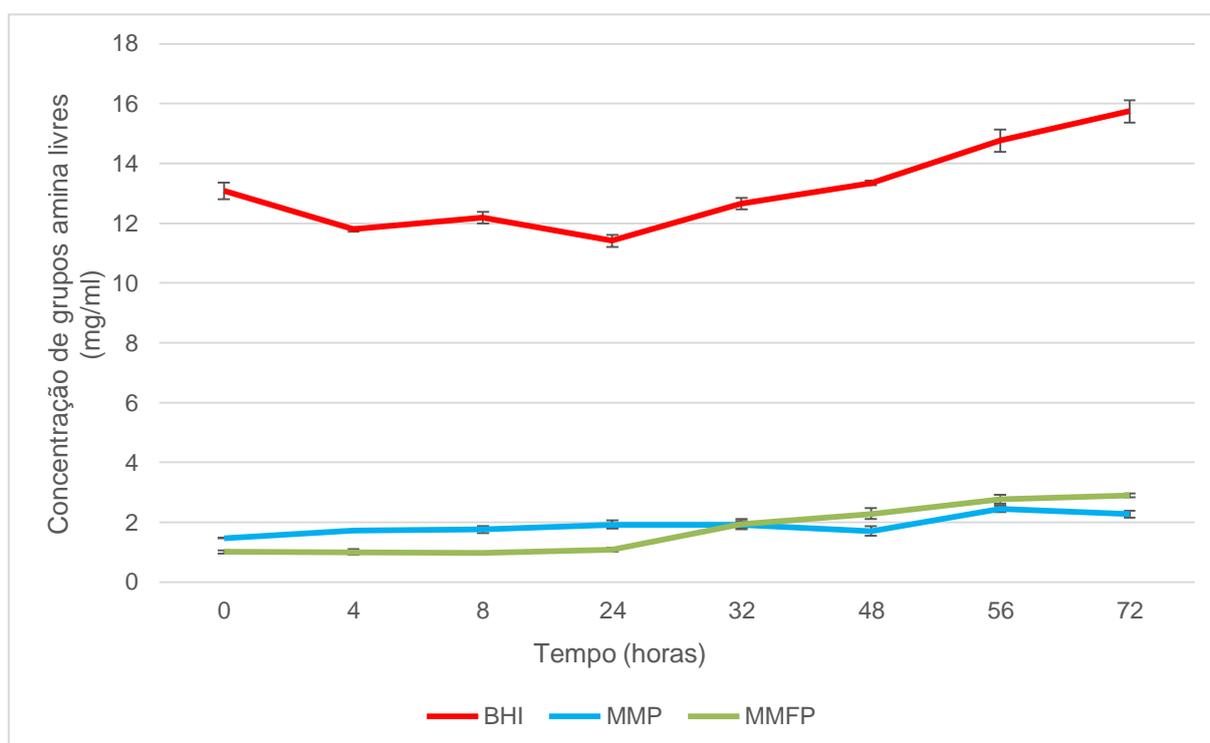


Figura 14: Comparativo da quantificação da concentração de aminoácidos livres nos três meios de cultivo diferentes (BHI, MMFP e MMP).

5.5 Índice de emulsificação

A atividade emulsificante registrada a partir dos cultivos de *Bacillus* sp. P45 em BHI, MMFP e MMP imediatamente após adição de xileno e depois 24 h de incubação estão representados graficamente nas figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

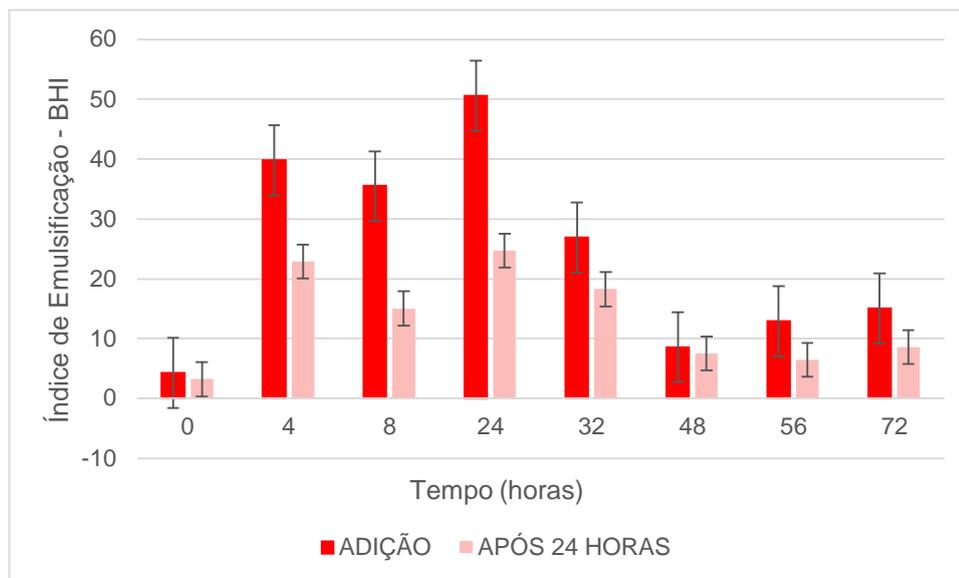


Figura 15: Comparativo do índice de emulsão do cultivo de *Bacillus* sp. P45 em BHI.

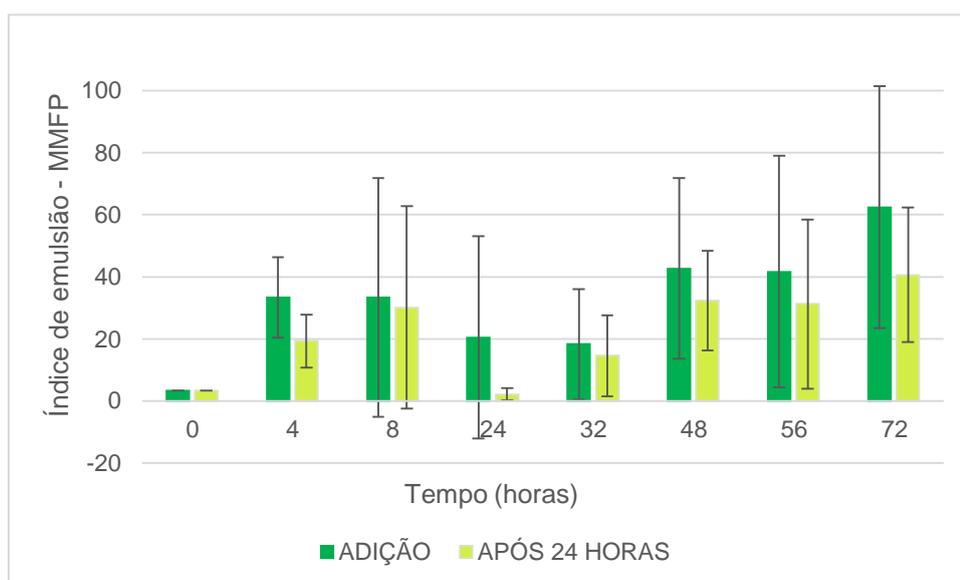


Figura 16: Comparativo do índice de emulsão do cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMFP.

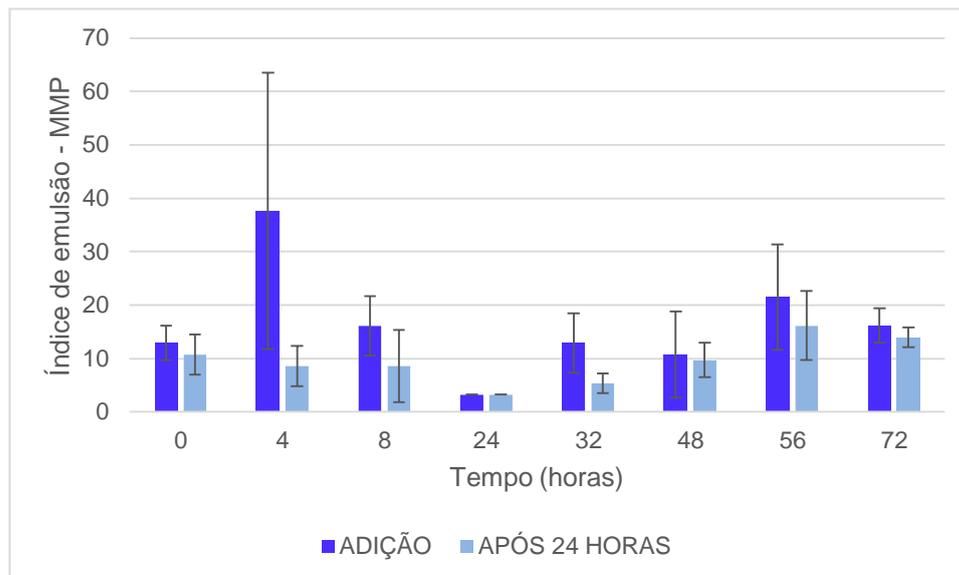


Figura 17: Comparativo do índice de emulsão do cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMP.

Em todos os substratos um comportamento ocorreu com frequência. Uma ou duas amostras da triplicada, no momento em que eram misturadas com o solvente, xileno, e homogeneizadas apresentavam a formação de uma coluna de emulsão, enquanto que as demais amostras, pertencentes a mesma triplicata, não exibiam essas camadas emulsificadas bem definidas. Tal comportamento pode ser visualizado conforme ilustra a figura 18.

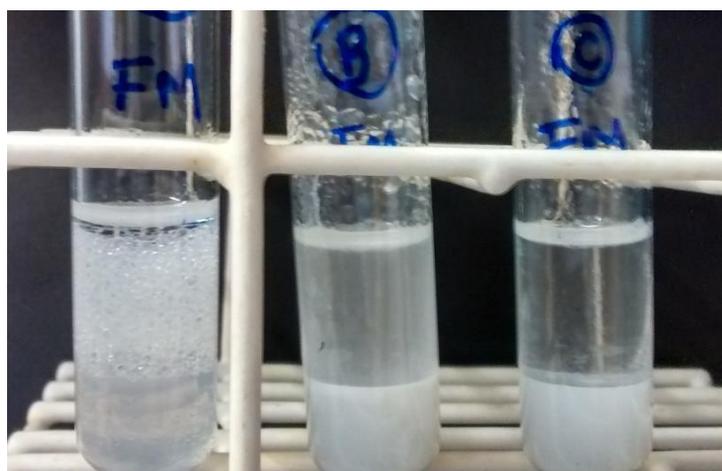


Figura 18: Fotografia da análise da atividade de emulsão, em triplicata, dos compostos bioativos produzidos a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMFP.

