

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CERRO LARGO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS**  
**SUSTENTÁVEIS**

**KELLY CALLEGARO**

**BIOCONVERSÃO MICROBIANA DE PENAS DE FRANGO COMO ESTRATÉGIA**  
**PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS BIOATIVOS**

**CERRO LARGO**  
**2018**

**KELLY CALLEGARO**

**BIOCONVERSÃO MICROBIANA DE PENAS DE FRANGO COMO ESTRATÉGIA  
PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS BIOATIVOS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

**CERRO LARGO**

**2018**

CALLEGARO, KELLY

Bioconversão microbiana de penas de frango como estratégia para produção de hidrolisados proteicos bioativos / KELLY CALLEGARO. -- 2018.

83 f. ; il.

Orientador: DANIEL JONER DAROIT.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Mestrado em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis - PPGATS, Cerro Largo, RS, 2018.

1. Subprodutos agroindustriais. 2. Cultivos submersos. 3. Capacidade antioxidante. 4. Atividade antihipertensiva. 5. Atividade antidiabética. I. DAROIT, DANIEL JONER, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

**KELLY CALLEGARO**

**BIOCONVERSÃO MICROBIANA DE PENAS DE FRANGO COMO ESTRATÉGIA  
PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS BIOATIVOS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

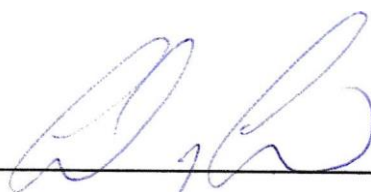
Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 13/07/2018

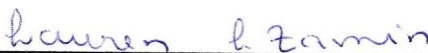
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS



Profa. Dra. Helen Treichel - UFFS



Profa. Dra. Lauren Lúcia Zamin - UFFS

## AGRADECIMENTOS

A meu orientador, Professor Doutor Daniel Joner Daroit, pela oportunidade inestimável de trabalhar ao seu lado. Agradeço imensamente por toda confiança, paciência, dedicação e apoio em todas as etapas deste trabalho, e por seus exemplos de generosidade e comprometimento em fazer ciência, sendo um modelo de docente pesquisador a ser seguido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa (DS-CAPES) concedida durante o primeiro ano do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela verba de custeio concedida a projeto do orientador e que possibilitou esta pesquisa.

À coordenação, funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS), em especial, ao Professor Doutor Diego Ricieri Manenti (*in memoriam*), primeiro coordenador do Programa, pelos exemplos de dedicação e valiosos ensinamentos.

Aos colegas do PPGATS, pelo convívio enriquecedor, pelos momentos de aprendizagem e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia, pela receptividade, torcida e amizade.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por proporcionar o acesso à qualificação profissional.

Aos meus pais, Ademir e Ivone, pela educação, compreensão, amor e apoio incondicional. Ao meu irmão, Adonis, pelo carinho, amizade e constante incentivo. Vocês são meus exemplos de vida e a base do meu crescimento.

Ao meu namorado, Ernane, pelo companheirismo, carinho e incentivo nesta caminhada.

## RESUMO

Penas são subprodutos ricos em proteínas recalcitrantes denominadas queratinas, gerados em elevadas quantidades pela agroindústria avícola. Há demanda crescente por métodos econômicos e ecologicamente adequados para o manejo de penas. A bioconversão microbiana vem sendo investigada como uma estratégia promissora para a reciclagem de penas, visto que, concomitantemente à degradação destes materiais queratinosos, o bioprocessamento pode resultar em produtos de valor agregado. A obtenção de hidrolisados proteicos desperta particular interesse científico e tecnológico visto que proteínas podem ser precursoras de peptídeos com atividades biológicas. Apenas recentemente o potencial bioativo de hidrolisados de penas/queratina vem sendo descrito. Neste estudo foram avaliadas a degradação de penas, produção de proteases e as bioatividades dos hidrolisados de pena (FHs) produzidos através de cultivos submersos com as bactérias queratinolíticas *Bacillus* sp. CL18, *Bacillus* sp. CL33A e *Bacillus* sp. CL14. Em caldo pena (10 g/L de penas), *Bacillus* sp. CL18 produziu maior atividade proteolítica, degradando as penas de forma mais eficiente, sendo que os FHs resultantes apresentaram elevadas atividades antioxidantes. Com o aumento da concentração de penas no meio de cultura (10 a 50 g/L), *Bacillus* sp. CL18 produziu maior atividade proteolítica após cinco dias de cultivo em meio contendo 30 g/L de penas e o conteúdo mais elevado de proteína solúvel foi detectado (9,02 mg/mL) após cinco dias de cultivo em meio com 40 g/L de penas. Os FHs apresentaram atividades antioxidantes, mensuradas através da eliminação dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS), habilidade de quelar  $Fe^{2+}$  e poder redutor. Atividades antihipertensiva e antidiabética, *in vitro*, também foram demonstradas, através da inibição das atividades da enzima conversora de angiotensina-I (ACE) e da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV), respectivamente. O FH obtido através de cultivo de *Bacillus* sp. CL18 em caldo pena (40 g/L de penas) por cinco dias, e posteriormente liofilizado, apresentou concentrações efetivas/inibitórias médias de 5,39 mg/mL, 15,12 mg/mL, 10,50 mg/mL, 1,61 mg/mL e 1,52 mg/mL nos ensaios ABTS, DPPH, quelação de  $Fe^{2+}$ , inibição da ACE e DPP IV, respectivamente. A produção de proteases, com potenciais aplicações em biocatálise, e a obtenção de hidrolisados proteicos bioativos, indicam a conversão microbiana como uma tecnologia apropriada e ecologicamente amigável para o aproveitamento e valorização de penas.

Palavras-chave: Subprodutos agroindustriais. Cultivos submersos. Capacidade antioxidante. Atividade antihipertensiva. Atividade antidiabética.

## ABSTRACT

Feathers are by-products rich in recalcitrant proteins named keratins, generated in enormous amounts by the poultry industry. There is an increasing demand for economic and ecologically appropriate methods for feathers management. Microbial bioconversion has been investigated as a promising strategy for the recycling of feathers, since, along with the degradation of these keratinous materials, bioprocessing can result into added-value products. Production of protein hydrolysates is of particular scientific and technological interest since proteins can be precursors of peptides with biological activities. Only recently the bioactive potential of feather/keratin hydrolysates has been described. This study evaluated feather degradation, protease production and bioactivities of feather hydrolysates (FH) produced through submerged cultivations with the keratinolytic bacteria *Bacillus* sp. CL18, *Bacillus* sp. CL33A and *Bacillus* sp. CL14. In feather broth (10 g/L of feathers), *Bacillus* sp. CL18 produced greater proteolytic activity, degrading the feathers more efficiently, and the resulting FHs showed high antioxidant activities. With increasing feather concentration in the culture medium (10 to 50 g/L), *Bacillus* sp. CL18 produced higher proteolytic activity after five days of cultivation in medium containing 30 g/L of feathers, and the highest soluble protein content was detected (9.02 mg/mL) after five days of cultivation in medium with 40 g/L of feathers. The FHs displayed antioxidant activities, measured by the scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radicals, Fe<sup>2+</sup>-chelating ability, and reducing power. Antihypertensive and antidiabetic activities, *in vitro*, were also demonstrated by inhibition of angiotensin-I converting enzyme (ACE) and the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), respectively. FH obtained through cultivation of *Bacillus* sp. CL18 in feather broth (40 g/L of feathers) for five days, and subsequently lyophilized, presented half-maximal effective/inhibitory concentrations of 5.39 mg/mL, 15.12 mg/mL, 10.50 mg/mL, 61 mg/mL and 1.52 mg/mL in the ABTS, DPPH, Fe<sup>2+</sup>-chelating, ACE- and DPP IV-inhibitory assays, respectively. Production of microbial proteases with potential applications in biocatalysis, and of bioactive protein hydrolysates, indicates microbial conversion as an appropriate and eco-friendly technology for feathers reclamation and valorization.

Keywords: Agro-industrial by-products. Submerged cultivation. Antioxidant capacity. Antihypertensive activity. Antidiabetic activity.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Hidrólise de materiais queratinosos e potenciais aplicações dos hidrolisados obtidos.....	20
Tabela 2 - Hidrolisados e peptídeos bioativos obtidos a partir de materiais queratinosos.....	37



## LISTA DE FIGURAS

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### RESULTADOS I

- Figure 1 - Feather degradation, release of soluble protein, and antioxidant potentials of feather hydrolysates produced by *Bacillus* sp. CL18, *Bacillus* sp. CL33A, and *Bacillus* sp. CL14 during submerged cultivations in feather broth (10 g/L of feathers) 47
- Figure 2 - Feather degradation, medium pH, and release of soluble proteins during submerged cultivations with *Bacillus* sp. CL18 in feather broth with different feather concentrations ..... 50
- Figure 3 - Antioxidant potential of feather hydrolysates, as evaluated through scavenging of DPPH radical, scavenging of ABTS radical, Fe<sup>2+</sup>-chelating ability, and reducing power ..... 51
- Figure 4 - Inhibition of DPP IV and ACE activities by feather hydrolysates (FH) ..... 54
- Figure 5 - Antioxidant, ACE- and DPP IV-inhibitory activities as a function of feather hydrolysate concentration ..... 56

#### RESULTADOS II

- Figura 1 - Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 (a), *Bacillus* sp. CL33A (b) e *Bacillus* sp. CL14 (c), em cultivos submersos realizados em caldo pena contendo 10 g/L de penas de frango ..... 66
- Figura 2 - Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 durante cultivos submersos em caldo pena contendo diferentes concentrações de penas de frango ..... 67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1 QUERATINAS .....	12
2.2 PENAS DE FRANGO: RESÍDUOS OU MATÉRIAS-PRIMAS? .....	13
2.3 DEGRADAÇÃO MICROBIANA DE PENAS .....	15
2.4 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DERIVADOS DE MATERIAIS QUERATINOSOS .....	17
2.5 RELEVÂNCIA E APLICAÇÕES DE HIDROLISADOS DERIVADOS DE MATERIAIS QUERATINOSOS .....	19
<b>2.5.1 Uso como fertilizantes agrícolas</b> .....	19
<b>2.5.2 Hidrolisados como ingredientes de rações</b> .....	24
<b>2.5.3 Usos como fonte de nitrogênio em cultivos microbianos</b> .....	25
<b>2.5.4 Produção de biocombustíveis</b> .....	26
<b>2.5.5 Cuidado capilar e da pele</b> .....	26
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLISADOS PROTEICOS .....	27
<b>2.6.1 Generalidades e bioatividades</b> .....	27
2.6.1.1 Potencial antioxidante .....	28
2.6.1.2 Potencial antidiabético .....	31
2.6.1.3 Potencial antihipertensivo .....	34
<b>2.6.2 Hidrolisados proteicos bioativos derivados de materiais queratinosos</b> .....	35
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
3.1 RESULTADOS I .....	40
3.2 RESULTADOS II .....	65
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

A produção avícola se encontra em franca expansão, em resposta ao aumento do consumo da carne de aves. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, sendo o maior exportador. A região Sul do Brasil é responsável por mais de 60% do abate de frangos no país (IBGE, 2018). Os fatores que alçaram o país a esta proeminente posição estão relacionados à abundância de território, solos férteis para produção de alimento para as aves, investimentos e esforços em pesquisa e desenvolvimento, entre outros (NÄÄS et al., 2015). Este cenário promissor para a economia vem acompanhado de preocupações ambientais, tendo em vista a dependência de recursos naturais e a geração inevitável de enormes quantidades de resíduos e subprodutos. Neste sentido, o desenvolvimento sustentável da agroindústria avícola é desafio de elevada complexidade (HU et al., 2017).

Dentre os subprodutos derivados do processamento de aves para obtenção de carne, se destacam as penas. Em um abatedouro com capacidade média de abate de 165 mil aves por dia, 18,5 toneladas de penas são geradas diariamente (IPEA, 2012). O manejo destes subprodutos torna-se problemático, pois são materiais compostos basicamente por queratinas, proteínas fibrosas e resistentes que conferem às penas caráter de elevada recalcitrância (GUPTA; RAMNANI, 2006).

Diferentes estratégias são investigadas para reciclagem das penas, visando evitar a incineração, que demanda elevados aportes energéticos, ou o descarte no ambiente, sendo que a degradação anaeróbia das penas pode resultar na liberação de substâncias tóxicas (DAROIT; BRANDELLI, 2014). O alto teor de proteína das penas (90%, m/m) indica que estes subprodutos são potencialmente úteis para a produção de hidrolisados proteicos (LASEKAN et al., 2013), caracterizados como misturas complexas de peptídeos e aminoácidos resultantes da clivagem de ligações peptídicas em proteínas (HOU et al., 2017).

Como as penas/queratinas não são usualmente hidrolisadas por enzimas proteolíticas comuns (como pepsina, tripsina, papaína), e proteases específicas (queratinases) são escassas no mercado de enzimas (GUPTA et al., 2013a;b), hidrolisados de penas são tipicamente produzidos por métodos termoquímicos ou microbianos (BRANDELLI et al., 2015a). A hidrólise microbiana de penas baseia-se crescimento de microrganismos queratinolíticos e na secreção de proteases que atuam sobre o substrato proteico. Diversos são os microrganismos, capazes de

efetivamente decompor proteínas recalcitrantes, que vêm sendo isolados a partir das mais variadas condições ambientais e ecológicas (GUPTA; RAMNANI, 2006).

Hidrolisados de penas derivados de hidrólise microbiana são postulados como fertilizantes nitrogenados (CAO et al., 2012; PAUL et al., 2013; JAIN et al., 2016), ingredientes de ração animal (BERTSCH; COELLO, 2005; GRAZZIOTIN et al., 2006, 2008; FAKHFAKH et al., 2012), substratos orgânicos para meios para cultivos microbianos (RAMAKRISHNAN et al., 2011; STIBOROVA et al., 2016), e como ingredientes em cosméticos (CAO et al., 2012; VILLA et al., 2013).

Assim, a utilização do potencial queratinolítico de microrganismos aparece como uma abordagem econômica e ambientalmente adequada para a reciclagem de penas, visando a obtenção de hidrolisados proteicos e agregação de valor a estes materiais subutilizados (LASEKAN et al., 2013). Além do manejo e da produção de hidrolisados, a bioconversão pode resultar em outros produtos de interesse biotecnológico, como enzimas proteolíticas e biomassa microbiana (PLEISSNER; VENUS, 2016).

Hidrolisados de proteínas alimentares, como aquelas do leite e soja, são amplamente investigados quanto aos seus potenciais bioativos. Propriedades antioxidantes, antihipertensivas e antidiabéticas destes hidrolisados, que podem desempenhar papel importante na nutrição e saúde humana e animal, são atribuídas a peptídeos libertados das proteínas precursoras durante a proteólise (SARMADI; ISMAIL, 2010; HOU et al., 2017).

Crescente interesse vem sendo dedicado às propriedades bioativas de hidrolisados obtidos a partir de resíduos e subprodutos ricos em proteínas derivados da indústria da carne (MORA et al., 2014; FERRARO et al., 2016). No entanto, as potenciais atividades biológicas de hidrolisados de pena são amplamente desconhecidas (BRANDELLI et al., 2015a). Isso representa amplo campo a ser explorado, especialmente pelo fato de estes materiais queratinosos serem recursos renováveis, amplamente disponíveis e de baixo custo (LEMES et al., 2016a). Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar as bioatividades *in vitro* de hidrolisados de penas, produzidos por bactérias queratinolíticas durante cultivos submersos utilizando penas inteiras como único substrato orgânico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 QUERATINAS

As queratinas são proteínas estruturais dentre as mais importantes nos vertebrados, constituindo os filamentos intermediários de células eucarióticas, além de compor a epiderme e apêndices de revestimento externo de animais vertebrados, como penas, pelos e unhas. As especialidades biológicas destas proteínas fibrosas, altamente estáveis e insolúveis, são consequência da composição química e do arranjo espacial de suas cadeias polipeptídicas, enoveladas em conformação compacta por meio de formação de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, estas últimas concentradas na porção central das queratinas devido à abundância de aminoácidos hidrofóbicos (FERRARO et al., 2016; WANG et al., 2016).

Estas proteínas são consideradas heterogêneas devido a variações no tipo de estrutura secundária e na composição e/ou predominância de aminoácidos. Com base na estrutura secundária dominante, a cadeia polipeptídica da queratina pode ser constituída de configurações designadas como  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -folhas ( $\beta$ -queratina) (DAROIT; BRANDELLI, 2014). Com base na sequência de aminoácidos que compõe a queratina, os grupos hidrofóbicos são os mais abundantes, especialmente na região central da molécula. As diferentes interações covalentes e não covalentes entre os aminoácidos da queratina conferem sua resistência mecânica, impermeabilidade e insolubilidade (WANG et al., 2016; SINKIEWICZ et al., 2018).

O alto teor de cisteínas, predominantes nas regiões N- e C-terminais da proteína, diferencia a queratina de outras proteínas fibrosas, como colágeno e elastina (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA; BOHACZ, 2011). De fato, a estrutura proteica fortemente estabilizada parece ser determinada, especialmente, pela presença de ligações dissulfeto entre cisteínas inter e intracadeias (BRANDELLI et al., 2010). Neste sentido, as  $\alpha$ -queratinas oferecem maior rigidez e resistência do que  $\beta$ -queratinas, em virtude da ocorrência do mais elevado conteúdo de cisteína e, com isso, de mais ligações dissulfeto, nas primeiras (DAROIT; BRANDELLI, 2014). Ainda, mecanismos específicos de modificações pós-traducionais das queratinas, tais como fosforilação e glicosilação, resultam em filamentos queratinosos com diferentes graus de bioacessibilidade à degradação (LANGE et al., 2016).

As propriedades químicas e estruturais que conferem aos filamentos de queratina comportamentos específicos, como resistência e estabilidade, são essenciais para que desempenhem funções biológicas, porém também significam obstáculos para o manejo adequado de materiais ricos em queratina, como penas e pelos (DAROIT et al., 2011). Assim, resíduos de queratina são considerados materiais recalcitrantes de difícil manejo, capazes de resistir, por exemplo, à ação de agentes químicos, estresses mecânicos e ao ataque de diversas enzimas proteolíticas comuns, incluindo papaína, pepsina e tripsina (BRANDELLI, 2008).