5.6 Identificação de compostos por espectrometria de massas

A análise realizada por MALDI-TOF/MS das frações 1 e 2, obtidas dos sobrenadantes da cultura de *Bacillus* sp. P45 em MMFP e BHI, respectivamente, determinou a massa molecular dos compostos lipopeptídicos. Os espectros de massa expressos na forma de picos, obtidos a partir das amostras cultivadas em MMFP são apresentados na figura 19, enquanto que os espectros resultantes do cultivo em BHI são exibidos na figura 20.

A partir da análise dos resultados, em ambos os meios, encontrou-se picos de 643 e 1059 m/z , que podem ser atribuídos a surfactina, enquanto que picos observados entre 1436 e 1528 m/z conferem-se a fengicina e o pico 1103 m/z a iturina (Figuras 19 e 20). Observou-se que o pico 1486,7 m/z identificado como uma fengicina, aparece em ambas as análises. Espectros de massa semelhantes foram observados nas análises e categorizados como pertencentes ao mesmo grupo de lipopeptídeos, as surfactinas, tais como 1044,2 m/z em MMFP e 1059,3 m/z em BHI.

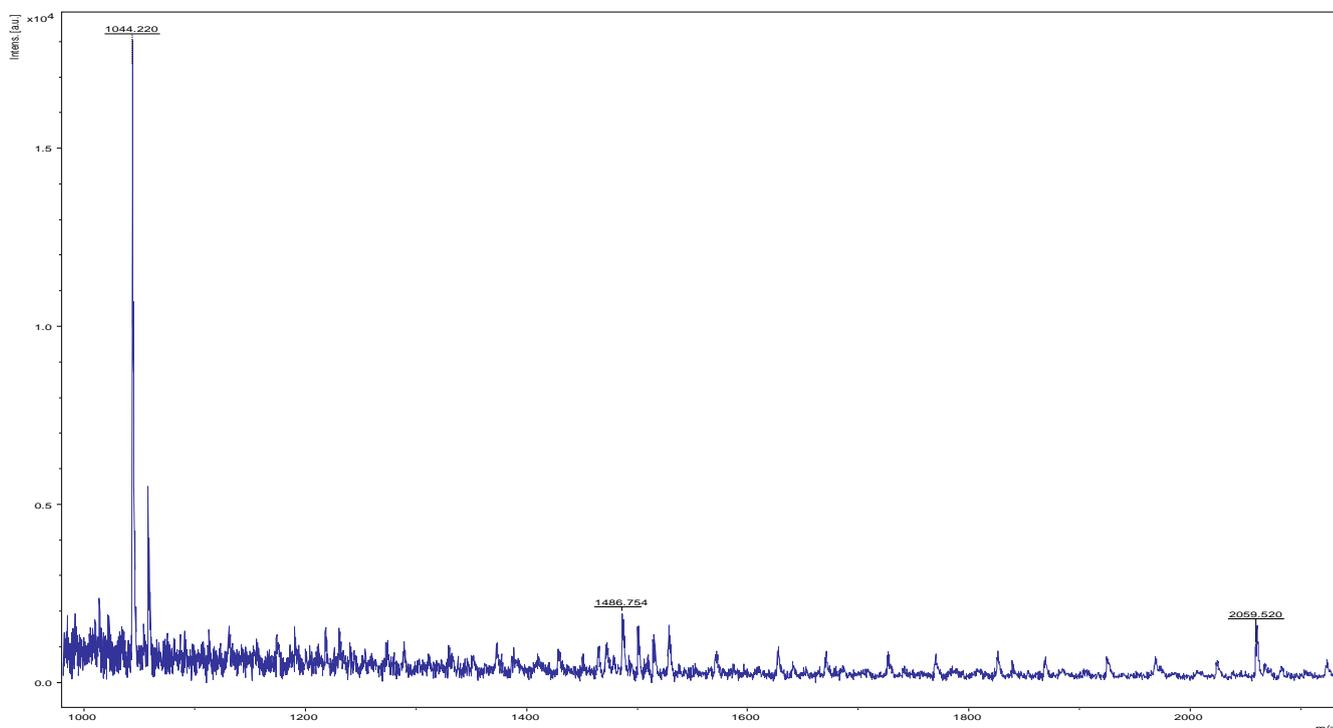


Figura 19: Espectro por MALDI-TOF/MS dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. P45 em MMFP. Método: RP 600-3500 E matriz: HCCA em TA30.

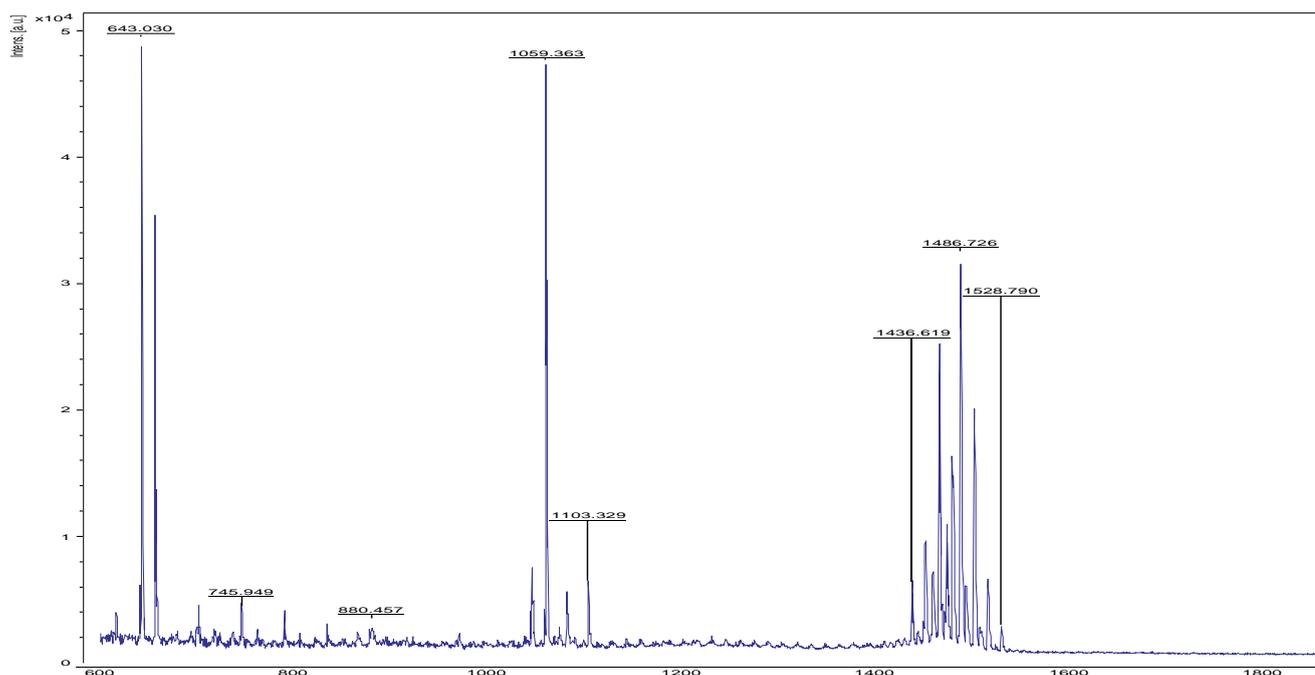


Figura 20: Espectro por MALDI-TOF/MS dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. P45 em BHI. Método: RP 600-3500 e matriz: HCCA em TA30.

5.7 Montagem e anotação do genoma da bactéria *Bacillus* sp. P45

Após a montagem, o genoma *draft* (rascunho) de *Bacillus* sp. P45, contemplado em 66 contigs, o maior deles com 1.078.486 pb, apresentou um comprimento de 4,2 Mb, com um conteúdo total de GC (%) de 45,9. O N50 foi de 307928 pb, de forma que 50% do genoma concentrou-se em contigs de até o comprimento citado.

De acordo com a anotação automática no servidor RAST, foram identificadas 4.455 sequências codificantes de proteínas e 98 de RNAs, das quais 1.415 foram alocadas dentro de 26 subsistemas. Das 3.138 sequências codificantes que não foram alocadas em nenhum subsistema, 38 foram relacionadas às poliketídeo sintases e proteínas relacionadas à produção de metabólitos secundários.

Através do algoritmo de busca BLAST, a linhagem *Bacillus* sp. P45 apresentou 99% de identidade com a sequência do genoma da bactéria *Bacillus velezensis* FZB42, com uma cobertura de 96% da sequência. Dessa forma, foi realizada uma comparação gráfica entre o genoma da linhagem *Bacillus* sp. P45 e genomas de referência de espécies mais próximas a ela dentro do grupo *B. subtilis*. Na

comparação entre oito sequências, observou-se a presença de zonas sem correspondência (sem coloração nos anéis), existentes no genoma da linhagem *Bacillus* sp. P45 mas ausentes na maioria dos genomas analisados. Também observou-se que o genoma da bactéria *Bacillus* sp. P45 é maior do que aquele da sua linhagem mais próxima, FZB42, a qual possui um genoma completo de cerca de 3,9 Kb (Figura 21).

Tomando como ponto de partida a maior identidade da linhagem *Bacillus* sp. P45 com *B. velezensis* FZB42, foi realizada uma reconstrução filogenética a fim de inferir a espécie de P45. Uma vez que a sequência do gene do rRNA 16S não foi informativa para a distinção entre as espécies selecionadas (dados não apresentados), foi utilizado o gene *rpoB*, que codifica para a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana. De acordo com o método de máxima parcimônia, P45 foi identificada como mais próxima à espécie *B. velezensis*, ocupando um ramo juntamente com a linhagem FZB42, resultado este em congruência com aquele obtido através do algoritmo BLASTN (Figura 22).

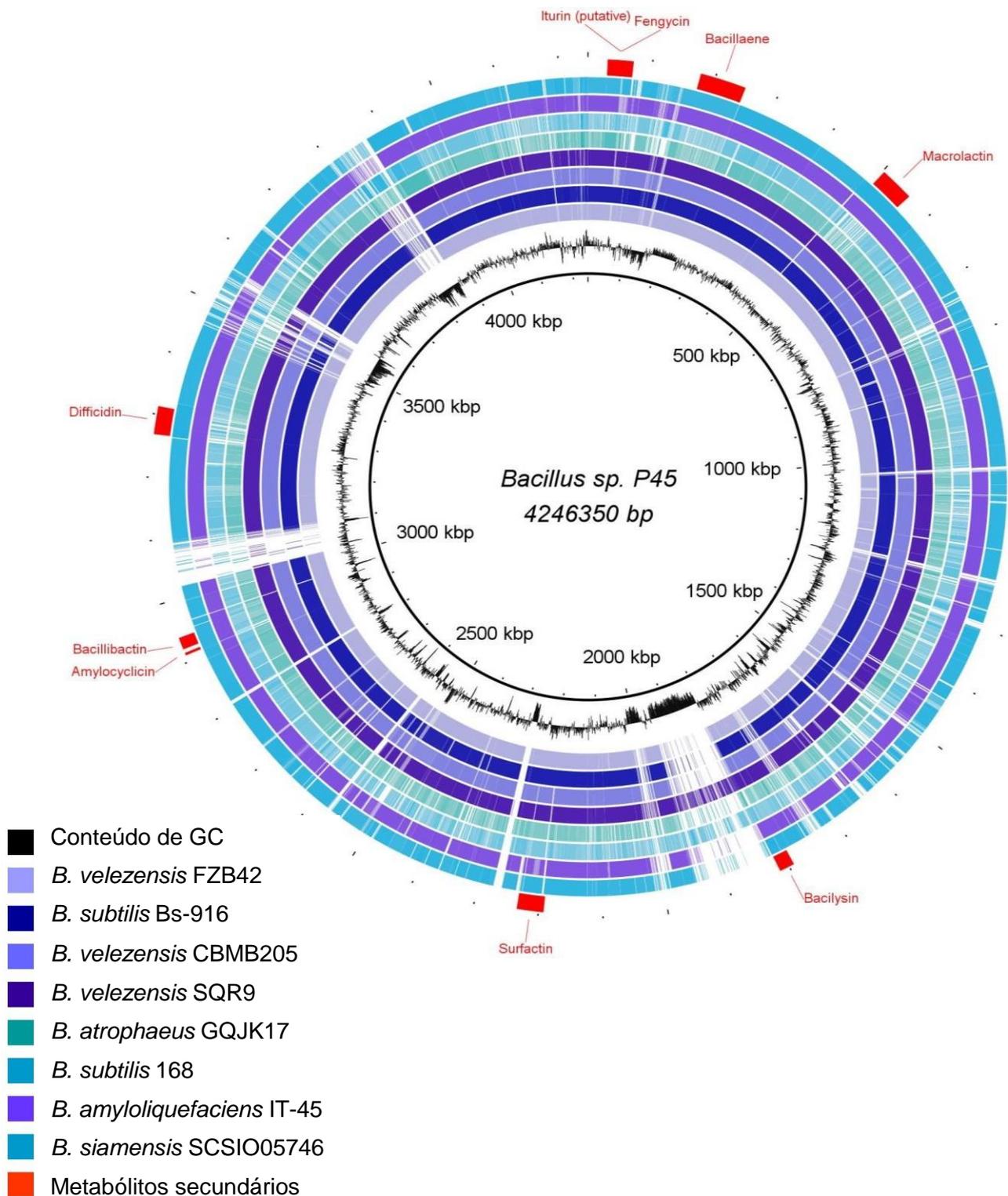


Figura 21: Representação gráfica obtida através do software BRIG com comparação entre as seqüências genômicas completas de 8 linhagens próximas de *Bacillus* com a bactéria *Bacillus sp. P45*. Cada anel representa um genoma completo, enquanto a seqüência de referência (*Bacillus sp. P45*) está indicada pelo anel central preto. As identidades com P45 estão em ordem decrescente, com os

genomas mais similares posicionados mais próximos ao centro e os menos similares posicionados nos anéis periféricos. Adicionalmente, as posições e identificações dos clusters de metabólitos secundários encontrados na sequência da linhagem *Bacillus* sp. P45 estão destacados em vermelho na porção exterior aos anéis e o conteúdo de GC (%) é identificado pelas barras.

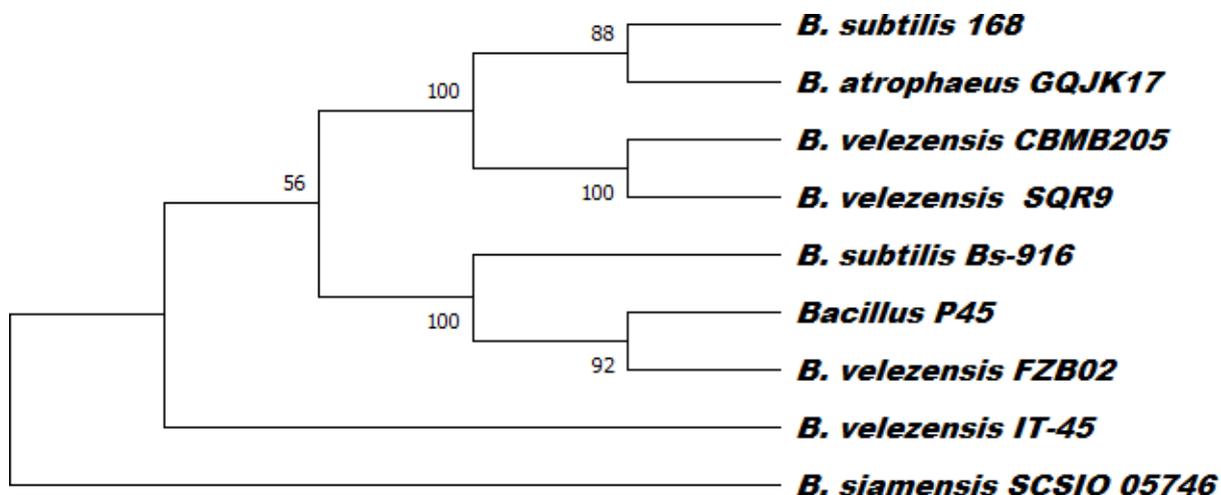


Figura 22: Árvore filogenética de máxima parcimônia, inferida a partir de 500 réplicas de *bootstrap* mostrando a possível relação evolutiva da linhagem P45 com aquelas pertencentes às espécies próximas, considerando a sequência nucleotídica do gene *rpoB*. Os números nos nós identificam a sua porcentagem de suporte.

O cálculo da hibridização DNA-DNA *in silico*, considerando a fórmula 2, recomendada pelo algoritmo, evidenciou uma porcentagem de hibridização entre *Bacillus* sp. P45 e *B. velezensis* CBMB205 de 83,6%, com uma probabilidade de que as linhagens pertencem a mesma espécie de 93%. De forma bastante semelhante, *Bacillus* sp. P45 apresentou uma porcentagem de hibridização DNA-DNA de 90,1% com *B. velezensis* FZB42 (sinonímia de *B. amyloliquefaciens* FZB42), com uma probabilidade de que as linhagens pertençam a mesma espécie de 85,8%. Já as menores porcentagens de hibridização foram verificadas na comparação de *Bacillus* sp. P45 com *Bacillus subtilis* 168 e com *Bacillus atrophaeus* GQJK17 (Tabela 1).

Linhagem	DDH (%)	Probabilidade de que DDH >70% (%)
<i>B. velezensis</i> CBMB205	83,6	93
<i>B. velezensis</i> SQR9	83,8	93
<i>B. velezensis</i> FZB42	90,1	85,8
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	55,2	35,68
<i>B. amyloliquefaciens</i> IT-45	80,4	91
<i>B. methylotrophicus</i> JJ D34	78,6	89,4
<i>B. siamensis</i> SCSIO05746	57,2	42,54
<i>B. subtilis</i> Bs 916	89,6	95,65
<i>B. subtilis</i> 168	20,8	0
<i>B. atrophaeus</i> GQJK17	20,7	0

Tabela 1: Porcentagens obtidas para a hibridização DNA-DNA in silico comparando-se a bactéria *Bacillus* sp. P45 com algumas das linhagens mais próximas a ela. Valores acima de 70% indicam que as linhagens comparadas pertencem a mesma espécie. A coluna da direita apresenta a probabilidade de que as linhagens pertençam a mesma espécie, ou seja, de que a DDH seja maior do que 70%.

5.7.1 Clusters de Metabólitos Secundários

Através da ferramenta online AntiSMASH, foram identificados 8 clusters gênicos responsáveis pela produção de metabólitos secundários (Tabela 2). Dentre estes, somente aqueles que participam da síntese da surfactina e da difigidina obtiveram porcentagens de similaridade menores de 100%. No entanto, as *ORFs* (Open Reading Frames) dos genes centrais para a biossíntese desses metabólitos foram identificadas, de forma que essa menor similaridade pode dever-se às diferenças comumente encontradas no arranjo desses clusters mesmo entre espécies próximas. A posição relativa de cada cluster gênico no genoma da linhagem de *Bacillus* sp. P45 pode ser observada na Figura 21, pelas barras vermelhas externas aos anéis genômicos.

Produto	Início	Término	Similaridade (%)
Fengicina	30719	71044	100
Bacileno	176692	349155	100
Macrolactina	502653	557514	100
Bacilisina	1791724	1815511	100
Surfactina	2192109	2234039	91
Amilociclina	2910933	2915106	100
Bacilibactina	2921160	2940569	100
Dificidina	3268302	3313093	86

Tabela 2: Clusters gênicos de metabólitos secundários identificados na linhagem *Bacillus* sp. P45. Estão indicadas as posições de início e término em relação à sequência do genoma ordenado através do programa Mauve, alinhado usando o genoma de *Bacillus. velezensis* FZB42 como referência.

6. DISCUSSÃO

6.1 Comparação entre curvas de crescimento

O acompanhamento do crescimento celular de *Bacillus* sp. P45 em BHI, MMFP e MMP, sob agitação a 30°C durante 72 h exibiu curvas de MMFP e MMP com comportamentos bastante similares, demonstrando que a bactéria, quando cultivada em substratos queratinosos, apresenta uma fase de adaptação ou fase lag, com duração de cerca de 4 h após a inoculação. JAGADEESAN et al. (2020), mostraram em seu estudo que, o cultivo de *Bacillus pumilus* AR57 em penas de frango também apresenta uma fase lag, por um período de cerca de 2 h. Por outro lado, FAKHFAKH-ZOUARI et al. (2010) observaram que quando cultivaram *Bacillus pumilus* A1 em meio nutritivo sintético a fase lag durou cerca de 16 h. Apesar dessas cepas terem demonstrado capacidade de metabolizar os substratos queratinosos como fonte de carbono e nitrogênio, essa variação de tempo pode ser atribuída à dificuldade por elas encontrada em hidrolisar as queratinas, dificultando o acesso e uso das proteínas como fonte nutricional para o crescimento microbiano (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

O caráter recalcitrante das queratinas deve-se a diversos fatores, tais como queratinas (α e β) altamente compactadas, uma complexa rede de ligações cruzadas, formadas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto, essas últimas associadas à quantidade de cisteína, que atuam na estabilidade estrutural dessas moléculas, gerando estruturas altamente estáveis, insolúveis, resistentes a choques mecânicos e a ação de proteases comuns, tais como papaína, pepsina e tripsina. (DAROIT; BRANDELLI, 2014; ESLAHI et al., 2015; GEHECKAS et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2020; XIE et al., 2010).