## 2.2 PENAS DE FRANGO: RESÍDUOS OU MATÉRIAS-PRIMAS?

Morfologicamente, as penas de frango podem ser distinguidas pela presença da raque, que consiste na estrutura central da pena percorrendo todo o seu comprimento e ao qual estão ligadas as estruturas secundárias e terciárias, chamadas de barbas e bárbulas, respectivamente. A raque compreende pelo menos metade do peso da pena, sendo altamente rígida, enquanto que as barbas e bárbulas são constituídas por fibras proteicas com baixa densidade, são altamente flexíveis e exibem microestruturas ocas (porosas) em forma de favo de mel, o que pode torná-las leves e mais acessíveis ao ar ou aos fluidos, além de proporcionar alta resistência à compressibilidade (TESFAYE et al., 2017).

Penas contêm elevados teores de proteína (~90%, base seca), sendo constituídas basicamente por queratinas (DAROIT; BRANDELLI, 2014). As  $\alpha$ -queratinas estão presentes em proporções superiores (41-67%) em relação à  $\beta$ -queratina (33-38%), e também estão presentes queratinas amorfas (LANGE et al., 2016). Esta composição confere às penas um caráter hidrofóbico e resistência frente a diversos fatores bióticos e abióticos (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA; BOHACZ, 2011).

O processamento comercial de aves produz milhares de toneladas de resíduos sólidos por ano, tais como ossos, vísceras, unhas, pele e penas (ZHU et al., 2010). Estes materiais orgânicos, formados basicamente por proteínas estruturais insolúveis que, devido às suas propriedades podem ser considerados materiais recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação (LANGE et al., 2016). Dentre estes resíduos, as penas estão entre os mais abundantes (KHARDENAVIS et al., 2009; ZHU et al., 2010). Logo, além de as penas serem provavelmente os materiais queratinosos mais abundantes na natureza (ONIFADE et al., 1998), consistem nos

subprodutos de queratina mais comuns a nível mundial (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA; BOHACZ, 2011).

Os Estados Unidos, a China e o Brasil detêm a liderança como os maiores produtores de carne de frango (LASEKAN et al., 2013), sendo o Brasil considerado o principal país exportador. No Brasil, em torno de 5,84 bilhões de frangos foram abatidos no ano de 2017 em estabelecimentos inspecionados, totalizando 13,60 milhões de toneladas de carcaças (IBGE, 2018). As penas correspondem de 5-10% do peso corpóreo de frangos adultos (BRANDELLI, 2008), o que significa que pelo menos 680 mil toneladas de penas foram geradas como resíduo da indústria avícola brasileira neste período.

Neste sentido, a gestão destes materiais ricos em proteína representa grande desafio econômico e ambiental para a indústria avícola, a qual necessita atender a demanda local pelo consumo de produtos derivados de frango, assim como abastecer os mercados externos (BRANDELLI et al., 2015a; RIEGER et al., 2017). Atualmente, as penas de frango costumam ser destinadas a aterros sanitários, que usualmente demandam áreas extensas para a distribuição e, além disso, a elevada disposição no ambiente pode ocasionar efeitos adversos (BOSE et al., 2014). A decomposição lenta e descontrolada deste resíduo acumulado no ambiente, especialmente em zonas anaeróbias, tende a resultar na produção de gases tóxicos, como sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e amônia ( $NH_3$ ) (DAROIT et al., 2011).

Em diferentes partes do mundo, indústrias também adotam o processo de incineração para a eliminação das penas resultantes do processamento pós-abate de frangos (SALMINEN; RINTALA, 2002). Embora este processo reduza quase que instantaneamente um grande volume de resíduos, trata-se de um método dispendioso sob a óptica financeira, devido ao elevado gasto energético, além dos potenciais impactos à saúde e ao ambiente devido a potencial emissão de gases tóxicos (SAVITHA et al., 2007).

Dentre os métodos tradicionais de processamento das penas estão tratamentos hidrotérmicos (cozimento sob alta pressão) seguidos de moagem, que implicam na necessidade de aportes energéticos consideráveis. Estes processos convertem as penas em produtos de baixo valor agregado, denominados farinha de penas, que são aproveitados de forma restrita como ingredientes em formulações de rações para animais devido à sua baixa digestibilidade e diminuído valor nutricional

(ONIFADE et al., 1998; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011; LI et al., 2013).

Em vista dos riscos ambientais, altos custos, baixa rentabilidade e outras desvantagens dos métodos convencionais, verifica-se a necessidade de abordagens inovadoras para gerenciar de forma exitosa estes resíduos queratinosos. Apesar da resistência das penas (queratinas) à proteólise por enzimas proteolíticas comumente empregadas em outros processos biocatalíticos, observa-se que materiais ricos em queratina não se acumulam em ambientes naturais, o que presume a existência de determinados agentes biológicos capazes de degradá-los na natureza (ONIFADE et al., 1998; BRANDELLI et al., 2010). Deste modo, crescente atenção vem sendo dada ao desenvolvimento de métodos biotecnológicos para o processamento das penas de forma a minimizar o seu potencial poluidor e, ao mesmo tempo, evitar o desperdício e valorizar esta abundante e barata fonte de proteínas.

### 2.3 DEGRADAÇÃO MICROBIANA DE PENAS

Os principais responsáveis pela degradação de materiais queratinosos na natureza são microrganismos que, em alguns casos preferencialmente, crescem sobre a superfície destes substratos (SAVITHA et al., 2007; BRANDELLI, 2008). Microrganismos capazes de metabolizar penas e outros materiais queratinosos são denominados queratinolíticos, utilizando estes materiais como fontes de carbono, nitrogênio, enxofre e energia para o seu crescimento e manutenção (GUPTA; RAMNANI, 2006).

Dentre os microrganismos queratinolíticos destacam-se alguns fungos (como *Chrysosporium* spp., *Aspergillus* spp.), actinomicetos (por exemplo, *Streptomyces* spp.), além de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, entre outros (BRANDELLI et al., 2010). Embora fungos também sejam capazes de degradar penas, este processo ocorre geralmente em taxas mais lentas quando comparado àquelas apresentadas por bactérias (SIVAKUMAR; RAVEENDRAN, 2015).

Particularmente, representantes do gênero *Bacillus*, como *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. cereus*, estão entre os microrganismos queratinolíticos mais eficientes, sendo frequentemente isolados de amostras de solo e outros microhabitats ricos ou não em resíduos de penas e outros materiais queratinosos



(RIFFEL; BRANDELLI, 2006; GIONGO et al., 2007; KUMAR et al., 2008; VASILEVA-TONKOVA et al., 2009; FAKHFAKH et al., 2013).

Considerando a estrutura complexa das penas e a sua composição proteica (queratinas), estudos propõem que a biodegradação por microrganismos ocorra através de mecanismos colaborativos que envolvem a ação de enzimas proteolíticas e sistemas sulfitolíticos. A sulfitólise corresponde à redução de ligações dissulfeto realizada por enzimas (dissulfeto redutases), liberação de sulfito/tiosulfato e mesmo por sistemas redox associados às células microbianas, enquanto que a proteólise indica a clivagem de ligações peptídicas do substrato parcialmente destruturado, realizada por proteases (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

Uma hipótese recente, inspirada na conversão de biomassa lignocelulósica na natureza, aponta a potencial participação de monooxigenases líticas de polissacarídeos (LMPOs) de origem fúngica na decomposição da queratina e resíduos queratinosos (LANGE et al., 2016). Embora a queratinólise microbiana ainda não esteja completamente elucidada, entende-se que a redução das ligações dissulfeto tem influência significativa para a degradação de penas, na medida em que desestabiliza a conformação compacta da queratina presente nestes materiais, facilitando o acesso das proteases para a atuação sobre o substrato (YAMAMURA et al., 2002; RAMNANI; GUPTA, 2007; BRANDELLI et al., 2010).

A maioria das proteases envolvidas na hidrólise de penas são extracelulares, incluindo possivelmente proteases com atividade queratinolítica, denominadas queratinases, com massa molecular em geral inferior a 50 kDa. Tais enzimas são capazes de hidrolisar substratos queratinosos mais eficientemente do que outras proteases, hidrolisando ligações peptídicas próximas às extremidades das moléculas de queratina (exopeptidases) ou no interior da cadeia polipeptídica (endopeptidases), liberando peptídeos e aminoácidos que podem ser utilizados para o crescimento microbiano (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA; BOHACZ, 2011).

Do ponto de vista da biotecnologia, a prospecção de microrganismos queratinolíticos continua sendo uma das principais estratégias para a proposição de processos de bioconversão de penas. Logo, o entendimento da funcionalidade, ou seja, das capacidades fisiológicas e metabólicas dos microrganismos, é fundamental na adaptação de fenômenos ecológicos para aplicações tecnológicas (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

A bioconversão microbiana representa, em relação às práticas correntes, tanto uma estratégia vantajosa de manejo, quanto uma alternativa para a valorização das penas (LASEKAN et al., 2013). O uso de materiais queratinosos como substrato para o crescimento microbiano é considerado como um processo sustentável de reciclagem, que pode resultar em uma quantidade apreciável de bioprodutos de valor agregado, como proteases e hidrolisados proteicos, que têm revelado potenciais aplicações em distintos ramos da ciência e tecnologia (GUPTA; RAMNANI, 2006; BRANDELLI et al., 2010; FAKHFAKH et al., 2013).

#### 2.4 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DERIVADOS DE MATERIAIS QUERATINOSOS

Hidrolisados proteicos são misturas complexas de peptídeos e aminoácidos, resultantes da clivagem de ligações peptídicas da cadeia proteica. Em geral, a escolha do método ocorre conforme análise das características do substrato proteico, disponibilidade de insumos adequados para a hidrólise, qualidade do produto final e aplicações pretendidas (HOU et al., 2017). Considerando a composição majoritariamente proteica, o baixo custo e as quantidades consideráveis de penas produzidas pela indústria avícola, estes subprodutos são recurso atrativo e valioso para a obtenção de hidrolisados proteicos, cujas propriedades funcionais dependem do método de conversão adotado (LASEKAN et al., 2013; LEMES et al., 2016a).

A hidrólise de substratos queratinosos pode ser realizada por meio de métodos químicos (ácidos ou alcalinos), enzimáticos ou microbianos (SINKIEWICZ et al., 2018). Processos químicos vêm sendo utilizados na conversão de penas, atuando no rompimento de ligações intermoleculares das queratinas. A hidrólise por via química é um processo usualmente mais rápido e simples quando comparada à hidrólise enzimática/microbiana, demonstrando, em geral, elevados rendimentos. A liberação de peptídeos solúveis a partir das penas é geralmente realizada empregando soluções alcalinas, ácidos fortes ou outros reagentes, sob temperaturas elevadas (processos termoquímicos) (COWARD-KELLY et al., 2006; LEE et al., 2016; STIBOROVA et al., 2016; SINKIEWICZ et al., 2017).

Contudo, os insumos utilizados na hidrólise química atuam sobre a cadeia peptídica de forma inespecífica. A utilização de produtos agressivos e a necessidade de condições severas de operação (como temperatura e pressão altas) fazem com

que os tratamentos químicos necessitem de elevados aportes energéticos, além de potencialmente afetar negativamente a qualidade dos hidrolisados pela destruição significativa de aminoácidos (SINKIEWICZ et al., 2018). Ainda, como certos reagentes químicos (tióis, sulfitos, peróxidos) apresentam elevada toxicidade, a hidrólise química pode resultar em produtos com elevados índices de cinzas e também efluentes problemáticos do ponto de vista ambiental e de seu tratamento posterior (TASKIN; KURBANOGLU, 2011).

Na perspectiva biotecnológica, hidrolisados proteicos vêm sendo obtidos utilizando o potencial proteolítico de microrganismos, ou proteases microbianas na forma de preparações brutas ou (parcialmente) purificadas (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011; LASEKAN et al., 2013). Comparada à hidrólise química, as principais vantagens do uso de enzimas residem nas condições moderadas de hidrólise (como temperatura e pH), preservação de aminoácidos, maior especificidade e facilidade de controle do grau de hidrólise de ligações peptídicas e facilidade de inativação das enzimas após o processo, simplificando a obtenção dos hidrolisados e permitindo a recuperação dos biocatalisadores no caso de enzimas imobilizadas (SCHAAFSMA, 2009; GARCIA et al. 2011; RAI; MUKHERJEE, 2015; HOU et al., 2017).

Contudo, a disponibilidade comercial de proteases (queratinases) para a hidrólise de materiais queratinosos ainda é limitada (GUPTA et al., 2013a;b). Assim, a maior parte dos hidrolisados e peptídeos derivados destes materiais ricos em queratina vem sendo preparada através de processamento (termo)químico ou de bioconversão microbiana (BRANDELLI et al., 2015a). Processos empregando hidrólises química e enzimática sequenciais também vêm sendo explorados, onde a hidrólise química inicial possibilita maior acesso à posterior atuação de proteases sobre o substrato queratinoso parcialmente desestabilizado (DALEV, 1990; KIM et al., 2002; MOKREJS et al., 2011; ŁABA; SZCZEKAŁA, 2013).

Quanto aos processos hidrolíticos mediados diretamente por microrganismos, a hidrólise de proteínas depende do crescimento microbiano e da liberação de proteases extracelulares. Processos microbianos geralmente necessitam de períodos mais extensos de hidrólise quando comparados à hidrólise enzimática, e os microrganismos consomem parte dos peptídeos e aminoácidos oriundos da hidrólise do substrato para sustentar seu crescimento (VESELÁ; FRIEDRICH, 2009; GUPTA et al., 2013a; STIBOROVA et al., 2016).

A conversão microbiana de penas, entretanto, se destaca como uma estratégia de manejo promissora tanto em termos de restrições ambientais como de custos financeiros, visto que consiste em processo ecologicamente seguro, de baixo consumo energético e de moderados custos operacionais (VASILEVA-TONKOVA et al., 2009; BRANDELLI et al., 2010). Sob estes aspectos, a biodegradação de materiais queratinosos utilizando microrganismos se revela mais atraente em relação aos processos (termo)químicos.

## 2.5 RELEVÂNCIA E APLICAÇÕES DE HIDROLISADOS DERIVADOS DE MATERIAIS QUERATINOSOS

Diversas aplicações vêm sendo postuladas para hidrolisados de materiais queratinosos, especialmente penas de frango. Tais aplicações são sumarizadas na Tabela 1 e nas respectivas subseções.

### 2.5.1 Uso como fertilizantes agrícolas

O nitrogênio (N) é o principal nutriente limitante para o crescimento vegetal. Embora as penas contenham aproximadamente 15% (m/m) de N, sua recalcitrância ocasiona lenta degradação e mineralização do N no solo, impedindo sua aplicação direta como fertilizante (THURIÈS et al., 2001). O processamento químico, enzimático ou microbiano das penas, resulta em formas de N mais disponíveis para absorção pelos vegetais, apresentando assim potencial para uso agrícola (CHOI; NELSON, 1996; TRONINA; BUBEL, 2008; PAUL et al., 2014). Tipicamente, hidrolisados de pena contêm minerais (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) e misturas complexas de peptídeos e aminoácidos (GURAV; JADHAV, 2013; KSHETRI et al., 2018).

A baixa relação carbono-nitrogênio (C:N) dos hidrolisados permite rápida mineralização do N orgânico pela microbiota do solo, liberando N mineral passível de absorção vegetal. Ainda, peptídeos e aminoácidos podem ser absorvidos diretamente pelas raízes e folhas das plantas, que são então translocados para outros tecidos vegetais, potencialmente atuando como estimulantes do crescimento (COLLA et al., 2015).

Tabela 1 - Hidrólise de materiais queratinosos e potenciais aplicações dos hidrolisados obtidos

Material queratinoso	Produção do hidrolisado		Aplicação dos hidrolisados		Referência
	Método	Agente	Aplicação	Resultados	
Penas inteiras	Microbiano (SmF*)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DHHJ	Fertilizante (foliar)	Crescimento de couve chinesa superior a controles sem fertilização	Cao et al. (2012)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Paenibacillus woosongensis</i> TKB2	Fertilizante (solo)	Germinação, massa fresca e seca de raízes de grão de bico maiores do que controles sem fertilização	Paul et al. (2013)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Chryseobacterium</i> sp. RBT	Fertilizante (solo e foliar)	Menores períodos para floração de bananeira e colheita de frutos, e maior rendimento de bananas do que controles sem fertilização	Gurav e Jadhav (2013)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 6B	Fertilizante (solo)	Germinação e crescimento de feijão-mungo maiores do que sem fertilização e similares à fertilização de referência	Bose et al. (2014)
Penas inteiras	Microbiano (SSF*)	<i>Streptomyces sampsonii</i> GS 1322	Fertilizante (solo)	Germinação e crescimento de trigo maiores do que controles sem fertilização	Jain et al. (2016)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Thermoactinomyces</i> sp. RM4	Fertilizante (solo)	Germinação, massa fresca e seca de raízes de grão de bico maiores do que controles sem fertilização	Verma et al. (2016)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Amycolatopsis</i> sp. MBRL 40	Fertilizante (solo)	Crescimento e massa seca de raízes e parte aérea de plantas de arroz similares aos observados com ureia	Tamreihao et al. (2017)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus polymyxa</i> B20	Fertilizante (foliar)	Massa fresca e teores de clorofila foliar de tomateiro, pepineiro e repolho-branco similares à fertilização de referência	Kucinska et al. (2014)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Aspergillus niger</i>	Fertilizante (solo)	Crescimento e rendimento de plantas de feijão-caupi maiores do que controles sem fertilização	Adetunji et al. (2012)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilis</i> KHS-1	Fertilizante (solo)	Crescimento e massa seca de raízes e parte aérea de cenoura e couve chinesa similares a fertilizante referência	Kim et al. (2005)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	Consórcio de <i>Thermoactinomyces</i> spp. 3H, 8H e M4	Fertilizante (solo)	Germinação e crescimento de azevém superiores à ausência de fertilização	Gousterova et al. (2011)
Penas moídas	Enzimático	Queratinase imobilizada de <i>B. licheniformis</i> AS-S24-I em nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Fertilizante (solo)	Germinação, crescimento e biomassa fresca de plantas de grão de bico similares ou maiores do que controles sem fertilização	Rai e Mukherjee (2015)
Penas inteiras	Termoquímico	Hidrólise alcalina (CaO)	Fertilizante (solo e foliar)	Aplicação postulada com base em caracterização química dos hidrolisados	Tronina e Bubel (2008)

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Material queratinoso	Produção do hidrolisado		Aplicação dos hidrolisados		Referência
	Método	Agente	Aplicação	Resultados	
Penas moídas	Termoquímico	Hidrólise ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fertilizante (solo)	Após ajuste de pH e adição de ureia e K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , massa fresca e seca de plantas de colza similares à fertilização com ureia ou nitrato de amônio	Popko et al. (2015)
Penas moídas	Termoquímico	Hidrólise alcalina (Ca(OH) <sub>2</sub> )	Fertilizante (solo)	Aplicação postulada com base no conteúdo de nitrogênio (total, orgânico, inorgânico), peptídeos, aminoácidos e caracterização química dos hidrolisados	Nurdiawati et al. (2018)
Resíduos de lã de ovelha	Termoquímico	Hidrólise alcalina (KOH, NaOH)	Fertilizante (solo)	Germinação, crescimento e biomassa fresca de azevém superiores à ausência de fertilização	Nustorova et al. (2006)
Lã de ovelha	Químico + ultrassom	Hidrólise alcalina (Ca(OH) <sub>2</sub> ) + cavitação acústica	Fertilizante (solo)	Germinação e crescimento de trigo maiores do que sem fertilização ou aplicação de hidrolisados termoquímicos	Holkar et al. (2016)
Lã de ovelha	Termoquímico	Vapor de água superaquecido	Fertilizante	Maior germinação de sementes e comprimento de radículas de agrião em relação à não aplicação de hidrolisado	Bhavsar et al. (2016)
Lã de ovelha	Termoquímico	Vapor de água superaquecido	Fertilizante; Ração animal	Aplicação postulada com base no conteúdo de peptídeos, aminoácidos e caracterização química dos hidrolisados	Bhavsar et al. (2017)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Vibrio</i> sp. kr2	Ração animal	Maior digestibilidade e valor biológico do que farinha de penas ( <i>in vitro</i> ); substituição de 20% da proteína (soja) em dietas de ratos Wistar suplementada com metionina	Grazziotin et al. (2006, 2008)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6 / <i>Bacillus</i> sp. kr16	Ração animal	Enriquecimento de aminoácidos, maior digestibilidade e valor biológico do que farinha de penas ( <i>in vitro</i> )	Maciel et al. (2017)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Chryseobacterium sediminis</i> RCM-SSR-7	Ração animal	Enriquecimento de aminoácidos, maior digestibilidade do que farinha de penas ( <i>in vitro</i> )	Kshetri et al. (2018)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus</i> sp. MPTK6	Ração animal	Maior digestibilidade <i>in vitro</i> do que penas inteiras	Kumar et al. (2012)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilus</i> A1	Ração animal	Maior digestibilidade <i>in vitro</i> do que penas inteiras	Fakhfakh et al. (2011)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus subtilis</i> AMR	Ração animal	Incremento da qualidade nutricional de farinha de milho com combinação de hidrolisado (26%) através de cozimento por extrusão	Mazotto et al. (2017)

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Material queratinoso	Produção do hidrolisado		Aplicação dos hidrolisados		Referência
	Método	Agente	Aplicação	Resultados	
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilus</i> A1	Ração animal	Maior crescimento (ganho de massa) de ratos Wistar com a incorporação de 2,5 ou 5% de hidrolisado de penas em comparação com dieta padrão recomendada	Fakhfakh et al. (2012)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1	Ração animal	Substituição de até 5% da fonte de proteína (soja) em dietas de frangos; suplementação com aminoácidos resultou em ganhos de massa idênticos àqueles com farinha de soja	Williams et al. (1991)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Kocuria rosea</i> LPB-3	Ração animal	Maior digestibilidade real de aminoácidos do que farinha de penas em ensaios <i>in vivo</i> com galos	Bertsch e Coello (2005)
Penas inteiras	Termoquímico + Enzimático	NaOH + preparação enzimática INSTA-PRO®	Ração animal	Incremento da solubilidade, digestibilidade e digestibilidade de aminoácidos <i>in vitro</i>	Kim et al. (2002)
Penas moídas	Enzimático	Preparação enzimática INSTA-PRO®	Ração animal	Substituição de até 20% da farinha de peixe pela combinação de hidrolisado e farinha de soja (2:1) na dieta de camarões brancos do Pacífico ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Mendoza et al. (2000)
Resíduos de lã de ovelha	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilus</i> A1	Ração animal	Maior digestibilidade <i>in vitro</i> do que resíduos de lã	Fakhfakh et al. (2013)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Streptomyces</i> sp. IF 5	Meio de cultura	Único substrato orgânico para cultivo de microrganismos ( <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Aspergillus flavus</i> )	Ramakrishnan et al. (2011)
Penas inteiras	Enzimático	Queratinase de <i>Pseudomonas</i> sp. P5	Meio de cultura	Único substrato orgânico para cultivo de <i>Escherichia coli</i>	Stiborova et al. (2016)
Penas inteiras	Termoquímico	Hidrólise alcalina (KOH)	Meio de cultura	Único substrato orgânico para cultivo de <i>Escherichia coli</i> ; cultivo e produção de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i>	Stiborova et al. (2016); Orak et al. (2018)
Penas inteiras	Termoquímico	Hidrólise alcalina (NaOH)	Meio de cultura	Fonte de nitrogênio na produção de polihidroxialcanoatos por <i>Cupriavidus necator</i> a partir de óleo residual de frituras	Benesova et al. (2017)
Penas moídas	Termoquímico	Hidrólise ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; HCl; H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Meio de cultura	Peptona para cultivos microbianos ( <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> ), cultivos e produção de carotenoides por <i>Rhodotorula glutinis</i> MT-5, produção de biomassa e exopolissacarídeos por <i>Morchella esculenta</i>	Taskin et al. (2011, 2012); Taskin e Kurbanoglu (2011)

(continua)

Tabela 1 - (continuação)

Material queratinoso	Produção do hidrolisado		Aplicação dos hidrolisados		Referência
	Método	Agente	Aplicação	Resultados	
Penas moídas	Termoquímico	Hidrólise ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Meio de cultura	Peptona em meios para cultivos e produção de glutatona por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Taskin (2013)
Lã de ovelha	Termoquímico	Hidrólise alcalina (KOH)	Meio de cultura	Peptona em meios para cultivos ( <i>Aspergillus niger</i> e <i>Escherichia coli</i> )	Taskin et al. (2016)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus</i> sp. C <sub>4</sub> (2008)	Produção de biogás	Maior produção de metano a partir da biodigestão anaeróbia, em comparação a penas moídas	Patinvoh et al. (2016)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus licheniformis</i> KK1	Produção de bio-hidrogênio	Substrato para produção de biohidrogênio por <i>Thermococcus litoralis</i>	Bálint et al. (2005)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus megaterium</i> recombinante	Produção de biogás	Maior produção de metano a partir da biodigestão anaeróbia, em comparação às penas moídas	Forgács et al. (2011)
Penas moídas	Enzimático	Protease alcalina	Produção de biogás	Maior produção de metano a partir da biodigestão anaeróbia, em comparação a penas moídas	Forgács et al. (2013)
Penas moídas	Termoquímico	Hidrólise ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; HCl; H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Produção de etanol	Fonte de nitrogênio para a produção de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Serna-Cock et al. (2018)
Penas moídas	Termoquímico + Enzimático	Hidrólise alcalina (KOH) + Enzima proteolítica	Formulação cosmética	Hidrolisado em creme tópico. Incremento da hidratação da pele e diminuição da perda de água através da epiderme	Mokrejs et al. (2017)
Farinha de penas	Enzimático	Pepsina + pancreatina	Formulação cosmética	Inibição de tirosinase, prevenção/tratamento de transtornos da pigmentação (como hipo e hiperpigmentação) da pele	Pongkai et al. (2017)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Formulação cosmética	Atividade anti-melanogênica; inibição da degradação de colágeno (redução da expressão de metaloproteinases de matriz induzida por radiação UVB em fibroblastos)	Yeo et al. (2018)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DHHJ	Formulação cosmética	Tratamento/cuidado capilar. Proteção e reparo de fios. Incorporação do hidrolisado aos fios, resultando em ganho de peso, flexibilidade, elasticidade e força	Cao et al. (2012)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus subtilis</i> AMR	Formulação cosmética	Tratamento/cuidado capilar. Maior hidratação, brilho e maciez de cabelos com aplicação de condicionador e xampu contendo hidrolisado. Efeitos após alisamento (180 °C) devido à maior incorporação de peptídeos aos fios	Villa et al. (2013)

\* Abreviações: SmF: cultivos submersos; SSF: cultivos em estado sólido.



Incrementos na germinação de sementes, no comprimento de raízes e altura de plantas, na massa fresca e massa seca de raízes e parte aérea das plantas, maior teor de macronutrientes e micronutrientes na biomassa vegetal, bem como aumento da produtividade, estão entre os efeitos descritos com a aplicação de hidrolisados em comparação à ausência de fertilização e mesmo em relação à utilização de fertilizantes comerciais (Tabela 1).

O triptofano, liberado e/ou produzido a partir do bioprocessamento de degradação das penas (PAUL et al., 2014; MACIEL et al., 2017), é aminoácido fundamental à síntese de ácido indolacético (AIA), um hormônio vegetal com importantes funções no crescimento vegetal. Além da produção de AIA pelo vegetal, diversas bactérias queratinolíticas vêm sendo demonstradas como possuidoras da capacidade de produzir este hormônio utilizando penas como substrato em cultivos submersos (BHANGE et al., 2016; KSHETRI et al., 2018), o que pode incrementar os efeitos benéficos dos hidrolisados no crescimento vegetal.

A aplicação de hidrolisados de pena pode também acarretar aumento de populações e da atividade microbiana nos solos, como de bactérias amonificantes, nitrificantes, fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfatos inorgânicos, bem como inibir populações de fitopatógenos, favorecendo o crescimento vegetal (NUSTOROVA et al., 2006; PAUL et al., 2013; BOSE et al., 2014; RAI & MUKHERJEE, 2015; JAIN et al., 2016). Assim, hidrolisados proteicos podem atuar tanto diretamente sobre o crescimento vegetal quanto indiretamente através de processos mediados pela microbiota do solo (COLLA et al., 2015).

### **2.5.2 Hidrolisados como ingredientes de rações**

Componentes proteicos estão entre os ingredientes mais importantes e dispendiosos na formulação de rações animais. A conversão de resíduos proteicos de origem animal com foco em seu aproveitamento para a alimentação animal é um dos meios de maior eficiência biológica para a reciclagem de nutrientes (FREEMAN et al., 2009). Embora a queratina de penas contenha níveis elevados de glicina, alanina, serina, cisteína e valina, apresentam deficiência de aminoácidos como histidina, lisina, metionina e triptofano (WILLIAMS et al., 1991; GRAZZIOTIN et al., 2006; TASKIN; KURBANOGLU, 2011; KUMAR et al., 2012).

Os processos hidrotérmicos empregados na produção de farinha de penas incrementam a solubilidade dos componentes constituintes das penas. No entanto, a

recalcitrância das queratinas às enzimas do trato digestivo afeta negativamente o valor biológico da farinha de penas como componente de rações, especialmente para animais monogástricos. Ainda, processamentos hidrotérmicos apresentam elevado custo e resultam na perda de aminoácidos termolábeis (como lisina, metionina, triptofano) e formação de aminoácidos não assimiláveis, como lantionina e lisinoalanina (ONIFADE et al., 1998; BRANDELLI, 2008; FAKHFAKH et al., 2011).

Neste sentido, a bioconversão microbiana pode contribuir no aumento da digestibilidade de componentes proteicos e no teor de aminoácidos limitantes dos hidrolisados proteicos a partir, por exemplo, da própria biomassa microbiana. Assim, a qualidade nutricional das penas pode ser incrementada. Testes *in vivo* e *in vitro* vêm indicando a potencialidade da utilização de hidrolisados derivados de materiais queratinosos como ingredientes na ração de animais alternativamente à farinha de penas comercial, bem como em substituição parcial aos componentes proteicos e de elevado custo tradicionalmente empregados em dietas animais, como proteínas de soja (Tabela 1; WILLIAMS et al., 1991; BERTSCH; COELLO, 2005; GRAZZIOTIN et al., 2008; MACIEL et al., 2017).

### **2.5.3 Usos como fonte de nitrogênio em cultivos microbianos**

Substratos para crescimento de microrganismos representam a maior parte dos custos para a produção de biomassa e obtenção de bioprodutos microbianos. Fontes de nitrogênio orgânico, peptídeos e aminoácidos são os componentes mais dispendiosos dos meios de cultura. Estas fontes são normalmente empregadas na forma de peptonas, definidas como hidrolisados proteicos solúveis em água e não precipitáveis por tratamentos térmicos, alcalinos e por saturação com sulfato de amônio. Diversos materiais de origem animal e vegetal, de valor relativamente elevado, são utilizados na produção de peptonas (TASKIN et al., 2012).

Neste cenário, hidrolisados proteicos de penas e lã de ovelha, obtidos especialmente por vias termoquímicas, vêm sendo reportados como ingredientes ricos em peptídeos e aminoácidos para utilização como fontes de nitrogênio orgânico em meios de cultura para microrganismos (Tabela 1), em substituição a fontes comerciais empregadas para este propósito, como peptonas de caseína, peixe, carne, soja (TASKIN; KURBANOGLU, 2011; TASKIN et al., 2016). Ademais, os produtos de hidrólise mostram-se ricos em minerais (S, P, K, Ca, Fe, Na e Mg), importantes para atividades microbianas (TASKIN et al., 2011).

Meio de cultivo microbiano formulado com penas tratadas por *Streptomyces* sp. IF 5 apresentou nutrientes essenciais para o crescimento de bactérias e fungos testados, evidenciado por contagens de colônias comparáveis ao meio de referência (RAMAKRISHNAN et al., 2011). Particularmente, estudo comparativo verificou o crescimento de microrganismo modelo (*Escherichia coli*) em meios de cultura contendo hidrolisados de penas como peptona, destacando-se a produção de biomassa mais elevada a partir de hidrolisado obtido por hidrólise alcalina (KOH) em comparação a hidrolisados derivados de clivagem enzimática ou de conversão microbiana por *Pseudomonas* sp. P5 (STIBOROVA et al., 2016). Contudo, estes autores ressaltam que a aplicação de métodos particulares de hidrólise depende do uso pretendido para o hidrolisado.

#### **2.5.4 Produção de biocombustíveis**

A aplicação de hidrolisados de penas vem recebendo atenção na produção de biocombustíveis (Tabela 1). Produção de biogás foi demonstrada a partir da digestão anaeróbia de hidrolisados resultantes da bioconversão de penas por *Bacillus megaterium* recombinante (FORGÁCS et al., 2011). De forma similar, o pré-tratamento microbiano de penas com *Bacillus* sp. C<sub>4</sub> resultou em maior produção de metano quando comparada àquela obtida com penas moídas (PATINVOH et al., 2016). Forgács et al. (2013) demonstraram aumento no rendimento de metano em processo de biodigestão anaeróbia contendo hidrolisados proteicos produzidos por hidrólise enzimática de penas utilizando uma endopeptidase alcalina.

Bálint et al. (2005) obtiveram hidrolisado de penas por *B. licheniformis* KK1 e, após suplementação com minerais essenciais, o submeteram a uma segunda fermentação por *Thermococcus litoralis*, uma arqueia hipertermófila, que produziu quantidades substanciais de biohidrogênio. Hidrolisado termoquímico de penas apresentou resultados similares a fontes tradicionais de nitrogênio (ureia e fosfato de amônio) na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* usando melão como fonte de carbono (SERNA-COCK et al., 2018).

#### **2.5.5 Cuidado capilar e da pele**

Hidrolisados de penas encontram aplicação na formulação de produtos farmacêuticos e cosméticos, direcionados a cuidados com cabelos e pele (Tabela 1). Peptídeo sintetizado com base na sequência da queratina tipo II de cabelo humano

demonstrou capacidade de recuperar propriedades mecânicas e térmicas de cabelos danificados (FERNANDES et al., 2012). Hidrolisado de penas produzido por *Stenotrophomonas maltophilia* DHHJ promoveu reconstrução capilar através de ganhos de peso, maior flexibilidade e força dos fios submetidos ao tratamento (CAO et al., 2012). Formulações de xampu e condicionador capilares, contendo hidrolisados de penas produzidos por *Bacillus subtilis* AMR, demonstraram efeito hidratante em cabelos normais e quimicamente tratados, especialmente após tratamento térmico, colaborando também no aumento da selagem das cutículas e brilho dos fios (VILLA et al., 2013).

Hidrolisado de penas obtido com *Fervidobacterium islandicum* AW-1 resultou na diminuição da produção de melanina por células de melanoma murino, possivelmente através da inibição da enzima tirosinase, apresentando potencial para a prevenção e/ou tratamento de transtornos da pigmentação (como hipo e hiperpigmentação) da pele (YEO et al., 2018). Neste sentido, Pongkai et al. (2017) reportaram inibição da enzima tirosinase por hidrolisado enzimático de farinha de penas.

Preparações à base de peptídeos de queratina de lã beneficiaram a hidratação, elasticidade e capacidade de retenção de água da pele (BARBA et al., 2008). Ainda, fração de hidrolisado de penas, contendo moléculas menores que 1.000 Da, demonstrou reduzir a expressão de metaloproteinases de matriz em fibroblastos dérmicos humanos através da inibição da fosforilação de proteínas/enzimas ativadoras induzida por radiação UVB. Esta atuação pode ser relacionada a peptídeos com potencial utilização em produtos contra o envelhecimento da pele (YEO et al., 2018).

## 2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE HIDROLISADOS PROTEICOS

### 2.6.1 Generalidades e bioatividades

Tradicionalmente, proteínas vêm sendo consideradas como fontes de energia e aminoácidos para a nutrição, necessárias para o crescimento e manutenção de funções fisiológicas. Proteínas alimentares, bem como peptídeos e aminoácidos derivados destas, também contribuem, por exemplo, para as propriedades sensoriais de alimentos. Contudo, em décadas mais recentes, proteínas vêm recebendo especial atenção devido à expansão do conhecimento acerca das atividades biológicas apresentadas por hidrolisados proteicos e dos agentes

bioativos contidos nestes hidrolisados, que usualmente possuem natureza peptídica (SARMADI; ISMAIL, 2010; RYAN et al., 2011).