Aliado à recalcitrância dos materiais queratinosos, acredita-se que a produção de enzimas proteolíticas por *Bacillus* sp. P45 ocorra durante a fase lag. Segundo Vidmar & Vodovnik (2018), Daroit & Brandelli (2014) e Voigt et al. (2007) as enzimas queratinolíticas são regularmente indutíveis e eventualmente expressas constitutivamente, ou seja, de forma contínua, em um processo dependente do estágio de crescimento microbiano. A expressão contínua dessas proteases está associada principalmente à atividade caseinolítica e não queratinolítica, e sugerindo-se que as enzimas queratinolíticas sejam principalmente indutíveis (GUPTA;

RAMNANI, 2006).

Adicionalmente, de acordo com Sonenshein (2005) e Daroit & Brandelli (2014) a produção de proteases microbianas está também associada a quantidade de aminoácidos constituintes do meio de cultivo e a escassez de fontes nutricionais, tais como carbono e nitrogênio. Meios contendo alta disponibilidade de nutrientes e aminoácidos geram aumento nas concentrações de trifosfato de guanosina (GTP), mantendo o repressor transcricional global CodY em sua forma fosforilada (ativa). Entretanto, quando os cultivos apresentam limitações nutricionais e baixo crescimento microbiano, as concentrações de GTP tendem a diminuir, inativando a proteína reguladora CodY. Essa inativação do CodY pode induzir a um aumento na produção de proteases, durante a fase estacionária, numa tentativa adaptativa às limitações nutricionais que ocorrem o final da fase exponencial (GUPTA et al., 2002).

Em MMFP e MMP, após as primeiras 4 h de inóculo, *Bacillus* sp. P45 pode enfrentar condições de escassez de nutrientes, levando a uma provável baixa concentração de GTP e a inativação do repressor CodY, resultando na síntese dessas proteases, que iniciam o processo de hidrólise da queratina e conseqüentemente dão continuidade ao crescimento microbiano. O período de adaptação e de atividade proteolítica é sucedido pelo crescimento exponencial em 48 h, essa etapa, por sua vez, é seguida por uma fase estacionária final até tempo final da análise, não sendo expressa uma fase de declino. Sangali & Brandelli (2000) mostraram que as queratinases continuam a ser produzidas durante a fase exponencial final ou estacionária, possibilitando que *Bacillus* sp. P45 tenha hidrolisado queratinas restantes no meio, durante essas fases, auxiliando no crescimento e manutenção microbiana.

Diferentemente dos cultivos contendo queratina (MMP, MMFP), a análise da curva de crescimento de *Bacillus* sp. P45 em BHI (Figura 11) não revelou a presença de fase lag, exibindo diretamente uma fase exponencial, até 32 h após o inóculo. A ausência de fase lag em BHI pode ser atribuída a abundância nutricional do meio, em cuja composição há cerca de 2,0 g/L de glicose e 10,0 g/L de peptona, ou seja, fontes diretas e diretamente disponíveis de carbono, nitrogênio e demais nutrientes necessários para o crescimento e manutenção bacteriana. A fase exponencial é seguida por uma fase estacionária. Tal desempenho pode ser explicado devido ao consumo das fontes nutricionais restantes no meio, pela elevada biomassa

bacteriana.

6.2 Produção de atividade antimicrobiana

A avaliação do crescimento celular de *Bacillus* sp. P45 em BHI (Figura 11) e da atividade antimicrobiana (Figura 12), indica um aumento significativo na produção de compostos antimicrobianos durante 24 e 32 h, sugerindo que a síntese de antimicrobianos produzidos pela cepa *Bacillus* sp. P45, em BHI, está relacionada com a fase exponencial. Resultados similares foram obtidos por Baidara et al. (2013) e Avci, Çagri-Mehmetoglu e Arslan (2017), que ao analisarem a curva de crescimento de *Bacillus subtilis* SK.DU.4 e *Bacillus* sp. ZBP4 em meios nutritivos sintéticos, demonstraram que a produção de compostos antimicrobianos está associada a fase exponencial de crescimento.

O primeiro registro de atividade antimicrobiana a partir do cultivo em BHI, ocorreu em 8 h, quando a densidade populacional atingia um valor de 7,73 log UFC/mL. Em 24 e 32 h foram registradas as maiores atividades inibitórias por mililitro, 3200 e 1066 UA/mL, respectivamente, e também as maiores densidades populacionais, com valores de 8,349 log UFC/mL em 24 h e de 8,49 log UFC/mL em 32 h. Resultados semelhantes foram obtidos por Perez et al. (2017) que, ao cultivarem *Bacillus* sp. P5 em BHI, obtiveram picos de inibição em 6 h e 30 h depois do inóculo, ambos os pontos com densidade populacional em torno de 8 log UFC/mL e com inibições de cerca de 1000 e 900 UA/mL, respectivamente.

Durante a fase estacionária do cultivo em BHI, ocorrida entre 48, 56 e 72 h, registrou-se valores de células viáveis de 8,35, 8,23 e 8,14 log UFC/mL, respectivamente, e as atividades antimicrobianas foram inferiores (400, 533 e 200 UA/mL, respectivamente). Perez e colaboradores (2017) também mostraram diminuição da atividade antimicrobiana após 30 h de cultivo, mesmo mantendo a densidade populacional em torno de 8 log UFC/mL.

Durante o cultivo em MMFP foi observado que as maiores atividades antimicrobianas são expressas entre o final da fase exponencial e o início da fase estacionária, quando o número de células viáveis atingiu valores acima de 8,31 log UFC/mL em 48 h e de 8,59 log UFC/mL em 56 h, com valores de inibição de 800

UA/mL para ambos os tempos. Embora estudos acerca das atividades antimicrobianas de compostos obtidos a partir de subprodutos da indústria serem bastante escassos, Reque e colaboradores (2017) observaram atividade inibitória contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Escherichia coli* ATCC 8739, por compostos antimicrobianos obtidos a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P7 e P45 a partir de farinha de trigo. Motta & Brandelli (2008) não obtiveram atividade inibitória do peptídeo antimicrobiano sintetizado a partir do cultivo com farinha de pena, por *Bacillus* sp. P34, contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Nenhuma atividade inibitória foi observada durante o cultivo em MMP, apesar de a população bacteriana ter atingido valores superiores a 8,0 log UFC/mL durante a fase estacionária. Fontoura e colaboradores (2019) demonstraram que a hidrólise de penas de frango pode resultar em peptídeos com um elevado teor de aminoácidos hidrofóbicos. De acordo com o estudo realizado por Mosquera e colaboradores (2016), a atividade antimicrobiana de peptídeos pode estar relacionada a presença de aminoácidos hidrofóbicos, facilitando as interações entre peptídeos e membranas citoplasmáticas dos micro-organismos (HANCOCK; PATRZYKAT, 2002). Além disso, fatores como hidrofobicidade, flexibilidade, conteúdo de cisteína e resíduos aromáticos e as interações entre peptídeos e lipídeos de superfície são frequentemente associados com a expressão e intensidade das atividades inibitórias expressas pelos peptídeos (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; LIU et al., 2008; SHAVANDI et al., 2017). Entretanto, a ausência de inibição contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 a partir do cultivo em MMP pode ser devido à recalcitrância da queratina constituintes das penas inteiras, resultando em baixa concentração de compostos antimicrobianos produzidos nestas condições de cultivo.

6.3 Concentrações de aminoácidos livres e proteínas solúveis

A determinação quantitativa de compostos contendo grupo amina livre obtidos da cultura de *Bacillus* sp. P45 foram determinados pela reação com ninidrina. Eisele e colaboradores (2013) empregaram essa metodologia espectrofotométrica para determinar a atividade proteolítica de *Bacillus lentus*. O teste também já foi utilizado para determinar a hidrólise de caseína por proteases alcalinas produzidas por *B.*

subtilis, *Pseudomonas aeruginosa* e *Alcaligenes faecalis* (MARATHE et al., 2018). Além disso, Benitez e colaboradores (2010) concluíram que reações positivas do método indicam a presença de amins livres de aminoácidos constituintes de lipopeptídeos, tais como a iturina A e a fengicina, em cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006.

As determinações quantificadas a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P45 em meios queratinosos foram bastante próximas: 2,44 mg/mL de grupos amino livres em MMP e 2,89 mg/mL em MMFP. Essas concentrações de aminoácidos encontradas em MMP e MMFP foram 84,5% e 81,6% menores, respectivamente, do que a registrada em BHI, que apresentou 15,74 mg/mL. As maiores concentrações foram observadas em 72 h, em BHI e em MMFP, enquanto a maior quantidade de grupo amino em MMP foi verificada em 56 h.

Apesar das culturas de *Bacillus* sp. P45 em MMFP e MMP, apresentarem concentrações de 1,3 até 5,31 mg/mL e 0,51 até 0,88 mg/mL de proteínas solúveis, nessa ordem, as análises em BHI resultaram em valores superiores aos registrados nos materiais queratinosos; cerca de 2,6 vezes maior do que o quantificado em MMFP e 15,8 vezes maior que em MMP. Isso se deve ao fato de BHI caracterizar-se como um meio nutricionalmente rico. Entre os meios ricos em queratina, nossos resultados indicam que as concentrações registradas em MMFP foram 6 vezes maiores do que as obtidas em MMP. Ferrareze, Correa & Brandelli (2016), observaram proporções semelhantes quando determinaram proteínas solúveis durante os cultivos de *Bacillus subtilis* FTC02PR em farinha de pena, penas escuras, penas claras e cabelos. Os autores registram que a quantificação em farinha de pena foi cerca de 5 vezes maior do que quando comparada com os demais substratos queratinosos. Outros estudos realizados por Mazotto e colaboradores (2011) concluíram que a determinação dessas biomoléculas solúveis em meio contendo farinha de pena foi cerca de 2 vezes mais do que o quantificado em penas inteiras.

A figura 13 demonstra que as concentrações obtidas pela técnica de Lowry et al., (1951) em MMFP aumentaram conforme o tempo de cultivo, tal comportamento também foi observado por Rieger et al., (2017), no cultivo de *Bacillus* sp. CL18 em MMFP. Análises realizadas por Mazotto e colaboradores (2011) compararam o cultivo de três espécies de *Bacillus* em meio contendo farinha de pena e em meio contendo pena, os autores concluíram que a produção de peptidases e a concentração de

proteínas solúveis foram maiores nos cultivos de farinha de pena.

Szabó et al. (2000) afirmam que é possível mensurar a queratinólise de substratos a partir da análise da concentração de proteínas solúveis em cultivos. Corroborando com essa afirmação, um estudo realizado por De Oliveira e colaboradores (2016) concluiu que, o aumento da concentração de proteínas solúveis nos sobrenadantes dos cultivos indicou eficiência da degradação de queratinas por *Bacillus* sp. CL33A.

Embora as quantidades de aminoácidos livres tenham sido semelhantes em MMFP e MMP, a concentrações de proteínas solúveis encontrada em MMP foi 83,4% menor do que a registrada em MMFP. Um estudo realizado por Grazziotin e colaboradores (2006) demonstrou que a maior produção de proteína solúvel na farinha de pena pode ser resultado de uma maior acessibilidade e homogeneidade deste substrato quando comparado com penas inteiras. Motta & Brandelli (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. P34 em diversos substratos, incluindo farinha de pena. Os autores concluíram que a produção de bacteriocinas pode estar associada a presença de uma fonte de nitrogênio prontamente disponível, como proteínas de fácil metabolização.

Nesse sentido, os resultados indicam que a concentração de proteínas solúveis se caracteriza como um fator determinante na síntese de lipopeptídeos de *Bacillus* sp. P45. Isso pode ser explicado pela recalcitrância e a acessibilidade a queratina. O processamento de penas inteiras em farinha de pena envolve tratamentos hidrotérmicos, como por exemplo o cozimento sob alta pressão e a moagem que pode estar associada a aportes energéticos, que podem facilitar a desestabilização da estrutura da queratina constituinte da pena, aumentando a acessibilidade dessas estruturas.

6.4 Índice de emulsificação

A capacidade de emulsificante de um composto se refere à aptidão que ele apresenta em auxiliar na mistura de substâncias imiscíveis, formando emulsões. Apesar dos bioemulsificantes não apresentarem ação surfactante, essas moléculas estão envolvidas em processos de detergência e solubilização de compostos pouco

solúveis, conseqüentemente aumentando a biodegradação destes (UZOIGWE et al., 2015).

A determinação da atividade emulsificante produzida por *Bacillus* sp. P45, em todos os substratos, não foram conclusivos. Como demonstrado nas figuras 15, 16 e 17 o método apresentou baixa reprodutibilidade em nossos cultivos. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, onde durante o cultivo de *Bacillus flexus* foram obtidos compostos que não demonstraram atividade emulsificante ou caso produziam bioemulsificadores, o faziam em baixa quantidade (YADAV et al., 2016). Os autores sugerem que a capacidade emulsificante não está intrinsecamente relacionada com a produção de biossurfactante. Tal conclusão pode ser reforçada pelos dados encontrados no presente trabalho, uma vez que o método de MALDI-TOF/MS identificou picos característicos de surfactina, um lipopeptídeo amplamente reconhecido como biossurfactante (DE FRANÇA et al., 2015; HENTATI et al., 2019).

6.5 Análise de espectroscopia de massa

Caracterizada como uma metodologia rápida e segura, o MALDI-TOF/MS tornou-se uma ferramenta amplamente empregada nas mais diversas áreas da ciência. Especificamente em microbiologia, a técnica pode ser aplicada em diagnósticos laboratoriais, identificação, tipificação e resistência de micro-organismos (KOSTRZEWA; SCHUBERT, 2016; SCHUBERT; KOSTRZEWA, 2017).

Como ilustra a figura 19, o cultivo em MMFP gerou um espectro de massa com picos em 1044,2 1486,7 e 2059 m/z . Ao comparar valores dos picos obtidos com os valores encontrados na literatura para lipopeptídeos produzidos por outras linhagens de *Bacillus*, o pico 1044,2 m/z foi atribuído como surfactina (AYED et al., 2014; JEMIL et al., 2017; KIM et al., 2010; TORRES et al., 2016). Uma vez que valores como 1485,9, 1485,8, 1485,7 e 1486,8 m/z , encontrados na literatura, foram identificados como lipopeptídeos pertencentes ao grupo das fengicinas, nosso resultado, 1486,7 m/z , enquadra-se nessa família (JEMIL et al., 2017; SLIMENE et al., 2012; STINCONE et al., 2020; TORRES et al., 2016). Stincone e colaboradores (2020) descrevem que os picos 1486, 1501, 1515 e 1530 m/z são reconhecidamente atribuídos a fengicinas, e que alguns picos de massa semelhantes podem ser

isômeros desses lipopetídeos. O pico 2059 m/z não foi identificado como nenhum lipopeptídeo de interesse sintetizado por *Bacillus*.

Alguns espectros produzidos a partir da cultura de *Bacillus* sp. P45 em BHI foram similares aos registrados em MMFP. Na figura 20, observa-se picos m/z de 643,0, 745,9, 880,4, 1059,3, 1103,3, 1436,6, 1486,7 e 1528,7. A fragmentação da amostra, durante a análise, pode gerar a ocorrência de íons do produto. Nesse sentido além do pico 1044,7 m/z , os três primeiros picos (643,0, 745,9 e 880,4 m/z) podem ser classificados como íons de produtos provenientes da fragmentação de íons precursores de surfactina (HENTATI et al., 2019; JEMIL et al., 2017). Adicionalmente, 1059,3 m/z também pode ser categorizada como surfactina, com base na literatura (AYED et al., 2014; HENTATI et al., 2019; JEMIL et al., 2017; KIM et al., 2010; SLIMENE et al., 2012). Os seguintes picos foram obtidos e identificados como lipopeptídeos constituintes do grupo iturina: 1103,3, 1102,5 e 1101,2 m/z (TORRES et al., 2016), 1109,6 m/z (JEMIL et al., 2017), 1108 m/z (KIM et al., 2010) e 1106,6 m/z (VATER et al., 2002). Diante disso o pico 1103,3 m/z obtido em nossa análise pode ser também identificado como um isômero de iturina. Finalmente os últimos picos 1436,6, 1486,7 e 1528,8 m/z podem ser classificados como fengicinas (BEN AYED et al., 2017; GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2018; JEMIL et al., 2017; STINCONE et al., 2020; TORRES et al., 2016).

6.6 Comparação e anotação do genoma

A partir da submissão da sequência total de DNA obtida para a linhagem *Bacillus* sp. P45 ao algoritmo BLASTN, do NCBI, foram estabelecidas as espécies geneticamente mais próximas com o genoma do *Bacillus* sp. P45 (Tabela 1). Apesar da análise anterior do gene para o rRNA 16S sugerir maior similaridade com *B. subtilis* (SIRTORI, 2006), os resultados indicam que *Bacillus* sp. P45 apresenta maior identidade com a sequência de DNA da linhagem *B. velezensis* FZB42. A comparação dos oito genomas completos das linhagens mais próximas do *Bacillus* sp. P45 foi realizada usando a ferramenta BLAST Ring Image Generator (BRIG) (Figura 21), considerando o genoma *Bacillus* sp. P45 como referência central. A partir dos anéis gerados para as oito linhagens comparadas, é possível identificar áreas claras que

são exclusivas do genoma de *Bacillus* sp. P45 (anel preto central) em comparação com as outras linhagens. Tais regiões podem conter genes de interesse únicos existentes na linhagem *Bacillus* sp. P45, que podem não ter sido anotados automaticamente pelo servidor RAST. Dessa forma, poderia ser realizada a mineração minuciosa do genoma obtido para *Bacillus* sp. P45 com vistas à identificação de potenciais genes que sintetizem produtos de interesse nessa linhagem.

A reconstrução filogenética das relações entre P45 e espécies do gênero *Bacillus* mais próximas, considerando a sequência nucleotídica do gene *rpoB*, também demonstrou que a linhagem P45 pertence à espécie *B. velezensis*, com uma alta identidade similaridade com a linhagem FZB42. No entanto, é possível observar que o estabelecimento da identidade das espécies de *Bacillus* permanece um desafio ainda não superado, visto que linhagens atribuídas à espécie *B. subtilis*, como a Bs-916, foram agrupadas em ramos juntamente com *B. velezensis*. Ainda mais crítica é a tentativa de identificação de espécies de *Bacillus* baseando-se somente no gene do rRNA 16S, cuja sequência apresenta-se altamente conservada nessa espécie, não permitindo a correta separação entre elas.

Empregado na agroindústria, atuando como biofertilizante, agente de controle biológico e associado como promotor de crescimento, as análises genômicas de *B. velezensis* FZB42 demonstram que a linhagem apresenta relevante capacidade biossintética de metabólitos secundários não ribossomais; cerca de 7,5 a 8,5% do genoma de *B. velezensis* FZB42 está associado a produção de policetídeos e de peptídeos bioativos (CHEN et al., 2009; FAN et al., 2018; KOUMOUTSI et al., 2004).

Alguns estudos evidenciam a presença de nove a 11 clusters gênicos responsáveis pela síntese desses compostos bioativos, tais como surfactina, fengicina, macrolactina, difidina e bacilomicina (CHEN et al., 2007, 2009). Semelhante ao descrito em *B. velezensis* FZB42, *Bacillus* sp. P45 apresentou oito clusters responsáveis pela produção desses compostos antimicrobianos sintetizados não-ribossomalmente. Para além disso, as análises de MALDI-TOF/MS realizadas por Koumoutsi e colaboradores (2007) revelaram dados similares aos obtidos em nosso estudo. Os autores observaram picos (m/z) de 1030,8, 1044,8 1046,8 e 1058,8 Da, identificando-os como pertencentes ao grupo de surfactina, e os picos (m/z) 1485,8,1487,8 1527,8 e 1529,8 Da foram atribuídos a família da fengicina.

A detecção desses picos, atribuídos à produção de surfactina e fengicina pela linhagem *Bacillus* sp. P45, é condizente com a presença, no genoma da bactéria, de dois *clusters* gênicos responsáveis pela síntese desses lipopeptídeos. Para a surfactina, foram identificadas as quatro ORFs da rota biossintética relacionadas à produção desse metabólito secundário, sendo elas SrfA-A, SrfA-B, SrfA-C e SrfA-D, com similaridades variando de 99% a 100% com as ORFs para a produção desse metabólito em linhagens de *B. velezensis*. Para a fengicina, foram identificadas as 5 ORFs (FenA, FenB, FenC, FenD e FenE), apresentando similaridades entre 96 e 99% com as sequências de aminoácidos das enzimas constituintes dessa rota biossintética em linhagens de *B. velezensis*.