Peptídeos biologicamente ativos são formados por sequências específicas de aminoácidos que podem contribuir na regulação e modulação de funções fisiológicas específicas, podendo exercer atividades antioxidantes, antihipertensivas, antidiabéticas, antimicrobianas, entre outras. Estes peptídeos são inativos enquanto parte da proteína precursora; portanto, tornam-se ativos somente após sua liberação através de processos de hidrólise (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; MÖLLER et al., 2008; KORHONEN, 2009).

A bioatividade dos hidrolisados é determinada por características dos peptídeos, como tamanho, composição e sequência de aminoácidos. Logo, a produção de peptídeos bioativos depende do substrato proteico e dos métodos de conversão adotados para a hidrólise da proteína original (SARMADI; ISMAIL, 2010; HE et al., 2013; FONTOURA et al., 2014; LEMES et al., 2016a). Peptídeos bioativos podem ser liberados via hidrólise *in vivo* por ação de enzimas digestivas. Tecnicamente, a hidrólise é majoritariamente realizada utilizando proteases de origem animal, vegetal ou microbiana, mas também pela utilização de microrganismos proteolíticos (PHELAN et al., 2009; HOU et al., 2017).

Embora a relação estrutura-função de peptídeos bioativos ainda não esteja clara, algumas semelhanças podem ser identificadas entre eles. Peptídeos que demonstram alguma bioatividade geralmente contêm entre dois e 30 aminoácidos, possuindo aminoácidos aromáticos e/ou hidrofóbicos localizados particularmente nas regiões C- ou N-terminais de sua estrutura (SCHAAFSSMA, 2009; SARMADI; ISMAIL, 2010; FERRARO et al., 2016; HOU et al., 2017). O processo de hidrólise *in vitro* de proteínas tende a aumentar o número de grupos ionizáveis, além de expor grupos hidrofóbicos devido ao desdobramento das cadeias proteicas, o que pode contribuir no potencial bioativo dos peptídeos, além da pequena massa molecular, geralmente menor que 6.000 Da (SARMADI; ISMAIL, 2010; DAROIT et al., 2012).

#### 2.6.1.1 Potencial antioxidante

Ao mesmo tempo em que o metabolismo oxidativo, durante a respiração em organismos aeróbicos, é fundamental para a sobrevivência das células, também gera moléculas instáveis e altamente reativas, conhecidas como radicais livres. Os radicais livres consistem em moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados

e, por isso, são extremamente ativos para reagir quimicamente com outras moléculas. Em um sistema biológico, os radicais livres derivam em grande parte de moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio que, em baixas concentrações, desempenham papéis importantes na sinalização celular, atuando em processos como expressão gênica e apoptose (LIU et al., 2016).

A excessiva formação destes radicais, de modo a superar a capacidade de resposta pelos sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa do organismo, pode desencadear danos celulares irreversíveis através da oxidação de biomoléculas sensíveis, como lipídios de membrana, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; HAQUE et al., 2009). Por conta disso, qualquer quantidade imoderada de radicais livres que possa danificar moléculas vitais está estreitamente vinculada ao envelhecimento acelerado e à iniciação ou progressão de distúrbios e várias doenças crônicas, incluindo aterosclerose, artrite, hipertensão, diabetes, câncer e até mesmo a doença de Alzheimer (SINGH et al., 2014; LIU et al., 2016; ZOU et al., 2016).

Um antioxidante é qualquer substância, natural ou sintética, que se opõe aos efeitos prejudiciais de reações de degradação oxidativa promovidas por agentes oxidantes a uma determinada molécula (HUANG et al., 2005). Quimicamente, os antioxidantes são normalmente reconhecidos pela capacidade de atuarem como doadores de elétrons ou de átomos de hidrogênio, que eliminam a condição descompensada dos radicais através de sua conversão em moléculas mais estáveis (HUANG et al., 2005). Desta forma, moléculas antioxidantes podem atuar na prevenção da formação de espécies reativas capazes de iniciar ou acelerar processos de estresse oxidativo, ou na interrupção de reações em cadeia já estabelecidas por radicais e seus intermediários (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Além da produção e relevância fisiológicas, uma variedade de fenômenos químicos e físicos exógenos pode estimular a geração de agentes oxidativos. Na indústria de alimentos, o processo de peroxidação lipídica, normalmente iniciado por íons metálicos, luz/radiação ou calor durante o processamento e armazenamento dos produtos ricos em componentes lipídicos poliinsaturados (altamente instáveis) e/ou ácidos graxos, promove alterações indesejáveis nas propriedades organolépticas e qualidade nutricional dos alimentos, além de eventualmente gerar

compostos tóxicos, diminuindo a segurança alimentar (LIN; LIANG, 2002; WANG et al., 2007; SARMADI; ISMAIL, 2010).

A adição de antioxidantes como conservantes em sistemas alimentares visa à estabilização de constituintes dos produtos, ao passo que inibe elementos promotores da peroxidação de lipídios e, conseqüentemente, evita deterioração e perda de valor comercial, organoléptico e nutricional dos alimentos, prolongando a sua vida útil (ESCUDERO et al., 2013; HE et al., 2013). Usualmente, produtos alimentícios são protegidos da deterioração pela utilização de aditivos que contêm, como princípio ativo, antioxidantes sintéticos considerados econômicos e eficientes. Dentre estes estão o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ), que vêm sendo relatados como possíveis agentes mutagênicos, oferecendo riscos à saúde do consumidor (ZHANG et al., 2010). O uso de antioxidantes sintéticos em produtos alimentares é inclusive restringido ou proibido em alguns países (KHANTAPHANT et al., 2011).

Neste contexto, compostos com propriedades antioxidantes são cada vez mais investigados a partir de fontes naturais, especialmente proteínas alimentares de origem vegetal, como proteínas da soja, e de origem animal, como as caseínas do leite e proteínas musculares, visando substituir os antioxidantes sintéticos não somente em itens alimentícios, mas também em produtos farmacêuticos, cosméticos e petroquímicos. De forma complementar, a adição de hidrolisados e/ou peptídeos bioativos vem sendo investigada na produção de alimentos funcionais denominados nutracêuticos (PHELAN et al., 2009; RYAN et al., 2011; MCCARTHY et al., 2013; LIU et al., 2016).

Hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos são considerados antioxidantes naturais, atuando por meio de mecanismos de eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica, quelação de íons metálicos, ou uma combinação destas vias (SARMADI; ISMAIL, 2010; PLEISSNER; VENUS, 2016). Em geral, peptídeos antioxidantes possuem cadeias curtas, de 5-16 resíduos de aminoácidos, com pesos moleculares entre 500 e 1.500 Da (SARMADI; ISMAIL, 2010), e atividades antioxidantes significativas têm sido atribuídas a frações peptídicas de composição hidrofóbica (PHELAN et al., 2009; LEMES et al., 2016a).

Alguns aminoácidos aromáticos, como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) podem agir especialmente como doadores de hidrogênio, enquanto outros aminoácidos hidrofóbicos, como alanina (Ala), leucina (Leu), isoleucina (Ile) e

prolina (Pro) contribuem no acesso aos radicais livres da fase lipídica (LIU et al., 2016). Não obstante, o caráter anfipático do fragmento peptídico também tem sido associado à capacidade de eliminação de radicais, pois pode incrementar a solubilidade, facilitando a transferência de prótons entre peptídeos e radicais (ZOU et al., 2016).

Grupos funcionais de certos aminoácidos, quando disponíveis, podem desempenhar papel significativo no mecanismo de proteção antioxidante. O grupo sulfidrilo (-SH) da cisteína (Cys), por exemplo, apresenta a possibilidade de interagir diretamente com os radicais livres, doando o seu átomo de hidrogênio, ou então perdendo um elétron do seu átomo de enxofre para radicais deficientes nesses aspectos (SARMADI; ISMAIL, 2010; WU et al., 2015; LIU et al., 2016). Aminoácidos com grupamentos hidroxilas presentes nas cadeias laterais (Tyr e Phe), assim como aminoácidos contendo anéis imidazol (His), indol (Trp) ou pirrolidina (Pro) podem atuar como doadores de hidrogênio (CHOE; MIN, 2009; ZOU et al., 2016).

A atividade de quelação de íons metálicos tem sido associada à presença de grupos carbonila e amino nas cadeias laterais de aminoácidos, como ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), arginina (Arg), lisina (Lys) e histidina (His) (KHANTAPHANT et al., 2011; LIU et al., 2016). Em especial, His pode, principalmente quando localizada na extremidade C-terminal do peptídeo, quelar íons  $Fe^{2+}$  através de ligação de coordenação envolvendo o grupo -NH do seu anel imidazol (CHOE; MIN, 2009; MEIRA et al., 2012; CORRÊA et al., 2014). Não somente a composição de aminoácidos, mas também sua sequência, pode influenciar o potencial antioxidante de determinado peptídeo, tendo em vista a possibilidade de interações sinérgicas ou antagônicas entre aminoácidos adjacentes (PHELAN et al., 2009).

#### 2.6.1.2 Potencial antidiabético

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) são hormônios liberados na corrente sanguínea a partir do trato gastrointestinal em resposta à ingestão de alimentos, potencializando a secreção de insulina dependente de glicose pelas células  $\beta$  pancreáticas, o que caracteriza o denominado efeito incretina (TULIPANO et al., 2011; UENISHI et al., 2012). Na diabetes tipo 2, um distúrbio metabólico caracterizado por um estado crônico hiperglicêmico devido a insuficiência de



secreção de insulina e resistência à insulina nos tecidos, observa-se depressão do efeito incretina, provocando aumento dos níveis de glicose no sangue. No entanto, a atividade anti-hiperglicemiante do GLP-1 parece ser preservada (KAZAKOS, 2011).

No entanto, ambos hormônios incretínicos, GLP-1 e GIP, apresentam curta meia-vida, pois estão sujeitos à rápida hidrólise pela ação da dipeptidil peptidase IV (DPP IV) (LACROIX; LI-CHAN, 2012; NONGONIERMA et al., 2014). A DPP IV é uma aminodipeptidase (serino protease) ubíqua, expressa na superfície de vários tipos de células, particularmente do intestino e rim, ou como forma circulante solúvel no plasma e outros fluidos corporais (VELARDE-SALCEDO et al., 2013).

A infusão intravenosa contínua de GLP-1 normaliza a concentração de glicose no sangue em indivíduos diabéticos, mas os efeitos das injeções subcutâneas são de curta duração por causa da degradação quase imediata deste hormônio pela DPP IV (SILVEIRA et al., 2013). A inibição da DPP IV, por sua vez, impede a rápida inativação das incretinas e potencializa os seus níveis circulantes ativos, melhorando a biossíntese e secreção da insulina, com pouco ou nenhum risco de hipoglicemia grave (MAEZAKI et al., 2011).

Portanto, considerando a prevalência e crescente incidência do diabetes tipo 2, terapias baseadas na inibição da atividade da DPP IV estão entre as estratégias terapêuticas investigadas visando o tratamento da diabetes tipo 2. Assim, tais inibidores podem aumentar o tempo de ação do GLP-1, contribuindo para o efeito insulínico e controle glicêmico desempenhados por este hormônio (DRUCKER; NAUCK, 2006; JAO et al., 2015).

Número crescente de peptídeos bioativos com atividade de inibição *in vitro* da DPP IV vêm sendo relatados a partir da hidrólise de proteínas alimentares, incluindo fontes vegetais e animais como farelo de arroz (HATANAKA et al., 2012), salmão (LI-CHAN et al., 2012; NEVES et al., 2017), amaranto, soja, trigo, tremoço (VELARDE-SALCEDO et al., 2013; LAMMI et al., 2016), mas particularmente proteínas derivadas do leite (LACROIX; LI-CHAN, 2013; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2013; NONGONIERMA et al., 2014).

As características estruturais das sequências peptídicas que determinam suas propriedades inibidoras da DPP IV são ainda pouco compreendidas. Com base nas estruturas de peptídeos sintéticos, inibidores de DPP IV que mostraram resultados promissores como agentes antidiabéticos tipicamente contêm de dois a sete

resíduos de aminoácidos, com Pro ou Ala na porção N-terminal (HUANG et al., 2012).

Substratos naturais da enzima DPP IV, como GLP-1 e GIP, são dipeptídeos N-terminais de oligopeptídeos, contendo preferencialmente Pro (X-Pro) ou Ala (X-Ala) como o penúltimo resíduo, uma vez que a enzima exibe elevada especificidade para remover tais peptídeos (MCINTOSH et al., 2005; HATANAKA et al., 2012; LACROIX; LI-CHAN, 2012; JAO et al., 2015). Por isso, a capacidade inibidora de peptídeos, através de interação com o sítio ativo da DPP IV, tem sido associada especialmente aos resíduos presentes nesta extremidade.

Além da natureza relativamente hidrofóbica (incluindo Pro) na região N-terminal, a aromaticidade (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr ou Trp) dos peptídeos também tem sido uma característica desejável para a inibição da DPP IV (NONGONIERMA et al., 2014). A sequência de aminoácidos, e não a composição de aminoácidos, destes peptídeos parece desempenhar papel importante para a resposta inibitória (POWER et al., 2014).

O principal mecanismo de ação dos peptídeos reside na inibição competitiva da DPP IV, ou seja, os peptídeos podem se comportar como substratos para essa enzima, acarretando menor hidrólise de GLP-1 e GIP (HATANAKA et al., 2012; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2013). Diprotina A, de sequência IPI (Ile-Pro-Ile), é um inibidor da DPP IV usado como um controle positivo de inibição, que atua bloqueando a degradação de cadeias polipeptídicas maiores (ex. incretinas) ao se ligar transitoriamente ao sítio catalítico da enzima (VELARDE-SALCEDO et al., 2013). Outros mecanismos de inibição descritos incluem a ligação de peptídeos à enzima ou aos complexos enzima-substrato fora do sítio ativo da DPP IV, acarretando na modificação da sua atividade catalítica (BRANDELLI et al., 2015b).

Portanto, hidrolisados e peptídeos de fontes proteicas naturais com propriedades antidiabéticas representam uma alternativa valiosa a ser investigada como abordagem complementar, através de terapia combinada ou intervenção nutricional, aos potentes fármacos inibidores sintéticos da atividade da DPP IV (POWER et al., 2014). Estudo mostrou um efeito aditivo para a inibição da DPP IV *in vitro* mediante a combinação de sitagliptina, um fármaco inibidor da DPP IV, e peptídeos derivados do leite (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2013). Especialmente, peptídeos de baixo peso molecular e hidrofóbicos são

candidatos à absorção intestinal e poderiam ser implementados através de ingredientes alimentares ou farmacoterapêuticos (LACROIX; LI-CHAN, 2013).

#### 2.6.1.3 Potencial antihipertensivo

A hipertensão arterial apresenta elevada prevalência na população, sendo importante fator de risco para o desenvolvimento de patologias como aterosclerose, cardiopatias e acidentes vasculares cerebrais. Neste sentido, o sistema renina-angiotensina atua na regulação da pressão sanguínea, tônus vascular e balanço de fluidos corporais. A renina, enzima secretada pelos rins para a circulação, cliva o angiotensinogênio circulante produzido pelo fígado, formando o decapeptídeo angiotensina I. Este peptídeo é, por sua vez, hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina-I (ACE), resultando no octapeptídeo angiotensina II, que atua como potente molécula vasoconstritora. Adicionalmente, a ACE inativa o vasodilatador bradicinina (IWANIAK et al., 2014).

Considerando a atuação da ACE na elevação da pressão arterial, a inibição desta enzima tornou-se um mecanismo-chave no combate à hipertensão. Boa parte dos fármacos disponíveis no mercado e prescritos para a regulação da pressão arterial, como captopril, enalapril e lisinopril, atua como inibidores sintéticos da ACE bloqueando diretamente sua ação e, por conseguinte, interrompem o efeito vasoconstritor angiotensina II. Todavia, esses medicamentos são conhecidos por produzir ocasionalmente reações adversas como erupções cutâneas, tosse, alergia e distúrbios de sabor (VERCRUYSSSE et al., 2005; HAQUE; CHAND, 2008; MARTIN; DEUSSEN, 2018).

Além dos fármacos sintéticos já empregados, proteínas vêm sendo caracterizadas como fontes potenciais de inibidores da ACE. Tais atividades inibitórias são principalmente descritas a partir de hidrolisados e peptídeos obtidos de proteínas alimentares de origem animal, especialmente aquelas do leite (SILVA; MALCATA, 2005; LÓPEZ-FANDIÑO et al., 2006; HAQUE; CHAND, 2008; CONTRERAS et al., 2009; PHELAN et al., 2009; SRINIVAS; PRAKASH, 2010; CORRÊA et al., 2011; BRANDELLI et al., 2015b), mas também de peixes, carnes e ovos (HARTMANN; MEISEL, 2007; RYAN et al., 2011). Hidrolisados de proteínas vegetais, como proteínas da soja, também contêm peptídeos que demonstram propriedades de inibição da ACE e podem auxiliar a prevenir e/ou tratar a hipertensão (LEE et al., 2008; MCCARTHY et al., 2013; SINGH et al., 2014).

Embora não totalmente elucidado, acredita-se que os peptídeos inibidores da ACE possam atuar, predominantemente, como substratos competitivos da ACE. A maioria dos peptídeos inibidores da ACE apresenta baixo peso molecular e possui sequências curtas, de dois a 12 aminoácidos, com destaque para a região C-terminal (HONG et al., 2008; IWANIAK et al., 2014; MARTIN; DEUSSEN, 2018). A ligação ao sítio catalítico da ACE é fortemente influenciada pela sequência tripeptídica C-terminal dos peptídeos. Peptídeos com resíduos hidrofóbicos e/ou aromáticos nas três posições C-terminais são associados com elevada afinidade ao sítio catalítico da ACE, visto que esta organização assemelha-se à porção C-terminal do substrato natural da ACE (LÓPEZ-FANDIÑO et al., 2006; HAQUE; CHAND, 2008; RYAN et al., 2011). Além da inibição da ACE, relacionada ao sistema renina-angiotensina, outros mecanismos de atuação de peptídeos vêm sendo investigados como capazes de reduzir a pressão arterial (MCCARTHY et al., 2013).