Apesar de não ter sido detectado pelo algoritmo do AntiSmash, a busca manual por enzimas que atuam na rota biossintética da iturina, cujo pico foi identificado através da espectrometria de massas, revelou a existência de um cluster condizente com aquele relacionado à síntese desse lipopeptídeo, tendo sido identificadas as ORFs que codificam para uma malonil-CoA-transacilase, que seria ItuD; uma peptídeo-sintase que apresentou homologia com ItuA, e outras duas peptídeo-sintases cujas identidades não puderam ser confirmadas, mas cujas funções estão relacionadas à síntese de metabólitos secundários bacterianos. A semelhança estrutural entre diferentes lipopeptídeos, como aquela observada entre a micosubtilina e a iturina, que é refletida na homologia entre as ORFs presentes nesses dois operons, tende a dificultar a correta identificação da presença desses cluster gênicos através dos algoritmos para anotação automática, de forma que a análise manual de tais regiões não é dispensada pelos algoritmos de anotação automáticos (TSUGE et al., 2001).

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que *Bacillus* sp. P45 apresentou comportamento de crescimento semelhantes quando cultivados em ambos os substratos queratinosos, a farinha de pena e a pena.

Foi possível observar, no presente estudo, que os compostos sintetizados a partir do cultivo em MMFP e BHI foram capazes de inibir *L. monocytogenes* ATTC 7644, um micro-organismo patogênico, registrando-se valores de inibição de 3200 AU/mL em 24 h e 800AU/mL em 48 h, em BHI e MMFP, respectivamente. Entretanto em substrato contendo penas inteiras tal atividade não foi observada.

Atribuiu-se a quantidade de proteínas solúveis disponíveis no meio, a síntese desses compostos, uma vez que em farinha de pena a concentração proteica foi 83% superior em comparação ao cultivo em penas inteiras. Conclui-se que o processamento de penas em farinha de penas permite que as proteínas fiquem mais disponíveis para o crescimento do microrganismo, o que está relacionado à produção de compostos antimicrobianos.

A purificação parcial, espectrometria de massas e análises de sequenciamento e anotação genômica indicaram que dentre os compostos antimicrobianos sintetizados presentes nos cultivos em MMPF e BHI estão lipopeptídeos, pertencentes a família das surfactinas, iturinas e fengicinas. OS resultados indicam que a linhagem *Bacillus* sp. P45 assemelha-se a *B. velezensis* FZB42. Nesse sentido propõe-se uma nova identificação para a linhagem.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseados nos resultados desse trabalho é possível propor novos estudos a fim de proporcionar um melhor entendimento dos processos que envolvem a síntese de lipopeptídeos por *Bacillus* sp. P45 em substratos queratinosos. Com o objetivo de quantificar e reforçar os resultados de identificação e caracterização dos compostos antimicrobianos, estudos adicionais utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a determinação da concentração mínima inibitória, avaliação do rendimento proteico, e caracterização química detalhada de cada composto devem ser realizados.

Inicialmente essas análises estavam no escopo do projeto, entretanto diante da situação de emergência em saúde pública imposta pela COVID-19, nesse primeiro semestre de 2020, que envolve o isolamento social e a suspensão temporária das atividades acadêmicas presenciais, os experimentos em andamento foram interrompidos.

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, A. M. et al. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 311–318, 2018.

ABDEL-MOHSEIN, H. S. et al. Characterization and partial purification of a bacteriocin-like substance produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* H1 isolated from cow manure compost. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 2, p. 340–351, 2011.

ABDEL MONAIM, S. A. H. et al. Bacteria Hunt Bacteria through an Intriguing Cyclic Peptide. **ChemMedChem**, v. 14, n. 1, p. 24–51, 2019.

ABDHUL, K. et al. Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 800–806, 2015.

AL-HASSANI, S. O. R.; ABDUL-RAZZAK, F.; ALI, A. M. PURIFICATION OF KERATINASE FROM TRICHOPHYTON RUBRUM AND STUDY THE INHIBITORY EFFECT OF SOME AQUEOUS PLANTS EXTRACTS ON THE PURIFIED ENZYME GROWTH. **Plant Archives**, v. 19, p. 1861–1868, 2019.

ALIPOUR, H. et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 975–981, 2016.

ALY, M. M.; TORR, S. High Keratinase Production And Keratin Degradation By A Mutant Strain Kr II , Derived From *Streptomyces radiopugnans* Kr I2. **Journal of Applied Biological Sciences (JABS)**, v. 12, n. 2, p. 1–7, 2018.

AROKIYARAJ, S. et al. Optimizing the fermentation conditions and enhanced production of keratinase from *Bacillus cereus* isolated from halophilic environment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 378–381, 2019.

ARUNA, K.; SHAH, J.; BIRMOLE, R. Production and Partial Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus Tequilensis* Strains Csgab0139 Isolated from Spoilt Cottage Cheese. **International journal of applied biology an pharmaceutical technology**, v. 5, n. 3, p. 201–221, 2014.

AVCI, A.; ÇAĞRI-MEHMETOĞLU, A.; ARSLAN, D. Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella Typhimurium*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 265–270, 2017.

AYED, H. BEN et al. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1699–1707, 2014.

BACH, E. et al. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 102–107, 2011.

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

BAINDARA, P. et al. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2013.

BANERJEE, A. et al. Structural Characterization and Active Site Prediction of Bacterial Keratinase through Molecular Docking. **Journal of Bioinformatics**, v. 1,

n. November, p. 67–82, 2014.

BARMAN, N. C. et al. Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.

BARONE, J. R.; SCHMIDT, W. F.; LIEBNER, C. F. E. Thermally processed keratin films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 97, n. 4, p. 1644–1651, 2005.

BASIT, M. et al. Biosurfactants production potential of native strains of *Bacillus cereus* and their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 31, n. 1, p. 251–256, 2018.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254–260, 2017.

BEN AYED, H. et al. Identification and natural functions of cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 5, p. 536–544, 2017.

BENITEZ, L. B. et al. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 791–797, 2010.

BERNAL, C.; DIAZ, I.; COELLO, N. Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 445–450, 2006.

BHARI, R. et al. Bioconversion of chicken feathers by *Bacillus aerius* NSMk2: A potential approach in poultry waste management. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, n. May, p. 224–230, 2018.

BISWARO, L. S. et al. Antimicrobial peptides and nanotechnology, recent advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–14, 2018.

BLAKE, J. P.; DONALD, J. O. Alternatives for the Disposal of Poultry Carcasses. **Poultry Science**, v. 71, n. 7, p. 1130–1135, 1992.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BORGI, I.; GARGOURI, A. Investigations on a hyper-proteolytic mutant of *Beauveria bassiana*: Broad substrate specificity and high biotechnological potential of a serine protease. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 1, p. 23–31, 2014.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: Useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105–116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735–1750, 2010.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3–12, 2015.

CĂLIN, M. et al. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 101–112, 2017.

CALLEGARO, K. **Bioconversão microbiana de penas de frango como estratégia para a produção de hidrolisados proteicos bioativos**. [s.l.] Universidade Federal da Fronteira Sul, 2018.

CALLEGARO, K.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. **Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates** Waste Management Elsevier Ltd, , 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.040>>

CALLEGARO, K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, n. August, p. 1–9, 2018.

CHAUDHARI, P. N.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Iron containing keratinolytic metallo-protease produced by *Chryseobacterium gleum*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 144–151, 2013.

CHEN, L. et al. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8822–8827, 2010.

CHEN, X. H. et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1007–1014, 2007.

CHEN, X. H. et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, v. 140, n. 1–2, p. 27–37, 2009.

CHENG, A. C. et al. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 270–279, 2017.

CHOUDHARY, R. B.; JANA, A. K.; JHA, M. K. Enzyme technology applications in leather processing. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 11, n. 5, p. 659–671, 2004.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, p. 4–31, 2016.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. DE; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.

CORNFORTH, D. M.; FOSTER, K. R. Competition sensing: The social side of bacterial stress responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 285–293, 2013.

CORNISH-BOWDEN, A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, p. 74–87, 2014.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1–6, 2010.

DA GIOPPO, N. M. R. et al. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 705–711, 2009.

DANESH, A.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Production of haloduracin by *Bacillus halodurans* using solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 7, p. 1339–1344, 2011.

DAROIT, D. J. **POTENCIAL QUERATINOLÍTICO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUERATINASE EXTRACELULAR DE *Bacillus* sp. P45**. [s.l: s.n.].

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 372–384, 2014.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential

of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DE FRANÇA, Í. W. L. et al. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10–15, 2015.

DE OLIVEIRA, C. T. et al. Screening of Bacteria for Protease Production and Feather Degradation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 3, p. 447–453, 2016.

DE PAIVA, D. P. et al. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1266 enhanced by whole-cell mutagenesis. **3 Biotech**, v. 9, n. 1, p. 0, 2019.

DELEU, M. et al. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 801–815, 2013.

DEY, G. et al. Microbial amphiphiles: A class of promising new-generation anticancer agents. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 136–146, 2015.

DIVYASHREE, M. et al. Clinical Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): Where do we Stand Now? **Protein & Peptide Letters**, v. 27, n. 2, p. 120–134, 2019.

DONG, Y. Z.; CHANG, W. S.; CHEN, P. T. Characterization and overexpression of a novel keratinase from *Bacillus polyfermenticus* B4 in recombinant *Bacillus subtilis*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2017.

DORRA, G. et al. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 342–351, 2018.

EGAN, K. et al. **Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems?** **Frontiers in Microbiology**, 2016.

EISELE, T. et al. Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 3, p. 483–490, 2013.

EL-GHONEMY, D. H.; ALI, T. H. Optimization of physico-chemical parameters for hyper keratinase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 using chicken feather as substrate-management of biowaste. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 9, p. 171–178, 2017.

ELÍADES, L. et al. Screening for alkaline keratinolytic activity in fungi isolated from soils of the biosphere reserve “Parque Costero del Sur” (Argentina). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 2105–2111, 2010.

ESLAHI, N. et al. Application of extracted feather protein to improve the shrink resistance of wool fabric. **Journal of Industrial Textiles**, v. 44, n. 6, p. 835–848, 2015.

FAKHFAKH-ZOUARI, N. et al. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 617–626, 2010.