Os peptídeos naturais costumam demonstrar menor capacidade inibitória da ACE em comparação às drogas sintéticas (convencionais) baseadas neste mesmo mecanismo, mas apesar da necessidade de doses mais elevadas, podem significativamente reduzir a pressão arterial sem efeitos colaterais (secundários), sendo mais seguros, além de mais econômicos (evitarem o aumento do custo da terapia medicamentosa) (FITZGERALD et al., 2004; VERMEIRSSSEN et al., 2004).

## **2.6.2 Hidrolisados proteicos bioativos derivados de materiais queratinosos**

Investigações nesta área são majoritariamente focadas na bioatividade de hidrolisados e peptídeos derivados de proteínas alimentares, como caseínas do leite e proteínas da soja (PHELAN et al., 2009; SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011; MCCARTHY et al., 2013; SINGH et al., 2014). A obtenção de hidrolisados e peptídeos bioativos a partir de subprodutos e resíduos de origem animal vem sendo demonstrada e, com isso, despertando crescente interesse (DI BERNARDINI et al., 2011; MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015; TOLDRÁ et al., 2016).

Particularmente, ossos e peles (ricos em colágeno), ligamentos (ricos em elastina) e sangue (proteínas do plasma e hemoglobina) de bovinos, suínos e peixes vêm sendo empregados como substratos para a produção de hidrolisados com diferentes atividades biológicas, especialmente através de hidrólise enzimática (HE et al., 2013; LAFARGA; HAYES, 2014; MORA et al., 2014; FERRARO et al., 2016).

O uso de subprodutos e resíduos ricos em queratina como recurso para obtenção de hidrolisados e peptídeos bioativos é relativamente pouco explorada (BRANDELLI et al., 2015a). Contudo, a prospecção de materiais queratinosos pode ser promissora para estes propósitos (JONES et al., 2010). Considerando que queratinas são ricas em aminoácidos hidrofóbicos, representando até 50-60% da molécula (ARAI et al., 1983; SILVEIRA et al., 2009; FONTOURA et al., 2014), tal característica pode ser relevante uma vez que estes aminoácidos estão usualmente relacionados a diferentes bioatividades de hidrolisados proteicos e peptídeos (LEMES et al., 2016a).

Hidrolisados de materiais queratinosos, especialmente aqueles obtidos através da bioconversão de penas de frango, têm demonstrado potencial antioxidante, usualmente mensurado pela captura de radicais livres sintéticos, quelação de íons metálicos e poder redutor (Tabela 2).

Para além de capacidade antioxidante, estratégias *in silico*, empregadas para identificar possíveis peptídeos bioativos em proteínas (LAFARGA; HAYES, 2014), indicaram a presença de peptídeos antihipertensivos na queratina de penas (CHOINSKA et al., 2011). A inibição *in vitro* da ACE, como indicadora da capacidade antihipertensiva, foi demonstrada para hidrolisados de penas moídas produzidos através de processos enzimáticos (OHBA et al., 2003) e termoquímicos (KARAMAC et al., 2005).

No entanto, potenciais antihipertensivo (inibição *in vitro* da atividade da ACE) e antidiabético (inibição *in vitro* da atividade da DPP IV) de hidrolisados de penas produzidos por conversão microbiana, utilizando *Chryseobacterium* sp. kr6, foram somente recentemente demonstrados (FONTOURA et al., 2014; Tabela 2).

Fakhfakh et al. (2012) reportaram, em ratos Wistar que receberam dieta contendo hidrolisado de penas, diminuição da peroxidação lipídica e redução da atividade de sistemas enzimáticos relacionados à proteção antioxidante (superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase) em diversos órgãos (fígado, rins, coração, cérebro e cerebelo), sugerindo efeitos benéficos do hidrolisado na diminuição dos efeitos nocivos do estresse oxidativo.

Tabela 2 - Hidrolisados e peptídeos bioativos obtidos a partir de materiais queratinosos\*

Material queratinoso	Produção do hidrolisado		Atividade(s)	Potencial bioativo	Referência
	Método	Agente		Mecanismo(s) observado(s)	
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Kocuria rhizophila</i> p3-3	AA	Captura de radicais (ABTS, DPPH), redução de Fe <sup>3+</sup>	Łaba et al. (2018)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	AA	Captura de radicais (ABTS e DPPH)	Yeo et al. (2018)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Chryseobacterium sediminis</i> RCM-SSR-7	AA	Captura de radicais (DPPH)	Kshetri et al. (2018)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilus</i> A1	AA	Captura de radicais (ABTS, DPPH), redução de Fe <sup>3+</sup>	Fakhfakh et al. (2011)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus</i> sp. MPTK6	AA	Captura de radicais (DPPH), redução de Fe <sup>3+</sup>	Kumar et al. (2012)
Penas inteiras	Microbiano (SmF)	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	AA; AH; AD	Captura de radicais (ABTS e DPPH); Inibição <i>in vitro</i> da ACE; Inibição <i>in vitro</i> da DPP IV	Fontoura et al. (2014)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilus</i> A1	AA	Proteção de DNA contra danos oxidativos (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), quelação de Fe <sup>2+</sup> ; em dietas de ratos Wistar reduziu, <i>in vivo</i> , peroxidação lipídica e sistemas enzimáticos antioxidativos em órgãos internos (indicando diminuição <i>in vivo</i> do estresse oxidativo)	Fakhfakh et al. (2012)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus subtilis</i> S1-4	AA	Hidrolisado bruto: redução de Fe <sup>3+</sup> Peptídeo purificado: captura de radicais (ABTS e DPPH), redução de Fe <sup>3+</sup> e quelação de Fe <sup>2+</sup>	Wan et al. (2016)
Penas moídas	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus</i> sp. P45	AA	Captura de radicais (ABTS, DPPH), redução de Fe <sup>3+</sup>	Lemes et al. (2016b)
Penas moídas	Enzimático	Protease comercial de <i>Bacillus subtilis</i>	AA; AH	Captura de radicais (DPPH); Inibição <i>in vitro</i> da ACE;	Ohba et al. (2003)
Penas moídas	Hidrotérmico e enzimático sequencial	Calor úmido + protease fúngica na presença de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	AA	Captura de radicais peroxila	Eremeev et al. (2009)
Penas moídas	Termoquímico	Hidrólise ácida (HCl)	AH	Inibição <i>in vitro</i> da ACE	Karamac et al. (2005)
Resíduos de lã ovelha	Microbiano (SmF)	<i>Bacillus pumilus</i> A1	AA	Captura de radicais (DPPH), redução de Fe <sup>3+</sup> , quelação de Fe <sup>2+</sup>	Fakhfakh et al. (2013)
Chifres e cascos	Enzimático	Protease comercial de <i>Bacillus subtilis</i>	AA	Captura de radicais (DPPH)	Ohba et al. (2003)
Pelos bovinos	Químico	Hidrólise alcalina (NaOH)	AA	Captura de radicais (ABTS, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , OH <sup>*</sup> ), redução de Fe <sup>3+</sup> , inibiu oxidação de gorduras (sistemas alimentares)	Zeng et al. (2013)

\* Abreviações: SmF: cultivos submersos; AA: antioxidante; AH: antihipertensivo; AD: antidiabético; ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ACE: enzima conversora de angiotensina I; DPP IV: dipeptidil peptidase IV.

Processamentos pós-hidrólise podem ser empregados para concentrar os componentes bioativos dos hidrolisados. Ohba et al. (2003) observaram incremento no conteúdo de peptídeos antihipertensivos e antioxidantes após ultrafiltração de hidrolisados enzimáticos de penas, especialmente na fração de massa molecular entre 1 e 10 kDa. Nesta faixa também concentraram-se peptídeos obtidos por hidrólise enzimática de chifres e cascos de bovinos e bubalinos (OHBA et al., 2003). Ultrafiltração sequencial foi empregada para fracionar hidrolisados de penas obtidos por bioconversão utilizando *Fervidobacterium islandicum* AW-1. A captura de DPPH foi maior na fração contendo peptídeos entre 1 e 10 kDa, enquanto que a captura do radical ABTS foi similar nas frações <1 kDa e 1-10 kDa (YEO et al., 2018).

Zeng et al. (2013) utilizaram duas etapas sequenciais de cromatografia líquida de gel-filtração para purificar peptídeo antioxidante (18,7 kDa) contido em hidrolisado químico de pelos bovinos. Para hidrolisado de penas obtido através de conversão por *Bacillus subtilis* S1-4, um peptídeo antioxidante (Ser-Asn-Leu-Cys-Arg-Pro-Cys-Gly) foi purificado por etapas de precipitação ácida, cromatografia líquida de troca catiônica e cromatografia líquida de proteínas em fase reversa (WAN et al., 2016).

Não somente hidrolisados de queratinas podem demonstrar bioatividades. A extração de queratinas de penas utilizando sulfeto de sódio, seguida de precipitação ácida, resultou em dois tipos de micropartículas esféricas, que apresentaram atividade antioxidante e efeitos anticâncer avaliados *in vitro* (SHARMA et al., 2017). Extratos de queratina de penas, produzidos em meio alcalino, foram utilizados para a síntese de nanopartículas com potencial antioxidante e efeito antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SUNDARAM et al., 2015).

Extratos de queratina, obtidos pela solubilização de cabelos humanos com sulfeto de sódio, apresentaram atividade antioxidante, inclusive protegendo fibroblastos dérmicos humanos contra o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrado pela manutenção da viabilidade celular e reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (LAI et al., 2018).

As atividades biológicas de queratinas e de hidrolisados de substratos queratinosos ainda são amplamente desconhecidas (BRANDELLI et al., 2015a). Isso representa amplo campo a ser explorado, tanto sob perspectivas científicas quanto tecnológicas, especialmente pelo fato dos materiais queratinosos serem recursos proteicos abundantes, renováveis e de baixo custo (LEMES et al., 2016a).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de artigo científico, apresentado na Seção 3.1, identificada como Resultados I. O artigo (Seção 3.1) tem como título “Feathers as bioresource: microbial conversion into bioactive protein hydrolysates”.

Resultados complementares, não contemplados no referido artigo, estão apresentados na Seção 3.2, identificados como Resultados II.



### 3.1 RESULTADOS I

## FEATHERS AS BIORESOURCE: MICROBIAL CONVERSION INTO BIOACTIVE PROTEIN HYDROLYSATES

Kelly Callegaro <sup>a</sup>, Nicolcy Welter <sup>a</sup>, Daniel Joner Daroit <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Cerro Largo, 97900-000 Cerro Largo, RS, Brazil

### ABSTRACT

Feathers are recalcitrant protein-rich by-products generated by the poultry agro-industry, and valorization of residual biomasses from industrial processing is increasingly focused. Three feather-degrading *Bacillus* strains (CL18, CL33A, CL14) were used to convert feathers into feather hydrolysates (FH) during submerged cultivations, and the *in vitro* bioactivities of FHs were assessed. In feather broth (10 g/L feathers), *Bacillus* sp. CL18 degraded feathers more efficiently and the resulting FHs displayed enhanced antioxidant activities. With increasing feather concentrations, soluble protein was higher (9.02 mg/mL) after five days of cultivation with *Bacillus* sp. CL18 on feather broth containing 40 g/L feathers. This FH displayed antioxidant activities, as evaluated through the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical-scavenging assays (34.7% and 80.3%, respectively), Fe<sup>2+</sup>-chelating ability (80.6%), and reducing power (0.518 Abs<sub>700</sub>). *In vitro* antihypertensive and antidiabetic activities of FH were demonstrated through inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE; 89.7%) and dipeptidyl peptidase-IV (DPP IV; 95.7%) activities, respectively. Half-maximal effective/inhibitory concentrations of FH were 5.39, 15.12, 10.50, 1.61 and 1.52 mg/mL in the ABTS, DPPH, Fe<sup>2+</sup>-chelating, ACE- and DPP IV-inhibitory assays, respectively. Antioxidant, antidiabetic and antihypertensive potentials of FHs indicate microbial conversion as a suitable eco-friendly technology for feathers reclamation and valorization within the biorefinery concept.

**Keywords:** Agro-industrial by-product. Submerged cultivation. Antioxidant capacity. Antihypertensive activity. Antidiabetic activity.

## INTRODUCTION

Poultry is the world's second most consumed meat. Sustainable development of the poultry agro-industry is a complex task considering both the extensive utilization of natural resources to supply the increasing meat demand and the unavoidable generation of wastes during poultry processing. In Brazil, 5.84 billion chickens were slaughtered during 2017 (IBGE, 2018). A single slaughterhouse, processing 165,000 poultry per day, produces 80 tons of solid wastes on a daily basis, and feathers represent 23% of these materials (IPEA, 2012). In addition to the enormous feather amounts generated from poultry meat production, these by-products are composed of refractory proteins (keratins), representing a challenge for proper management (BRANDELLI et al., 2015).

Different strategies are thus investigated for feathers reclamation. Among the products obtainable from feathers and keratins are films for food and packaging, electronic devices, absorbents, composites, and others (REDDY, 2015). Nevertheless, the high protein content of feathers (90%, w/w) indicate that these low-cost by-products could be interesting resources to obtain protein hydrolysates (LASEKAN et al., 2013; LEMES et al., 2016a). Selection of a hydrolysis process depends, essentially, on the characteristics of the protein or protein-rich substrate, and on the intended or postulated application of hydrolysates (HOU et al., 2017). Feathers are recalcitrant towards common proteolytic enzymes, and specific proteases (keratinases) are scarce on the enzyme market. Hence, feather hydrolysates (FH) are typically produced through thermo-chemical or microbial methods (BRANDELLI et al., 2015).

Microbial hydrolysis of feathers, relying on microbial growth and secretion of proteases that act on the protein substrate, is usually performed at mild cultivation conditions. Thermo-chemical hydrolysis, although faster than the microbial one, results in nonspecific protein cleavage and the destruction of some amino acids; also, high energy inputs are needed, and treatment of generated effluents is potentially demanded (HOU et al., 2017). Thus, the use of keratinolytic microorganisms appears as a suitable and eco-friendly approach for feathers recycling aiming to obtain protein hydrolysates. FHs are mainly postulated as fertilizers for plant growth, animal feed ingredients (LASEKAN et al., 2013), organic substrates for microbial growth media (STIBOROVA et al., 2016), and as ingredients in cosmetic and hair care products (VILLA et al., 2013).

The biological activities of hydrolysates produced from food proteins, such as those derived from milk and soybean, are extensively recognized. Antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties of protein hydrolysates, which might be of significance for human and animal nutrition and health, and find applicability in the food and feed industries, are attributed to peptides released from parent proteins during proteolysis (SARMADI; ISMAIL, 2010; HOU et al., 2017). Although growing attention is being paid to bioactive properties of hydrolysates obtained from protein-rich wastes and by-products of the meat industry (LAFARGA; HAYES, 2014; FERRARO et al., 2016; LEMES et al., 2016a), the potential biological activities of FHs are widely unknown (BRANDELLI et al., 2015). Therefore, this study aimed to describe the *in vitro* bioactive potentials of feather hydrolysates produced by keratinolytic bacteria during submerged cultivations with whole feathers as the only organic substrate.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **MICROORGANISMS AND INOCULA**

*Bacillus* sp. CL18 and *Bacillus* sp. CL14, previously isolated from soil (DE OLIVEIRA et al., 2017), and *Bacillus* sp. CL33A, isolated from a site with discarded feathers (DE OLIVEIRA et al., 2016), were employed for feathers bioprocessing. These strains were maintained at 4 °C in Plate Count Agar (PCA) plates and subcultured periodically on fresh PCA plates (30 °C, 24 h). Bacterial suspensions, prepared in sterile saline (8.5 g/L NaCl) and adjusted to 0.8 absorbance units at 600 nm, were utilized as inoculum for the production of feather hydrolysates.

### **PRODUCTION OF FEATHER HYDROLYSATES**

Feather hydrolysates (FH) were obtained during submerged cultivations with the bacterial strains on feather broth (FB). FB consisted of mineral medium (0.5 g/L NaCl, 0.3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and whole chicken feathers (10, 20, 30, 40, 50 g/L). Initial pH was adjusted to 7.0 before autoclaving. One mL of inoculum was added to Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of FB. Incubations were performed (30 °C, 125 rpm) for up to 13 days, depending on the bacterial strain. Initially, the three bacterial strains were evaluated during growth on FB containing 10 g/L feathers (FB10). Thereafter, only the strain displaying increased feather

degradation and/or resulting in FH with increased antioxidant potentials (described below) on FB10 was employed for cultivations on FB containing higher feather concentrations (20-50 g/L).

Duplicate flasks were withdrawn at defined cultivation periods and filtered through filter paper. Filters with retained feathers/feather remnants were dried at 60 °C until constant weight to determine the percentage of feather degradation (DE OLIVEIRA et al., 2016). Filtrates were then centrifuged (10,000 × g for 10 min), and the collected supernatants were boiled in a water bath (100 °C, 10 min) to inactivate bacterial enzymes. Prior to heat-inactivation, proteolytic activity in culture supernatants was determined using azocasein as substrate (CORRÊA et al., 2010). The heat-treated culture supernatants were employed as FHs. Soluble protein contents of FHs were determined by the Folin-phenol method, using bovine serum albumin as standard.

## BIOACTIVE POTENTIAL OF FEATHER HYDROLYSATES

### **2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity**

FH (1 mL) was added to 3.9 mL of DPPH methanolic solution (60 µM). After homogenization, mixtures were incubated for 60 min in the dark at room temperature. Capture of DPPH was measured by the decrease in absorbance at 517 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Controls were performed by adding 1 mL of distilled water instead of FH. Capture of DPPH was calculated as: Scavenging activity (%) =  $[1 - (A / B)] \times 100$ , where A is the absorbance with FH, and B is the absorbance of controls. Butylated hydroxytoluene (BHT) was employed as reference antioxidant. Assays were performed in triplicates.

### **2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity**

Scavenging of the ABTS radical (ABTS<sup>•+</sup>) was evaluated as described by Re et al. (1999). The radical was obtained by mixing 5 mL of ABTS solution (7 mM) with 88 µL of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mM). This mixture was allowed to react in the dark for 16 h before use. ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with phosphate-buffered saline (5 mM, pH 7,4) to reach 0.70 ± 0.02 absorbance units at 734 nm. FH (5 µL) was added to 1 mL ABTS<sup>•+</sup> solution, and absorbance at 734 nm was measured after 6 min. Controls were performed with 5 µL distilled water instead of FH. Capture of ABTS<sup>•+</sup> was

calculated as: Scavenging activity (%) =  $[1 - (A / B)] \times 100$ , where A is the absorbance with FH, and B is the absorbance of controls. Ascorbic acid was used as reference antioxidant. Assays were performed in triplicates.

### **Fe<sup>2+</sup>-chelating ability**

The capacity of FHs to chelate ferrous ions was assessed using the ferrozine method. FH (100  $\mu$ L) was added to 3.7 mL of distilled water, 100  $\mu$ L of FeSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>; 2 mM) and 200  $\mu$ L of 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine; 5 mM). Absorbance of the reaction mixture was measured at 562 nm after 10 min. In controls, 100  $\mu$ L of distilled water was added instead of FH. Results were expressed as: Fe<sup>2+</sup>-chelating activity (%) =  $[1 - (A / B)] \times 100$ , where A is the absorbance with FH, and B is the absorbance of controls. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used as standard. Assays were performed in triplicates.

### **Reducing power**

FH (1 mL) was added to 2.5 mL phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide (10 mg/mL). This mixture was incubated for 30 min at 50 °C. After adding 2.5 mL of trichloroacetic acid solution (100 g/L), this mixture was centrifuged (3,000  $\times$  g for 10 min). Then, 2.5 mL of the supernatant were added to 2.5 mL of distilled water and 500  $\mu$ L of ferric chloride (1 mg/mL). Absorbance of this mixture was measured at 700 nm. Controls were performed by adding 1 mL of distilled water instead of FH. Results were presented as absorbance at 700 nm (Abs<sub>700</sub>). BHT was employed as reference antioxidant. Assays were performed in triplicates.

### **Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) activity**

FH (25  $\mu$ L) was added to 25  $\mu$ L of substrate solution (2.0 mM Gly-Pro-*p*-nitroanilide in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6) and this mixture was pre-incubated for 10 min at 37 °C. Subsequently, 50  $\mu$ L of recombinant human DPP IV (0.01 U/mL, diluted in Tris-HCl buffer) were added to initiate the reactions. After incubation at 37 °C for 60 min, reactions were terminated by adding 100  $\mu$ L sodium acetate buffer (1 M, pH 4.0). Absorbance of released *p*-nitroanilide was measured at 405 nm. Percentage of DPP IV inhibition was calculated as: Inhibitory activity (%) =  $\{1 - [(A - B) / (C - D)]\} \times 100$ , where A is the absorbance with DPP IV, substrate, and FH; B is

the absorbance with substrate and FH, without DPP IV (replaced by buffer); C is the absorbance with DPP IV and substrate, without FH (replaced by distilled water); and D is the absorbance with substrate, without DPP IV and FH (replaced by buffer and distilled water, respectively) (ZHANG et al., 2015). Assays were performed in triplicates.

### **Inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity**

Assays were performed, with modifications, from Cushman and Cheung (1971). FH (20  $\mu$ L) was added to 100  $\mu$ L of 8 mM hippuryl-histidyl-leucine (prepared in 50 mM HEPES-HCl buffer containing 300 mM NaCl, pH 8.3), at 37 °C. Reaction was initiated by adding 40  $\mu$ L of ACE from rabbit lung (0.1 U/mL) and, after 30 min at 37 °C, reaction was terminated by adding 150  $\mu$ L of 1 M HCl. Released hippuric acid was extracted with 1 mL ethyl acetate and the organic phase was transferred to a glass tube. After heat evaporation, the residue was dissolved with 800  $\mu$ L of distilled water and the absorbance was assessed at 228 nm. Percentage of ACE inhibition was calculated as: Inhibitory activity (%) =  $\{1 - [(A - B) / (C - D)]\} \times 100$ , where A is the absorbance with ACE, substrate, and FH; B is the absorbance with substrate and FH, without ACE (replaced by buffer); C is the absorbance with ACE and substrate, without FH (replaced by distilled water); and D is the absorbance with substrate, without ACE and FH (replaced by buffer and distilled water, respectively). Captopril was employed as positive control. Assays were performed in triplicates.

### **Half-maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) and half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of FH on antioxidant and enzyme-inhibition assays**

FHs, obtained after five days of submerged cultivation with *Bacillus* sp. CL18 on FB40, were lyophilized. Freeze-dried FHs were dissolved in distilled water to achieve different concentrations (1.0-40.0 mg/mL). Subsequently, the DPPH, ABTS, Fe<sup>2+</sup>-chelating, ACE-inhibition and DPP IV-inhibition assays were performed in triplicates, as described above. The percentage radical scavenging, metal chelation, or enzyme inhibition were plotted against FH concentration. EC<sub>50</sub> values (radical scavenging and metal chelation) and IC<sub>50</sub> values (ACE- and DPP IV-inhibition), calculated from these plots, represent the concentration of FH resulting in 50% radical scavenging, Fe<sup>2+</sup> chelation, or ACE- or DPP IV-inhibitory activities (ZHANG et al., 2015).

## RESULTS AND DISCUSSION

### PRODUCTION OF FHs AND THEIR ANTIOXIDANT POTENTIALS

Three keratinolytic *Bacillus* strains were initially evaluated to produce feather hydrolysates (FH) through submerged cultivations. Comparison between the residual feathers mass as a function of cultivation time demonstrates the distinct feather-degrading abilities of these strains (Figure 1). Feathers contained on FB10 were more effectively degraded by *Bacillus* sp. CL18 (Figure 1a), followed by *Bacillus* sp. CL33A (Figure 1b) and *Bacillus* sp. CL14 (Figure 1c). Accordingly, increases in soluble protein contents indicate that *Bacillus* sp. CL18 was the most effective strain for the production of FH (Figure 1).

Interest on antioxidant properties of protein hydrolysates and peptides derives from their positive influences on biological systems and food products. The deleterious action of free radicals and oxidative stress are related to pathological conditions, such as hypertension, atherosclerosis, and cancer (ZOU et al., 2016). Additionally, oxidative reactions are problematic for the food industry, promoting undesirable alterations that affect both food quality and safety (SARMADI; ISMAIL, 2010). Protein hydrolysates might be regarded as natural antioxidants, presenting such feature due to different mechanisms, such radical scavenging, chelation or reduction of metal ions, or a combination of these reactions (ALAM et al., 2013).

FHs obtained on FB10 were evaluated for antioxidant capabilities using four different complementary methods. In the DPPH assay, when a hydrogen atom is transferred from an antioxidant to DPPH radical, it becomes stable. Such reduction causes the color of DPPH solution to fade and the resulting absorbance is monitored spectrophotometrically (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Scavenging of DPPH radical reached maximal values (40%) for FH obtained after 13 days of cultivation with *Bacillus* sp. CL14 (Figure 1c); however, similar DPPH-scavenging activities were presented by FH produced by *Bacillus* sp. CL18 (37%) after 7 days (Figure 1a). For *Bacillus* sp. CL33A, decreased scavenging abilities were detected, reaching a peak (24%) after 7 days of cultivation (Figure 1b).

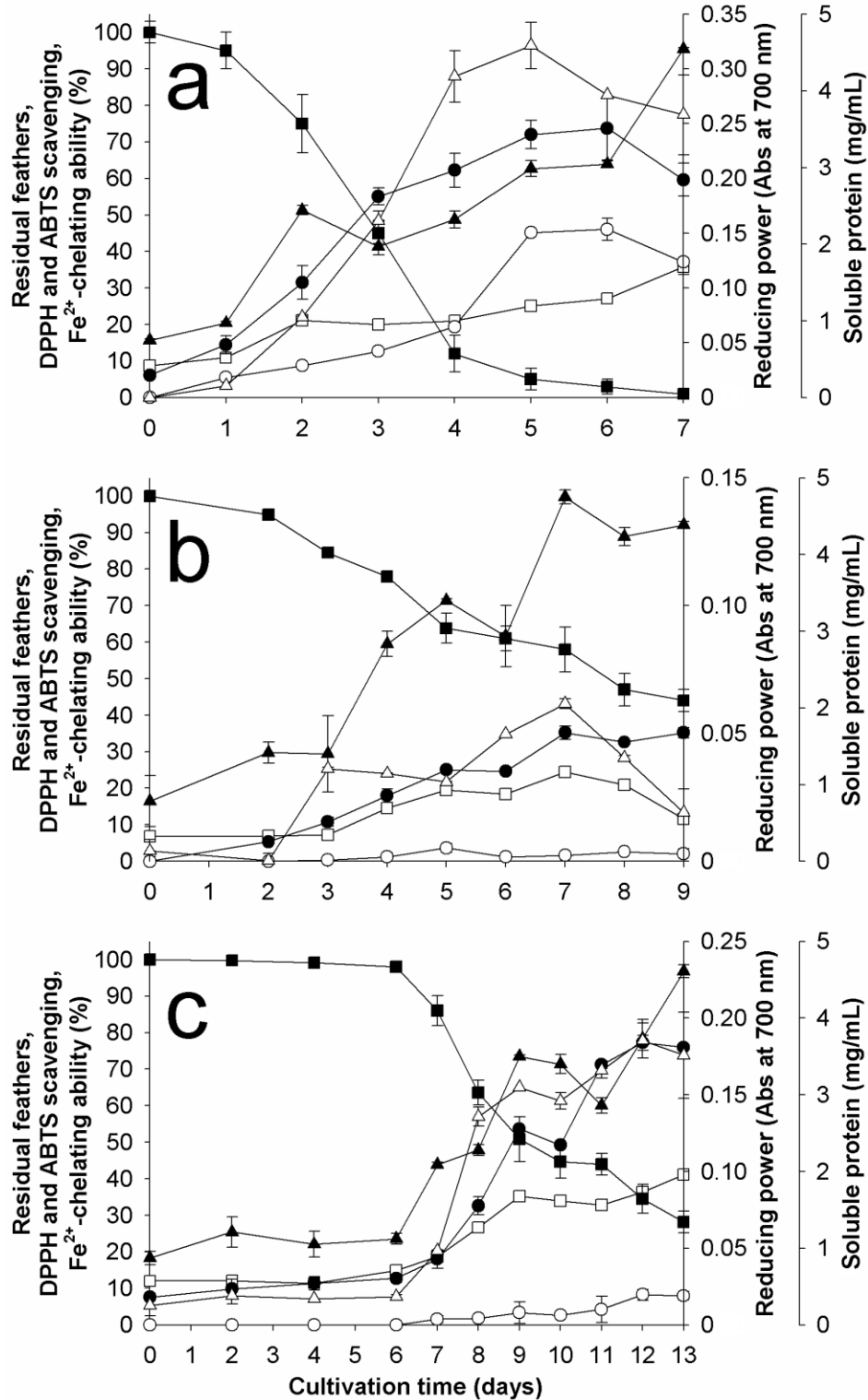


Figure 1 - Feather degradation, release of soluble protein, and antioxidant potentials of feather hydrolysates produced by *Bacillus sp.* CL18 (a), *Bacillus sp.* CL33A (b), and *Bacillus sp.* CL14 (c) during submerged cultivations in feather broth (10 g/L of feathers). Residual feathers (%; ■), soluble protein (mg/mL; △), scavenging of DPPH radical (%; □), scavenging of ABTS radical (%; ●), Fe<sup>2+</sup>-chelating ability (%; ○), reducing power (Abs at 700 nm; ▲).



The ABTS method is also a decolorization assay. The pre-formed radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) might be reduced to ABTS by electron-donating (antioxidant) molecules, resulting in decreased absorbances (RE et al., 1999). Highest ABTS<sup>•+</sup> scavenging was similar among FHs produced by *Bacillus* sp. CL14 (76%) and *Bacillus* sp. CL18 (~73%); nevertheless, the latter FHs displayed such scavenging after 5-6 days of cultivation (Figure 1a), whereas for the former, only after 12 days (Figure 1c). FH obtained with *Bacillus* sp. CL33A presented lower scavenging potential (35%) when compared to the other strains (Figure 1b).

In the Fe<sup>2+</sup>-chelating ability protocol, ferrozine and Fe<sup>2+</sup> react to form a dark-colored complex that is estimated spectrophotometrically. The presence of other chelating agents restricts the said reaction, resulting in decreased color (ALAM et al., 2013). FH produced by *Bacillus* sp. CL18 after 5 days was capable to chelate 45.1% of Fe<sup>2+</sup> (Figure 1a); conversely, chelating activity towards Fe<sup>2+</sup> was negligible for FHs obtained with strains CL33A and CL14 (3-8%; Figure 1b,c). The relevance of such antioxidant potential is related to the ability of iron to catalyze the generation of hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>) through the Fenton reaction. Since these strongly reactive radicals contribute to oxidative damages in biological systems and also to lipid peroxidation in food systems, chelation of metal ions ultimately decreases the formation of detrimental OH<sup>•</sup> (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Particularly, increased preoccupations emerging from the potential toxicities related to some synthetic antioxidants utilized in food products prompt the search for alternative ones (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Reducing power assay measures the ability of hydrolysates to reduce the Fe<sup>3+</sup>/ferricyanide complexes to the ferrous form. Fe<sup>2+</sup> can be monitored by measuring the formation of Perl's Prussian blue, where higher Abs<sub>700</sub> indicates increased reducing power. Reducing power of FHs after 7 days of cultivation with *Bacillus* sp. CL18 and CL33A were 0.32 Abs<sub>700</sub> (Figure 1a) and 0.14 Abs<sub>700</sub> (Figure 1b), respectively. For FHs produced by *Bacillus* sp. CL14, maximal reducing power (0.23 Abs<sub>700</sub>) was detected after 13 days of cultivation (Figure 1c). Again, better antioxidant potential was observed for FHs produced by *Bacillus* sp. CL18. The relationship between increased antioxidant capacity and higher reducing power is commonly reported for protein hydrolysates, since the ability to donate electrons would reduce oxidized intermediates that contribute to lipid peroxidation (LIU et al., 2017).

Therefore, FHs presented different modes of action that contribute to their antioxidant potentials. *Bacillus* sp. CL18 was observed to degrade feathers more efficiently than the other two bacterial strains, and the resulting FHs displayed increased antioxidant potentials at diminished cultivation periods (Figure 1). *Bacillus* sp. CL18 was then selected for the production of FHs in FB containing higher feather amounts (20-50 g/L). Feather degradation and related parameters are presented on Figure 2, whereas the antioxidant capacities of FHs are depicted on Figure 3. In both figures, results obtained with *Bacillus* sp. CL18 in FB10 were added for comparison purposes.

Increased initial feather concentrations on FB resulted in decreased percentages of degradation (Figure 2a). Values of pH behaved similarly in different FB, from initial near-neutrality values to pHs of 8.5-8.7 at day 7 (Figure 2b), due to deamination of peptides and amino acids resulting from proteolysis (DAROIT; BRANDELLI, 2014). An increasing trend of soluble protein contents was revealed in FB containing higher feathers amounts, from 10 g/L (FB10) to 40 g/L (FB40). Soluble protein concentrations were higher after 5 days on FB40. In FB50 (50 g/L feathers), release of soluble protein lagged until day 2, and then increments were observed after day 3 (Figure 2c).

Although not completely understood, bacterial keratinolysis appears to depend, at least in part, on the production of extracellular proteases (DAROIT; BRANDELLI, 2014). Specifically for *Bacillus* sp. CL18, feather concentrations lower than 50 g/L were related to higher production of proteolytic enzymes; however, at higher concentrations (50 g/L), protease production was negatively affected due to shear stress and a diminished oxygen availability for aerobic growth (not shown).

Conversion of the percentage residual feathers (Figure 2a) using the initial feather concentration for each FB point to an enhanced degradation efficiency from FB10 (9.9 g/L) to FB40 (24.5 g/L), after 7 days. In FB50, degradation decreased to 19.7 g/L, coinciding with a decreased protease production during cultivations (not shown). Complementarily, there was a reasonable correlation between feather degradation (g/L) and the true solubilization of feather proteins (Figure 2c), even considering that a fraction of soluble proteins and amino acids were utilized for microbial growth (STIBOROVA et al., 2016).

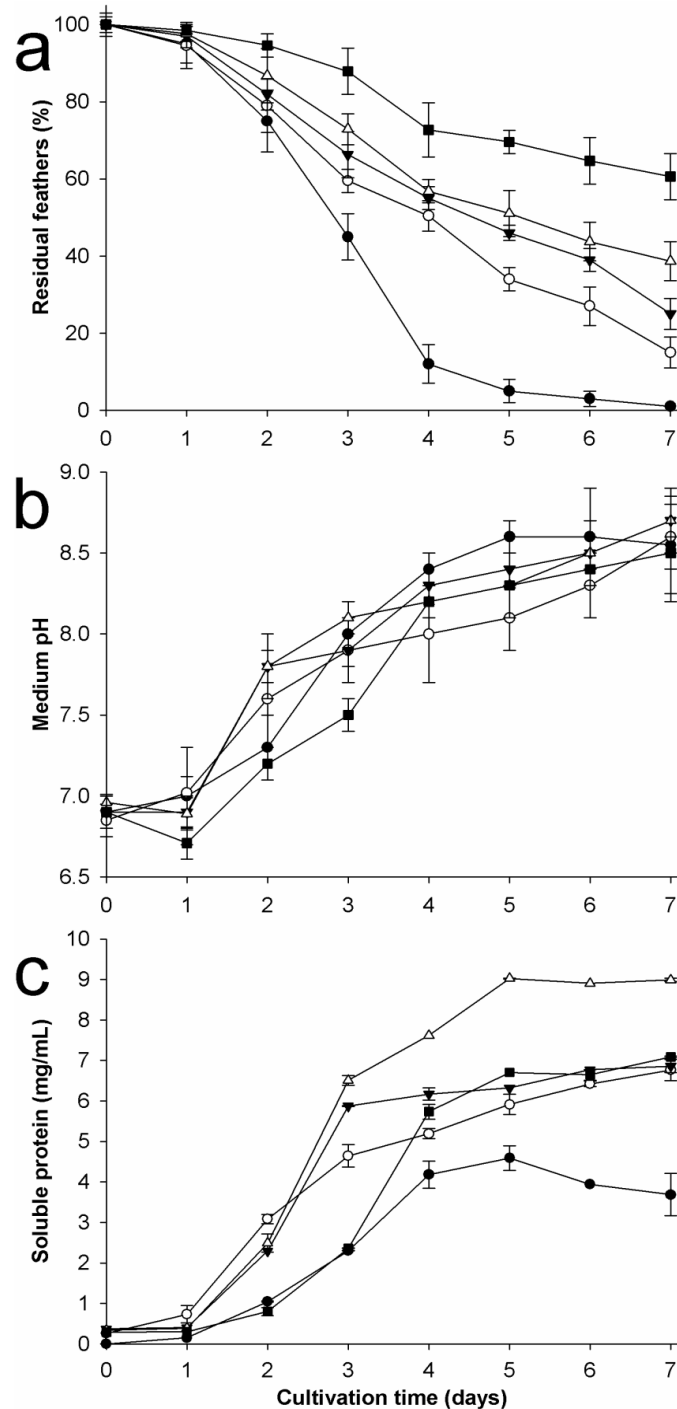


Figure 2 - Feather degradation (a), medium pH (b), and release of soluble proteins (c) during submerged cultivations with *Bacillus* sp. CL18 in feather broth with different feather concentrations: 10 g/L (●), 20 g/L (○), 30 g/L (▼), 40 g/L (△), and 50 g/L (■).