FAKHFAKH, N. et al. Wool-waste valorization: Production of protein hydrolysate with high antioxidative potential by fermentation with a new keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 424–433, 2013.

FAN, B. et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018 : The Gram-Positive Model

Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. v. 9, n. October, p. 1–14, 2018.

FAN, H. et al. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1973, 2017.

FARZANEH, M. et al. Inhibition of the *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 contamination on pistachio nut by fengycin and surfactin-producing *Bacillus subtilis* UTBSP1. **Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 3, p. 209–215, 2016.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. [s.l.: s.n.].

FERRAREZE, P. A. G.; CORREA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 102–109, 2016.

FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTÉ-LHOUELLIER, V. **The “sisters” α -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of application** **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.006>>

FONTOURA, R. et al. Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. **New Biotechnology**, v. 49, n. March 2018, p. 71–76, 2019.

FRASER, R. D. B.; PARRY, D. A. D. Molecular packing in the feather keratin filament. **Journal of Structural Biology**, v. 162, n. 1, p. 1–13, 2008.

FUKE, P. et al. In silico characterization of broad range proteases produced by *Serratia marcescens* EGD-HP20. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 492–500, 2018.

GEGECKAS, A. et al. Characterization and application of keratinolytic peptidases from *Bacillus* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1206–1213, 2018.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp**. [s.l.: s.n.].

GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M. et al. Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 114–122, 2017.

GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Antifungal and aflatoxin-reducing activity of extracellular compounds produced by soil *Bacillus* strains with potential application in agriculture. **Food Control**, v. 85, p. 392–399, 2018.

GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological aspects and perspective of microbial Keratinase production. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

GRADISAR, H. et al. Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of Keratinases of. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 3420–3426, 2005.

GRAZZIOTIN, A. et al. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 1–2, p. 135–144, 2006.

GRAZZIOTIN, A. et al. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3172–3175, 2007.

GUDIÑA, E. J. et al. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–675, 2013.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and

properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–395, 2002.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21–33, 2006.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

GWYTHYER, C. L. et al. **The environmental and biosecurity characteristics of livestock carcass disposal methods: A review** *Waste Management* Elsevier Ltd, , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2010.12.005>>

HAMICHE, S. et al. 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**, v. 122, p. 758–769, 2019.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HANCOCK, R. E. W.; HANEY, E. F.; GILL, E. E. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 5, p. 321–334, 2016.

HANCOCK, R. E. W.; PATRZYKAT, A. Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides : From Natural to Novel Antibiotics. n. 604, p. 79–83, 2002.

HEGEDÜS, N.; MARX, F. **Antifungal proteins: More than antimicrobials?** *Fungal Biology Reviews*, 2013.

HENKEL, M.; HAUSMANN, R. **Diversity and Classification of Microbial Surfactants**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

HENTATI, D. et al. Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, n. October 2018, p. 441–449, 2019.

HORNG, Y. B. et al. Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 188, 2019.

HUANG, Y. et al. Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9635–9649, 2015.

HWANG, P. M.; VOGEL, H. J. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 76, n. 2–3, p. 235–246, 1998.

IONATA, E. et al. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. *pennavorans* bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 105–112, 2006.

JAGADEESAN, Y. et al. Sustainable production, biochemical and molecular characterization of thermo-and-solvent stable alkaline serine keratinase from novel *Bacillus pumilus* AR57 for promising poultry solid waste management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 135–146, 2020.

JANG, E.-Y. et al. Improved biosynthesis of silver nanoparticles using keratinase from *Stenotrophomonas maltophilia* R13: reaction optimization, structural characterization, and biomedical activity. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 3, p. 381–393, 2017.

JAOUADI, N. Z. et al. The Attractive Proprieties of the Keratinase KERQ7 from *Bacillus Tequilensis* Strain Q7 with Promising Potential for the Leather Bating Process. In: **Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration**. [s.l.: s.n.]. p. 137–139.

JARDINE, J. L. et al. Screening of potential bioremediation enzymes from hot spring bacteria using conventional plate assays and liquid chromatography - Tandem mass spectrometry (Lc-Ms/Ms). **Journal of Environmental Management**, v. 223, n. June, p. 787–796, 2018.

JEMIL, N. et al. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1060, n. February, p. 374–386, 2017.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIANG, J. et al. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2016.

KALAI-GRAMI, L. et al. Production and identification of iturin A lipopeptide from *Bacillus methylotrophicus* TEB1 for control of *Phoma tracheiphila*. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 8, p. 864–871, 2016.

KANG, E. et al. Identification of keratinases from *Fervidobacterium islandicum* AW-1 using dynamic gene expression profiling. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 442–457, 2020.

KANG, H. K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 2017.

KIM, P. IL et al. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138–145, 2010.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1689–1701, 2011.

KOSTRZEWA, M.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Microbiology. **MALDI-TOF Mass Spectrometry in Microbiology**, 2016.

KOUMOUTSI, A. et al. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus*. v. 186, n. 4, p. 1084–1096, 2004.

KOUMOUTSI, A. et al. DegU and YczE Positively Regulate the Synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42 □ †. v. 73, n. 21, p. 6953–6964, 2007.

KSHETRI, P. et al. Transforming Chicken Feather Waste into Feather Protein Hydrolysate Using a Newly Isolated Multifaceted Keratinolytic Bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

LABA, W. et al. Keratinolytic abilities of *Micrococcus luteus* from poultry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 691–700, 2015.

LACOU, L. et al. An in silico approach to highlight relationships between a techno-functional property of a dairy matrix and a peptide profile. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 475, n. 1, p. 44–54, 2015.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P. K. Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2083–2096, 2016.

LEE, T.-H.; N. HALL, K.; AGUILAR, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 2016.

LEMES, A. C. **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUERATINASE DE *Bacillus* sp. P45 A PARTIR DE COPRODUTOS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS CREMOSOS ENRIQUECIDOS COM CHIA E QUINOA.** [s.l: s.n.].

LEMES, A. C. et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 217–224, 2016.

LI, Y. et al. A new approach for quantitative characterization of hydrolytic action of proteases to elastin in leather manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 24, p. 10485–10494, 2018.

LIPPOLIS, R. et al. Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains. **Proteome Science**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

LIU, Z. et al. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 231–235, 2008.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. **Bacillus.** [s.l: s.n.].

LOWRY; RANDALL, R. J.; LEWIS, A. Méthode de Lowry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MACHADO, A. R. G. et al. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 621–627, 2016.

MACHADO, G. S. **Farinha de penas hidrolisadas por micro-organismos como ingrediente alternativo em dietas para cães adultos.** [s.l: s.n.].

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 194, 2016.

MARATHE, S. K. et al. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 39–46, 2018.

MARCONDES, N. R. et al. New Feather-Degrading Filamentous Fungi. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 1, p. 13–17, 2008.

MATHIAS, T. R. DOS S. et al. Influence of mashing profile curve and addition of proteases on the composition of the wort and beer. **MOJ Food Processing & Technology**, v. 5, n. 2, p. 282–286, 2017.

MATHUR, H. et al. Bacteriocin-antimicrobial synergy: A medical and food perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–18, 2017.

MATSUI, T. et al. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 941–950, 2009.

MATSUZAKI, K. **Antimicrobial peptides: basics for clinical application.** [s.l: s.n.].

MAZOTTO, A. M. et al. Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. **Enzyme**

Research, v. 13, n. 11, p. 1–11, 2011.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

MEENA, K. R.; SHARMA, A.; KANWAR, S. S. Antitumoral and Antimicrobial Activity of Surfactin Extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 423–433, 2020.

MERGAERT, P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 4, p. 336–356, 2018.

MIHALACHE, G. et al. Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29784–29793, 2018.

MITCHELL, C. A. et al. Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains. **Biochemistry**, v. 51, n. 15, p. 3252–3263, 2012.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Biopolymers**, v. 104, n. 3, p. 129–147, 2015.

MOHAMAD, N.; PHANG, L. Y.; ABD-AZIZ, S. Optimization of metallo-keratinase production by *Pseudomonas* sp. LM19 as a potential enzyme for feather waste conversion. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 1, p. 41–50, 2017.

MOJSOSKA, B.; ZUCKERMANN, R. N.; JENSSEN, H. Structure-activity relationship study of novel peptoids that mimic the structure of antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4112–4120, 2015.

MOKREJS, P. et al. The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 16, n. 4, p. e21–e27, 2017.

MOSQUERA, M. et al. Antioxidant, ACE-Inhibitory, and Antimicrobial Activities of Peptide Fractions Obtained From Dried Giant Squid Tunics. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, n. 3, p. 444–455, 2016.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63–70, 2002.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 641–646, 2008.

MOTTA, A. S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 307–310, 2004.

MÓTYÁN, J.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923–942, 2013.

MUKHTAR, S. et al. Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 10, n. 12, p. 316–319, 2017.

MULLIS, M. M. et al. Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. November, 2019.

NAGAL, S.; JAIN, P. C. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 196–200, 2010.

NARAYANAPP, V.; NARAYANAPP, V.; MARISWAMY, M. Production and Purification of Keratinase Enzyme from *Serratia* sp. Isolated from Poultry Wastes. **Journal of Applied Sciences**, v. 19, n. 8, p. 789–796, 2019.

NAVONE, L.; SPEIGHT, R. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–21, 2018.

NURDIAWATI, A. et al. Characterization of potential liquid fertilizers obtained by hydrothermal treatment of chicken feathers. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 37, n. 1, p. 375–382, 2018.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

ONIFADE, A. A. et al. **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*, 1998.

PACHECO, G. F. E. et al. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 6, p. 288–294, 2016.

PARRADO, J. et al. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 1–7, 2014.

PATEL, S.; AHMED, S.; ESWARI, J. S. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1177–1193, 2015.

PAWAR, V. A. et al. Molecular and biochemical characterization of a thermostable keratinase from *Bacillus altitudinis* RBDV1. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 2–8, 2018.

PEREIRA, J. Q. et al. A new cold-adapted serine peptidase from Antarctic *Lysobacter* sp. A03: Insights about enzyme activity at low temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 854–862, 2017.

PEREZ, K. J. **CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E SURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp. ISOLADOS DE PUBA.** [s.l: s.n.].

PEREZ, K. J. et al. *Bacillus* spp . Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. v. 8, n. January, p. 1–14, 2017.

PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 643–650, 2008.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 625–633, 2010.

PRECZESKI, K. P. et al. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. February, p. 1–8, 2020.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, 2004.

REDDY, M. R. et al. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. **Bioresource**

Technology, v. 243, p. 254–263, 2017.