FHs obtained with *Bacillus* sp. CL18 were assessed for antioxidant activities. As for the DPPH assay, a first increase on DPPH quenching was observed up to 2 and 4 days of cultivation in FB10 and FB30, respectively, followed by stabilization and further increases at days 5-7 and day 6 (Figure 3a). In FB20, DPPH scavenging

augmented during cultivation and, for FB40 and FB50, scavenging was nearly stable after 4 days of cultivation. However, higher and similar potentials were evaluated after 6 days in FB40 and FB50 (Figure 3a). Specifically for FB40, obtained FH displayed maximal DPPH-scavenging activity of 37.5%, which was equivalent to that of 0.35 mg/mL of BHT.

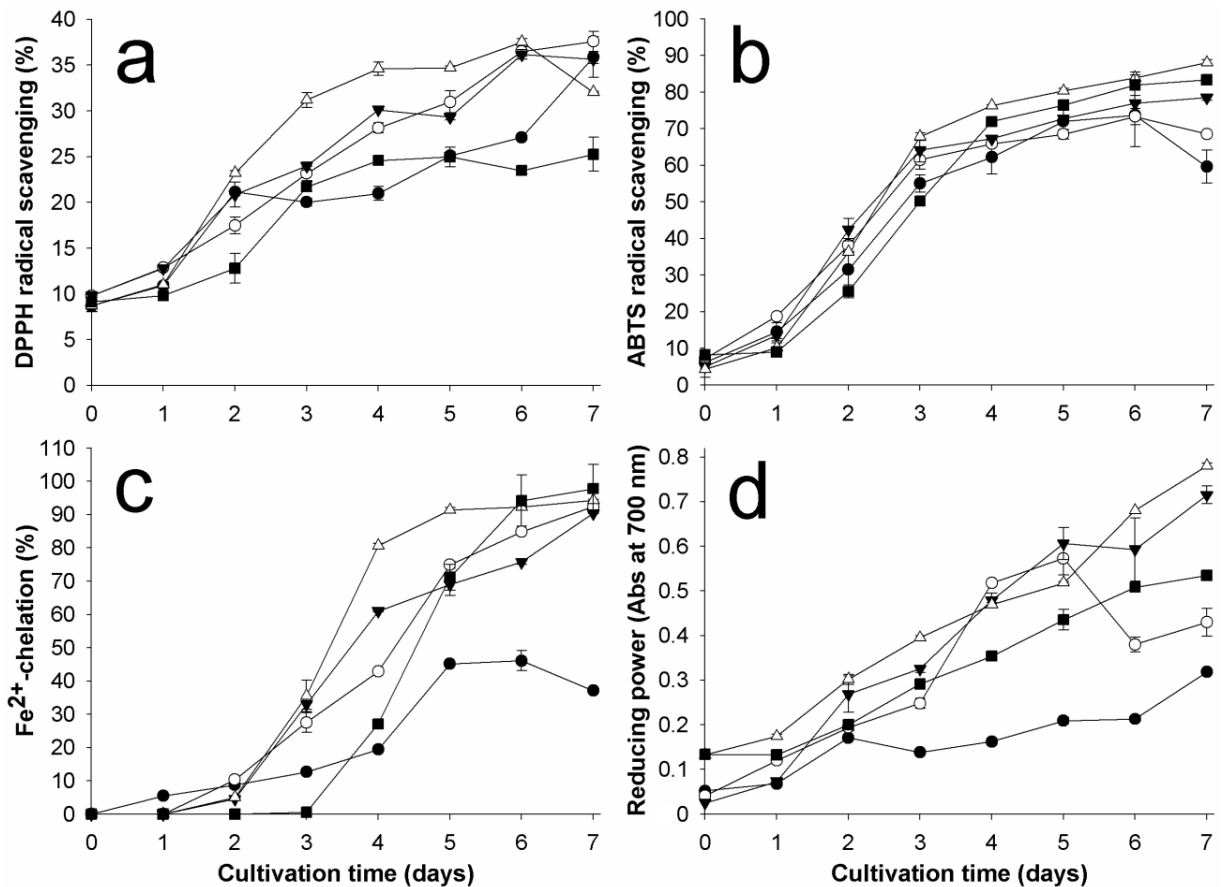


Figure 3 - Antioxidant potential of feather hydrolysates, as evaluated through scavenging of DPPH radical (a), scavenging of ABTS radical (b), Fe<sup>2+</sup>-chelating ability (c), and reducing power (d). Feather hydrolysates were produced by *Bacillus* sp. CL18 during submerged cultivations in feather broth with different feather concentrations: 10 g/L (●), 20 g/L (○), 30 g/L (▼), 40 g/L (△), and 50 g/L (■).

For hydrolysates of defatted wheat germ produced through submerged fermentations with *Bacillus subtilis*, higher DPPH-scavenging activities were observed at increasing cultivation times (LIU et al., 2017). DPPH-scavenging abilities were also demonstrated for FHs obtained through feathers bioprocessing by, for

instance, *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7 (KSHETRI et al., 2018) and *Bacillus pumilus* A1 (FAKHFAKH et al., 2011).

Differences in antioxidant ability as a function of cultivation time were not as marked between different FHs when assessed through the ABTS method (Figure 3b). Steep increases on ABTS<sup>•+</sup> scavenging were observed up to 3 days on FB10-FB40, followed by slighter elevations on scavenging percentages at increased cultivation times. In FB50, scavenging increases were noticeable between days 1 and 4. FH collected from FB40 exhibited increased scavenging (87%) after 7 days of cultivation (Figure 3b). ABTS<sup>•+</sup> quenching also reached values near 90% for FHs derived from feathers conversion by *Chryseobacterium* sp. kr6 (FONTOURA et al., 2014).

Of note, capture of ABTS<sup>•+</sup> reached 80.3% after 5 days (Figure 3b), corresponding to the scavenging ability of 5.97 mg/mL of ascorbic acid. Such potential was higher than that observed for different fractions (obtained through ultrafiltration) of a FH obtained with *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (YEO et al., 2018). The ability to quench ABTS<sup>•+</sup> was reported for a FH obtained with *Kocuria rhizophila* p3-3 (ŁABA et al., 2018), and feather meal hydrolysate produced by *Bacillus* sp. P45 (LEMES et al., 2016b).

Regarding the Fe<sup>2+</sup>-chelating ability of FHs produced by *Bacillus* sp. CL18, substantial increases were observed after 2 days of cultivation on FB20-FB40, and after 3 days on FB50. Chelation of Fe<sup>2+</sup> was significantly lower in FB10 than in the other FHs (Figure 3c). FHs obtained after 5 days of cultivation with *Bacillus* sp. CL18 in FB40 showed a maximal Fe<sup>2+</sup>-chelation of 91.4%, equivalent to 0.73 mg/mL of EDTA. At the end of cultivations, FHs obtained in FB20-FB50 displayed similar chelating potentials (> 90%; Figure 3c). The ability to chelate Fe<sup>2+</sup> is scarcely reported for FHs. Only Fakhfakh et al. (2012) indicated that microbial conversion of feathers, using *Bacillus pumilus* A1, resulted in FH with such capability. Hydrolysates obtained through microbial processing of a different keratin-rich material, wool waste, also displayed the ability to chelate ferrous ions (FAKHFAKH et al., 2013).

Reducing power of FHs was higher in FB40 and lower in FB10 after 7 days of cultivation. However, FHs obtained after 5 days displayed increasing Abs<sub>700</sub> in the order FB40 > FB20 > FB30 (Figure 3d), corresponding to the reducing power of 0.11, 0.10, and 0.09 mg/mL of BHT, respectively. Reduction of Fe<sup>3+</sup> was reported for FHs produced by *Kocuria rhizophila* p3-3 (ŁABA et al., 2018), *Bacillus* strains

(FAKHFAKH et al., 2011; WAN et al., 2016), and for wool wastes hydrolysate produced through bioconversion by *Bacillus pumilus* A1 (FAKHFAKH et al., 2013). The reducing power of fish meat hydrolysates obtained with *Bacillus subtilis* A26 (JEMIL et al., 2014) was similar to FHs obtained in FB20-FB40 (Figure 3d).

Enhanced reducing power and Fe<sup>2+</sup>-chelating ability at higher cultivation times were observed for microbial hydrolysates of defatted wheat germ (LIU et al., 2017). A fermented peanut meal produced using *Bacillus subtilis* also showed reducing power, radical-scavenging and Fe<sup>2+</sup>-chelating ability (ZHANG et al., 2014). However, microbial hydrolysis might not always result in increased bioactivities. Fermentative protein hydrolysates, prepared from cod protein hydrolysate with a *Bacillus* sp. strain, displayed increased reducing power and DPPH-scavenging activity, similar ABTS<sup>•+</sup>-scavenging and lower Fe<sup>2+</sup>-chelating activity than the starting cod protein hydrolysate (GODINHO et al., 2016).

#### DPP IV- AND ACE-INHIBITORY ACTIVITIES OF FHs

DPP IV inhibition is among the strategies investigated for the treatment of type 2 diabetes. Normally, the gastrointestinal hormones glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) are released following food intake, enhancing the secretion of insulin by  $\beta$ -cells. Although the antihyperglycemic effect of GLP-1 is maintained on type 2 diabetes, DPP IV rapidly inactivates GLP-1 and GIP. Thus, inhibition of DPP IV potentially increases GLP-1 half-life, contributing to its insulinotropic activity (POWER et al., 2014).

DPP IV-inhibitory activities are mainly reported for food protein hydrolysates and peptides, particularly those derived from milk proteins (POWER et al., 2014). However, FHs produced by *Bacillus* sp. CL18 during growth on FB10-FB50 also displayed the ability to inhibit DPP IV. FHs obtained after 5 days of submerged cultivation in FB30 and FB40 resulted in increased inhibitory potential (Figure 4a). FHs produced by *Bacillus* sp. CL33A and *Bacillus* sp. CL14 on FB10 also displayed DPP IV inhibition (Figure 4a, *inset*). Hydrolysates of protein-rich animal by-products might present DPP IV-inhibitory potential (FERRARO et al., 2016). Fontoura et al. (2014) indicated that FHs produced through microbial degradation of feathers presented DPP IV-inhibitory activities, which were lower than the presently investigated FHs.

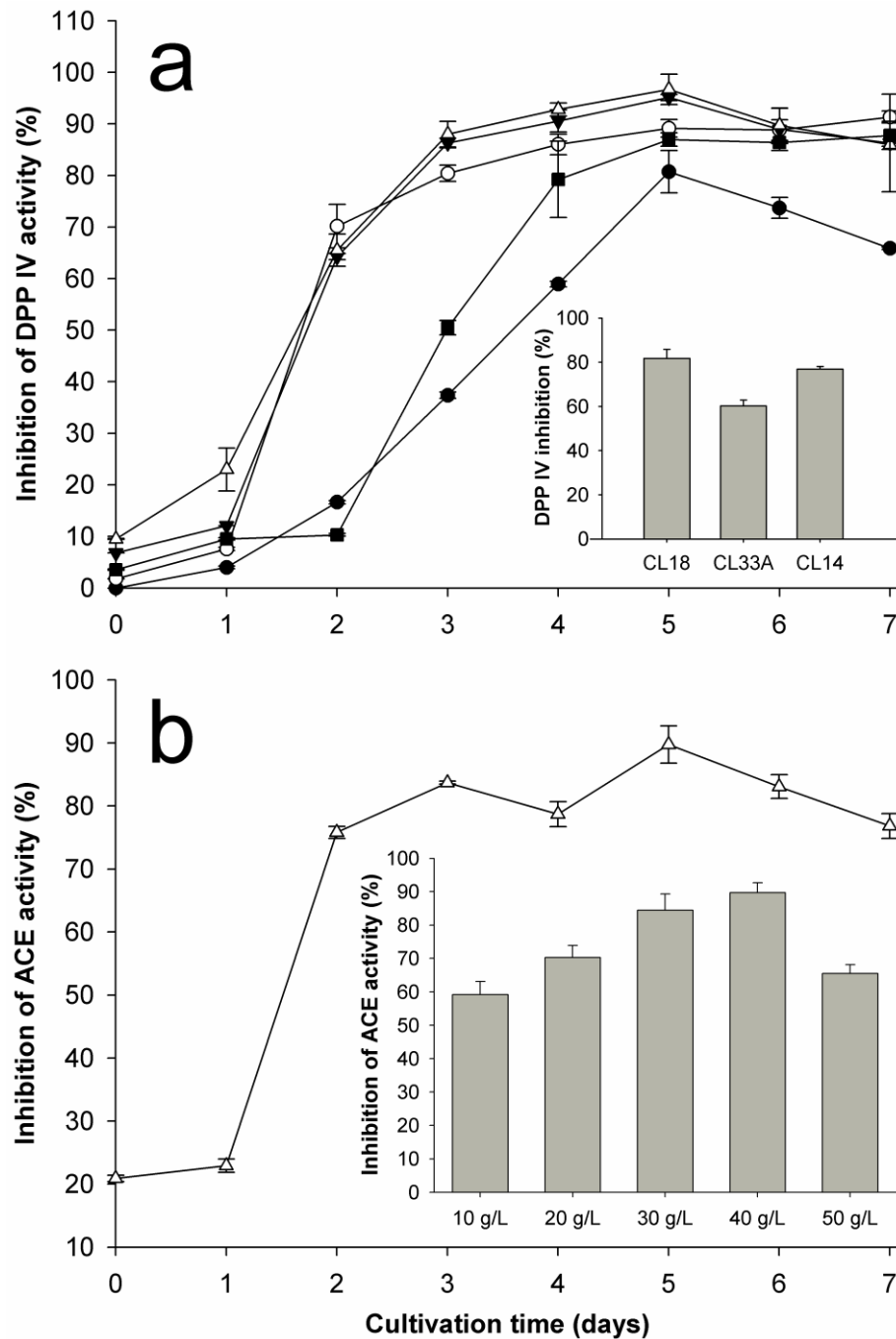


Figure 4 - Inhibition of DPP IV and ACE activities by feather hydrolysates (FH). (a) DPP IV inhibition by FH produced by *Bacillus* sp. CL18 in feather broth with different feather concentrations: 10 g/L (●), 20 g/L (○), 30 g/L (▼), 40 g/L (△), and 50 g/L (■). *Inset*: DPP IV inhibition by FH produced by strains CL18, CL33A, and CL14 after 5, 7, and 12 days of submerged cultivations in feather broth (10 g/L of feathers). (b) ACE inhibition by FH produced by *Bacillus* sp. CL18 in feather broth with 40 g/L of feathers. *Inset*: ACE inhibition by FH produced by *Bacillus* sp. CL18 after 5 days of cultivation in feather broth with different feather concentrations (10-50 g/L).

The angiotensin-converting enzyme (ACE) hydrolyzes angiotensin-I, resulting in the potent vasoconstrictor angiotensin-II; additionally, ACE inactivates the vasodilator bradykinin. Since ACE activity contributes to increased blood pressure, inhibition of this enzyme is considered a key process to treat hypertension, a condition with high prevalence in the human population which represents an important risk factor linked to cardiovascular diseases (MARTIN; DEUSSEN, 2018).

FHs obtained after 5, 7 and 12 days of cultivation with strains CL18, CL33A and CL14 on FB10 were able to inhibit ACE activity by 59.1%, 52.5%, and 49.9%, respectively (not shown). Specifically for *Bacillus* sp. CL18, FHs obtained after 5 days on FB40 inhibited ACE by 89.9% (Figure 4b), representing a higher inhibition when compared to FHs produced by this strain in FB with distinct feather concentrations (Figure 4b, *inset*). This FH had similar inhibition capacity than that of captopril at 0.001mg/mL.

Hydrolysates and peptides obtained from food proteins are being characterized as ACE inhibitors (MARTIN; DEUSSEN, 2018). However, ACE inhibition by hydrolysates of protein-rich wastes and by-products is scarcely reported (LAFARGA; HAYES, 2014; LEMES et al., 2016a). Particularly, an acid hydrolysate of feathers inhibited 48.6% of ACE activity (KARAMAĆ et al., 2005), and a FH produced through submerged cultivations with *Chryseobacterium* sp. kr6 displayed 65% of ACE inhibition (FONTOURA et al., 2014).

#### EC<sub>50</sub> AND IC<sub>50</sub> OF FEATHER HYDROLYSATES

In general, FH obtained after 5 days of cultivation with *Bacillus* sp. CL18 on FB40 displayed increased bioactive potentials (Figures 3, 4). This FH was freeze-dried to evaluate bioactivities as a function of its concentration. Dose-dependent responses were observed in all performed assays. In this case, increasing FH concentrations resulted in enhanced bioactive potentials until maximal values (depending on the assay) were reached (Figure 5). Subsequently, the EC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values were calculated from the dose-response curves.

The EC<sub>50</sub> of FH in ABTS<sup>•+</sup>, DPPH and Fe<sup>2+</sup>-chelating assays was 5.39 mg/mL, 15.12 mg/mL, and 10.50 mg/mL, respectively. Using the ABTS assay, FHs obtained with *Chryseobacterium* sp. kr6 in feather medium (50 g/L) presented EC<sub>50</sub> values of 16.0-18.3 mg/mL (FONTOURA et al., 2014), that is, possessing lower antioxidant potential than the FH obtained with *Bacillus* sp. CL18. Chicken liver hydrolysates,



produced by fermentation with *Pediococcus acidilactici* NCIM5368, presented EC<sub>50</sub> values of 1.64-1.74 mg and 7.34-9.17 mg for the DPPH and ABTS assays, respectively (CHAKKA et al., 2015).