REGMI, S. et al. Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 127–138, 2017.

REQUE, P. M. et al. Biological activities of wheat middlings bioprocessed with *Bacillus* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 525–531, 2017.

RIAZI, S. et al. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1370–1377, 2009.

RIEGER, T. J. et al. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, n. 3, p. 329–335, 2017.

RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 4, p. 258–265, 2003.

RILEY, M. A. MOLECULAR MECHANISMS OF Producing antimicrobial compounds seems to be a generic phenomenon for. **Annu. Rev. Genet.**, v. 32, p. 255–78, 1998.

RIZK, N. M. H.; ELDOURGHAMY, A. S.; ELGAMAL, E. G. Bioremediation of some agricultural wastes by *Bacillus*. **Research Journal of Applied Biotechnology (RJAB)**, v. 3, p. 11–22, 2017.

ROMRUEN, U.; GONZALEZ, J. M.; KANOKSILAPATHAM, W. **Identification of a Putative Keratinase Gene and Analysis of a Peptidase S8 Family from a Hyperthermophilic Isolate, *Fervidobacterium* sp. Strain FC2004 in Thailand**. The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. **Anais...2016**

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Applications, Current. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 1, p. 1–14, 2011.

SAINI, R.; SAINI, H. S.; DAHIYA, A. Amylases: Characteristics and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 1865–1871, 2017.

SALGADO, J. M. et al. Combined bioremediation and enzyme production by *Aspergillus* sp. in olive mill and winery wastewaters. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 110, p. 16–23, 2016.

SANDER, J. E.; WARBINGTON, M. C.; MYERS, L. M. Selected methods of animal carcass disposal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 7, p. 1003–1005, 2002.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 735–743, 2000.

SANGHVI, G. et al. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 256–262, 2016.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1523–1538, 2011.

SARMIENTO, F.; PERALTA, R.; BLAMEY, J. M. Cold and hot extremozymes: Industrial relevance and current trends. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. OCT, 2015.

SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D. Standardization in enzymology—Data integration in the world's enzyme information system BRENDA.

Perspectives in Science, v. 1, n. 1–6, p. 15–23, 2014.

SCHUBERT, S.; KOSTRZEWA, M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: Current trends. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 23, p. 17–20, 2017.

SHAH, M.; VAIDYA, R. Partial characterization of keratinase from *Stenotrophomonas maltophilia* K279a and study of its dehairing potential. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 95–110, 2017.

SHAH, N. et al. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 5–10, 2016.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016.

SHARMA, K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, 2017.

SHAVANDI, A. et al. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. **Food Chemistry**, v. 227, p. 194–201, 2017.

SHOEB, E. et al. Classification and Industrial Applications of Biosurfactants. **Part-I: Natural and Applied Sciences ISSN-L:**, v. 4, n. 3, p. 243–252, 2013.

SINGH, R. et al. Microbial Proteases in Commercial Applications Rajendra. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, n. November, p. 365–374, 2016.

SINHORINI, M. R. **Processo De Produção De Farinha De Penas Hidrolisadas: Estudos De Otimização Do Teor Protéico E Do Valor De Digestibilidade Da Proteína**. [s.l: s.n.].

SIRTORI, L. R. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. P45**. [s.l: s.n.].

SLIMENE, I. BEN et al. Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 5, p. 388–397, 2012.

SOBRINHO, H. B. . et al. Biosurfactants: Classification, Properties and Environmental Applications. **Recent developments in biotechnology**, v. 11, n. 14, p. 1–29, 2013.

SONENSHEIN, A. L. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 203–207, 2005.

SOUZA, F. DA R. DE. **Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e enzimáticos**. [s.l: s.n.].

SRILAKSHMI, J. et al. Commercial Potential of Fungal Protease : Past , Present and Future Prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. February, p. 218–234, 2015.

SRIVASTAVA, B. et al. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 252, p. 119847, 2020.

STINCONE, P. et al. Diversity of cyclic antimicrobial lipopeptides from *Bacillus* P34 revealed by functional annotation and comparative genome analysis. **Microbiological Research**, v. 238, n. June, p. 126515, 2020.

SUMI, C. D. et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era

for antibiotics. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 93–103, 2015.

SUN, S. W. et al. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2–3, p. 112–117, 2006.

SUNADA, N. DA S. et al. Compostagem de resíduo sólido de abatedouro avícola. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 178–183, 2014.

SZABÓ, I. et al. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 253–255, 2000.

THAKUR, N. et al. Proteases: Industrial Applications and Approaches used in Strain Improvement. **Biological Forum – An International Journal**, v. 10, p. 158–167, 2018.

TIAN, J. et al. High-expression keratinase by *Bacillus subtilis* SCK6 for enzymatic dehairing of goatskins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 119–126, 2019.

TORRES, M. J. et al. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research**, v. 182, p. 31–39, 2016.

TRABELSI, S. et al. The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1–13, 2019.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–6, 2015.

VASILCHENKO, A. S.; VALYSHEV, A. V. Pore-forming bacteriocins: structural–functional relationships. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 2, p. 147–154, 2019.

VATER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.

VELHO, R. V. et al. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 4, p. 297–303, 2011.

VERAS, F. F. et al. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 23–32, 2016.

VERMA, A. et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 476–491, 2017.

VIDMAR, B.; VODOVNIK, M. Microbial keratinases: Enzymes with promising biotechnological applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 312–328, 2018.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2014.

VILLA, A. L. V. et al. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: Effect on hair fiber. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2013.

VOIGT, B. et al. The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. **Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 413–423, 2007.

VOLLENBROICH, D. et al. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 44–49, 1997.

WANG, B. et al. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, p. 229–318, 2016.

WANG, T. et al. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 744–754, 2015.

WERLANG, P. O.; BRANDELLI, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 120, n. 1, p. 71–79, 2005.

XIE, F. et al. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 344–350, 2010.

YADAV, A. K. et al. Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 85, n. 1, p. 56–62, 2016.

YUAN, L. et al. Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses. **Journal of Virology**, v. 92, n. 21, p. 1–19, 2018.

YUAN, L. et al. Synthetic surfactin analogues have improved anti-PEDV properties. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–14, 2019.

ZHAO, H. et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5951–5960, 2017.

ZHAO, P. et al. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. **Peptides**, v. 101, n. December 2017, p. 10–16, 2018.

ZHAO, X.; KUIPERS, O. P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2016.

ZHU, G. Y. et al. Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids in subcritical water. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 88, n. 2, p. 187–191, 2010.

10. APÊNDICE

Tabela 3 Análise estatística da quantificação de proteínas solúveis no cultivo de *Bacillus* sp. P45 em BHI.

Tempo (horas)	Média	Coeficiente de variação (%)
0	12,960 ± 0,734 ^a	5,67
4	13,946 ± 0,411 ^a	2,95
8	13,846 ± 0,781 ^a	5,64
24	13,322 ± 0,582 ^a	4,37
32	12,526 ± 0,370 ^a	2,95
48	10,809 ± 0,524 ^b	4,85
56	10,544 ± 0,372 ^{bc}	3,53
72	9,121 ± 0,474 ^c	5,19

Legendas: Valores das médias ± desvios padrão (n=3). ^{a,b,c} diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 4 Análise estatística da quantificação de proteínas solúveis no cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMFP.

Tempo (horas)	Média	Coeficiente de variação (%)
0	1,364 ± 0,070 ^d	5,12
4	1,484 ± 0,138 ^d	9,30
8	2,247 ± 0,187 ^{bc}	8,31
24	1,610 ± 0,113 ^{cd}	7,08
32	2,493 ± 0,172 ^b	6,91
48	4,784 ± 0,458 ^a	9,51
56	5,319 ± 0,305 ^a	5,74
72	5,153 ± 0,319 ^a	6,19

Legenda: Valores das médias ± desvios padrão (n=3). ^{a,b,c,d} diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 5 Análise estatística da quantificação de proteínas solúveis no cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMP.

Tempo (horas)	Média	Coeficiente de variação (%)
0	0,051 ± 0,005 ^a	9,24
4	0,068 ± 0,005 ^a	6,97
8	0,054 ± 0,004 ^a	7,23
24	0,151 ± 0,002 ^a	1,11
32	0,290 ± 0,022 ^a	7,57
48	0,504 ± 0,048 ^b	9,46
56	0,590 ± 0,015 ^{bc}	2,56
72	0,880 ± 0,016 ^c	1,79

Legendas: Valores das médias ± desvios padrão (n=3). ^{a,b,c} diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 6 Análise estatística da quantificação de aminoácidos livres no cultivo de *Bacillus* sp. P45 em BHI.

Tempo (horas)	Média	Coeficiente de variação (%)
0	13,083 ± 0,268 ^c	2,05
4	11,793 ± 0,074 ^{de}	0,63
8	12,180 ± 0,197 ^d	1,62
24	11,406 ± 0,197 ^e	1,73
32	12,653 ± 0,197 ^{cd}	1,56
48	13,341 ± 0,074 ^c	0,56
56	14,759 ± 0,372 ^b	2,52
72	15,748 ± 0,372 ^a	2,36

Legendas: Valores das médias ± desvios padrão (n=3). ^{a,b,c,d,e} diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 7 Análise estatística da quantificação de aminoácidos livres no cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMFP.

Tempo (horas)	Média	Coeficiente de variação (%)
0	1,009 ± 0,047 ^d	4,68
4	1,004 ± 0,094 ^d	9,35
8	0,980 ± 0,031 ^d	3,20
24	1,082 ± 0,071 ^d	6,58
32	1,939 ± 0,168 ^c	8,66
48	2,283 ± 0,176 ^b	7,72
56	2,764 ± 0,155 ^a	5,60
72	2,899 ± 0,071 ^a	2,46

Legendas: Valores das médias ± desvios padrão (n=3). ^{a,b,c,d} diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 8 Análise estatística da quantificação de aminoácidos livres no cultivo de *Bacillus* sp. P45 em MMP.

Tempo (horas)	Média	Coeficiente de variação (%)
0	1,472 ± 0,013 ^c	0,88
4	1,712 ± 0,041 ^{bc}	2,42
8	1,760 ± 0,117 ^{bc}	6,65
24	1,923 ± 0,136 ^b	7,07
32	1,917 ± 0,119 ^b	6,19
48	1,704 ± 0,161 ^{bc}	9,45
56	2,448 ± 0,110 ^a	4,48
72	2,267 ± 0,122 ^a	5,38

Legendas: Valores das médias ± desvios padrão (n=3). ^{a,b,c,d} diferenças significativas quando $p < 0,05$.