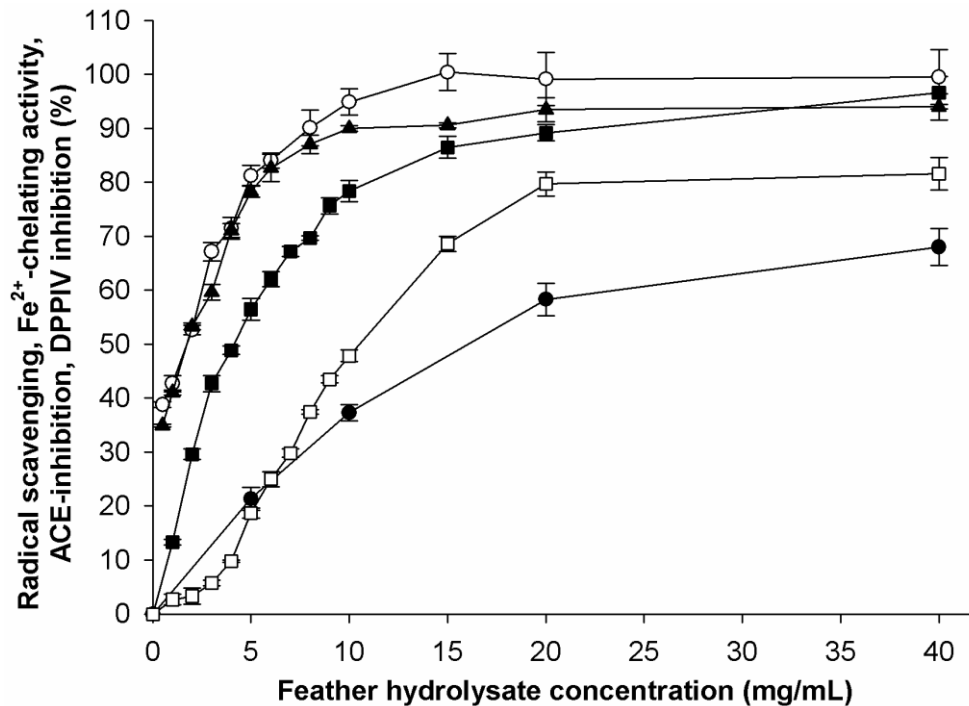


Figure 5 - Antioxidant, ACE- and DPP IV-inhibitory activities as a function of feather hydrolysate concentration. DPPH radical scavenging (●), ABTS radical scavenging (■), Fe<sup>2+</sup>-chelating ability (□), ACE-inhibitory activity (○), DPP IV-inhibitory activity (▲). Feather hydrolysates were obtained after 5 days of submerged cultivations with *Bacillus* sp. CL18 on feather broth containing 40 g/L of feathers.

Previously obtained FHs displayed EC<sub>50</sub> values for the DPPH assay that were considerably lower (FAKHFAKH et al., 2011; KSHETRI et al., 2018). However, a crude hydrolysate of feather meal, produced by enzymatic hydrolysis with a commercial protease from *Bacillus subtilis*, displayed EC<sub>50</sub> of 5.5 mg/mL using the DPPH assay (OHBA et al., 2003), and evaluation of the DPPH-scavenging activity of a tomato waste microbial hydrolysate resulted in an EC<sub>50</sub> of 8.2 mg/mL (MOAYEDI et al., 2017). Meat from different fishes, fermented by *Bacillus subtilis* A26, displayed 65-75% DPPH-scavenging at 6 mg/mL (JEMIL et al., 2014), and the DPPH EC<sub>50</sub> of skimmed milk fermented with yeasts (isolated from *chhurpi*) ranged from 3.81 to 11.70 mg (RAI et al., 2016).

Discrepancies between scavenging ability towards DPPH and ABTS radicals (Figure 3a,b; Figure 5) are not uncommon (LEMES et al., 2016b; ŁABA et al., 2018; YEO et al., 2018). Peptides within FHs might possess distinct inherent capabilities to scavenge these radicals (FONTOURA et al., 2014). However, DPPH and ABTS radicals present significant differences on their solubilities and diffusivities in reaction media. ABTS<sup>•+</sup> might be solubilized in aqueous and organic media, whereas DPPH could only be dissolved in organic media. Since the FHs were added to both assays as aqueous solutions, peptides might react more readily with ABTS<sup>•+</sup> than with DPPH, since the latter may not promptly diffuse to peptides in an aqueous environment. Therefore, the ABTS assay is regarded as a more sensitive method than the DPPH assay to evaluate the radical-scavenging potential of water-soluble proteins and peptides in aqueous solutions (TANG et al., 2010).

The Fe<sup>2+</sup>-chelating ability of FH was similar to a wool waste hydrolysate, which displayed 40% Fe<sup>2+</sup>-chelation at 8 mg/mL (FAKHFAKH et al., 2013), whereas a FH obtained with *Bacillus pumilus* A1 was able to chelate 50-65% of ferrous ions at concentrations of 3-6 mg/mL (FAKHFAKH et al., 2012). Contrarily, defatted wheat germ hydrolysates produced through fermentation with of *Bacillus subtilis* showed 81.4% of chelating effect at 50 mg/mL, with an EC<sub>50</sub> value of 27 mg/mL (LIU et al., 2017).

Inhibition of DPP IV and ACE by the FH produced by *Bacillus* sp. CL18 resulted in IC<sub>50</sub> values of 1.52 mg/mL and 1.61 mg/mL, respectively (Figure 5). This DPP IV-inhibitory activity was higher than that of FH produced by *Chryseobacterium* sp. kr6, which reached maximal inhibition of 42-45% at 20 mg/mL (FONTOURA et al., 2014). Also, DPP IV inhibition by different enzymatic hydrolysates of Atlantic salmon skin gelatin was around 15-45% at 5 mg/mL (LI-CHAN et al., 2012). Similarly to the present results, a feather meal hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis displayed ACE IC<sub>50</sub> of 1.80 mg/mL (OHBA et al., 2003), and hydrolysates of tomato waste produced through fermentation using *Bacillus subtilis* displayed ACE IC<sub>50</sub> of 1.50 mg/mL (MOAYEDI et al., 2017).

Atlantic salmon trimming protein hydrolysates, obtained with different proteases and hydrolysis times, displayed IC<sub>50</sub> in the range 0.76-1.69 mg/mL for ACE inhibition and 0.30-2.37 mg/mL for DPP IV inhibition (NEVES et al., 2017). Enzymatic hydrolysates of proteins extracted from mussel processing co-products resulted in ACE and DPP IV IC<sub>50</sub> values in the range 1.13-3.34 mg/mL and 0.33-2.43 mg/mL,

respectively (NEVES et al., 2016). At 1 mg/mL, bovine hemoglobin hydrolysates obtained with papain inhibited ACE activity by less than 10%; however, at the same concentration, the hydrolysate inhibited DPP IV by around 40%, with a DPP IV IC<sub>50</sub> of 1.10 mg/mL (LAFARGA et al., 2016).

Protein hydrolysates are complex mixtures of peptides and amino acids resulting from the cleavage of peptide bonds (HOU et al., 2017). Hydrolysis is known to enhance the levels of free amino and carboxyl groups, also exposing hydrophobic groups of amino acid residues. Increased antioxidant potentials of peptides within protein hydrolysates are commonly related to the presence of hydrophobic and/or aromatic groups of amino acid residues. Additionally, the amphiphilicity of peptides might enhance antioxidant capabilities through increments in solubility, which favors the interaction with radical species (WAN et al., 2016; ZOU et al., 2016). A high proportion of hydrophobic amino acid residues also seems to positively influence the ability of peptides to inhibit DPP IV activity, especially when positioned at the N-terminus (LI-CHAN et al., 2012; POWER et al., 2014), and peptide inhibitors of ACE usually contain hydrophobic and/or aromatic amino acid residues at their carboxyl terminus, particularly in the three C-terminal positions (MARTIN; DEUSSEN, 2018).

Feather keratins contain about 50% of hydrophobic and/or aromatic amino acid residues in their sequences (WANG et al., 2016). During growth on feather media, *Bacillus* sp. CL18 produces diverse proteases (DE OLIVEIRA et al., 2017), mainly of the serine proteases group, which cleave peptide bonds near aromatic and/or hydrophobic residues (RIEGER et al., 2017). These substrate and enzyme properties might be of relevance for the observed bioactivities, since different proteolytic enzymes result in the generation of a broad variety of peptides (MOAYEDI et al., 2017).

Beyond feathers management, added-value products could be obtained from bioconversion of these recalcitrant and abundant poultry by-products. The proposed bioprocess results in the simultaneous production of bioactive feather protein hydrolysates (Figures 3 and 4) and bacterial proteases with potential applications involving protein hydrolysis, fitting within the biorefinery concept.

The FHs produced through submerged cultivations with *Bacillus* sp. CL18 displayed enhanced *in vitro* antioxidant, antidiabetic and antihypertensive potentials, which were higher or comparable to other protein hydrolysates. Feather hydrolysates show promise, considering the increased interest on natural and easily obtainable

bioactive molecules in a scenario where appropriate management and valorization of wastes and by-products are essential elements of agro-industrial sustainability.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grant number 402631/2016-1). N. Welter and D.J. Daroit also thank CNPq for the Scientific Initiation scholarship grant (IC-CNPq). K. Callegaro thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for the post-graduation scholarship grant (DS-CAPES).

## REFERENCES

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- 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.
- CHAKKA, A. K.; ELIAS, M.; JINI, R.; SAKHARE, P. Z.; BHASKAR, N. In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 8059-8067, 2015.
- 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 & Biodegradation**, v. 64, p. 1-6, 2010.
- CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 1637-1648, 1971.
- DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 372-384, 2014.

- DE OLIVEIRA, C. T.; PELLEZ, L.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Screening of bacteria for protease production and feather degradation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, p. 447-453, 2016.
- DE OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Prospecting soil bacteria from subtropical Brazil for hydrolases production. **Biologia**, v. 72, p. 130-139, 2017.
- FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; HADDAR, A.; MNIF, I. H.; DAHMEN, I.; NASRI, M. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1731-1737, 2011.
- FAKHFAKH, N.; GARGOURI, M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; EL FEKI, A.; NASRI, M. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 938-949, 2012.
- FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; SIALA, R.; NASRI, M. 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, p. 424-433, 2013.
- FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTÉ-LHOUELIER, V. The “sisters”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: functionality, bioactivity and trends of application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 65-75, 2016.
- FONTOURA, R.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; MEIRA, S. M. M.; MOSQUERA, M.; BRANDELLI, A. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New Biotechnology**, v. 31, p. 506-513, 2014.
- GODINHO, I.; PIRES, C.; PEDRO, S.; TEIXEIRA, B.; MENDES, R.; NUNES, M. L.; BATISTA, I. Antioxidant properties of fish protein hydrolysates prepared from cod protein hydrolysate by *Bacillus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 1095-1112, 2016.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57(suppl), 715S-725S, 1993.

- HOU, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; WANG, G.; WU, G. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, article 24, 2017.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária, Março 2018**. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Available at: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2018\\_mar.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_mar.pdf). Accessed in: 08 may 2018. In Portuguese.
- IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindústrias associadas**. Brasília: IPEA, 2012. In Portuguese.
- JEMIL, I.; JRIDI, M.; NASRI, R.; KTARI, N.; SALEM, R. B. S. -B.; MEHIRI, M.; HAJJI, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 963-972, 2014.
- KARAMAĆ, M.; FLACZYK, E.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; AMAROWICZ, R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hydrolysates obtained from muscle food industry by-products – a short report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14/55, p. 133-138, 2005.
- KSHETRI, P.; ROY, S. S.; SHARMA, S. K.; SINGH, T. S.; ANSARI, M. A.; PRAKASH, N.; NGACHAN, S. V. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. **Waste and Biomass Valorization**, 2018. doi:10.1007/s12649-017-0037-4.
- ŁABA, W.; ŻAROWSKA, B.; CHORAŻYK, D.; PUDŁO, A.; PIEGZA, M.; KANCELISTA, A.; KOPEĆ, W. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. **AMB Express**, v. 8, article 9, 2018.
- LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, p. 227-239, 2014.
- LAFARGA, T.; RAI, D. K.; O'CONNOR, P.; HAYES, M. Generation of bioactive hydrolysates and peptides from bovine hemoglobin with *in vitro* renin, angiotensin-I-converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activities. **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, p. 673-685, 2016.

- LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552-565, 2013.
- LEMES, A. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; EGEA, M. B.; FERNANDES, K. F. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, article 950, 2016a.
- LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; EGEA, M. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 210-216, 2016b.
- LI-CHAN, E. C. Y.; HUNAG, S. -L.; JAO, C. -L.; HO, K. -P.; HSU, K. -C. Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 973-978, 2012.
- LIU, F.; CHEN, Z.; SHAO, J.; WANG, C.; ZHAN, C. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. **Food Bioscience**, v. 20, p. 141-148, 2017.
- MARTIN, M.; DEUSSEN, A. Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018. doi:10.1080/10408398.2017.1402750.
- MOAYEDI, A.; MORA, L.; ARISTOY, M. -C.; HASHEMI, M.; SAFARI, M.; TOLDRÁ, F. ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fragments obtained from tomato processing by-products fermented using *Bacillus subtilis*: Effect of amino acid composition and peptides molecular mass distribution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 48-64, 2017.
- NEVES, A. C.; HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory, and antioxidant activities of a mussel meat protein extract and its hydrolysates. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, p. 1221-1233, 2016.
- NEVES, A. C.; HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 396-405, 2017.
- OHBA, R.; DEGUCHI, T.; KISHIKAWA, M.; ARSYAD, F.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Physiological functions of enzymatic hydrolysates of collagen or keratin contained

- in livestock and fish waste. **Food Science and Technology Research**, v. 9, p. 91-93, 2003.
- POWER, O.; NONGONIERMA, A. B.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 34-46, 2014.
- RAI, A. K.; KUMARI, R.; SANJUKTA, S.; SAHOO, D. Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft *chhurpi*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 239-245, 2016.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- REDDY, N. Non-food industrial applications of poultry feathers. **Waste Management**, v. 45, p. 91-107, 2015.
- RIEGER, T. J.; DE OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, p. 329-335, 2017.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.
- STIBOROVA, H.; BRANSKA, B.; VESELA, T.; LOVECKA, P.; STRANSKA, M.; HAJŠLOVA, J.; JIRU, M.; PATAKOVA, P.; DEMNEROVA, K. Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 1629-1637, 2016.
- TANG, X.; HE, Z.; DAI, Y.; XIONG, Y. L.; XIE, M.; CHEN, J. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 587-593, 2010.
- VILLA, A. L. V.; ARAGÃO, M. R. S.; SANTOS, E. P.; MAZOTTO, A. M.; ZINGALI, R. B.; SOUZA, E. P.; VERMELHO, A. B. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. **BMC Biotechnology**, v. 13, article 15, 2013.



- WAN, M. -Y.; DONG, G.; YANG, B. -Q.; FENG, H. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysate. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 643-649, 2016.
- WANG, B.; YANG, W.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, p. 229-318, 2016.
- YEO, I.; LEE, Y. -J.; SONG, K.; JIN, H. -S.; LEE, J. -E.; KIM, D.; LEE, D. -W.; KANG, N. J. Low-molecular weight keratins with anti-skin aging activity produced by anaerobic digestion of poultry feathers with *Fervidobacterium islandicum* AW-1. **Journal of Biotechnology**, v. 271, p. 17-25, 2018.
- ZHANG, Y.; LIU, J.; LU, X.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X.; QI, X.; QIAN, H. Isolation and identification of an antioxidant peptide prepared from fermented peanut meal using *Bacillus subtilis* fermentation. **International Journal of Food Properties**, v. 17, p. 1237-1253. 2014.
- ZHANG, Y.; CHEN, R.; MA, H.; CHEN, S. Isolation and identification of dipeptidyl peptidase iv-inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 8819-8828, 2015.
- ZOU, T. -B.; HE, T. -P.; LI, H. -B.; TANG, H. -W.; XIA, E. -Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, article 72, 2016.

### 3.2 RESULTADOS II

A atividade proteolítica dos sobrenadantes de cultivo em caldo pena (FB) foi avaliada anteriormente ao tratamento térmico empregado para obtenção dos hidrolisados de pena. Azocaseína (10 g/L) foi utilizada como substrato enzimático, em experimentos realizados a 55°C, pH 8,0, por 10 min. Após a finalização das reações e centrifugação do meio reacional, a absorbância dos sobrenadantes dos ensaios foi mensurada em espectrofotômetro a 420 nm. Uma unidade de protease foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 unidades (CORRÊA et al., 2010).

Em relação às três linhagens queratinolíticas de *Bacillus*, a produção de proteases extracelulares durante os cultivos submersos em FB contendo 10 g/L de penas de frango (FB10) foi maior por *Bacillus* sp. CL18, seguido por *Bacillus* sp. CL14 e *Bacillus* sp. CL33A (Figura 1). A produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 em FB10 aumentou em função do tempo de incubação e solubilização das penas, especialmente a partir de três dias de cultivos, atingindo o pico de produção (845 U/mL) aos cinco dias, e decrescendo em seguida (Figura 1a). A produção máxima de proteases foi alcançada em cultivos de sete dias (495 U/mL) e de 12 dias (600 U/mL) em FB10 por *Bacillus* sp. CL33A (Figura 1b) e por *Bacillus* sp. CL14 (Figura 1c), respectivamente.

Foi possível observar uma correlação entre o aumento da produção de proteases e a degradação das penas por essas linhagens de *Bacillus* spp. (Seção 3.1), indicando o papel da secreção de enzimas proteolíticas neste processo, relacionado à nutrição e crescimento microbianos. De fato, embora não seja completamente compreendido, o processo de queratinólise microbiana parece depender, pelo menos em parte, da ação sinérgica de enzimas proteolíticas extracelulares e sistemas sulfitolíticos (LANGE et al., 2016). Assim, estes mecanismos complementares atuam sobre o substrato, liberando peptídeos e aminoácidos, que se acumulam no meio, e são passíveis de absorção pelo microrganismo (VASILEVA-TONKOVA et al., 2009).

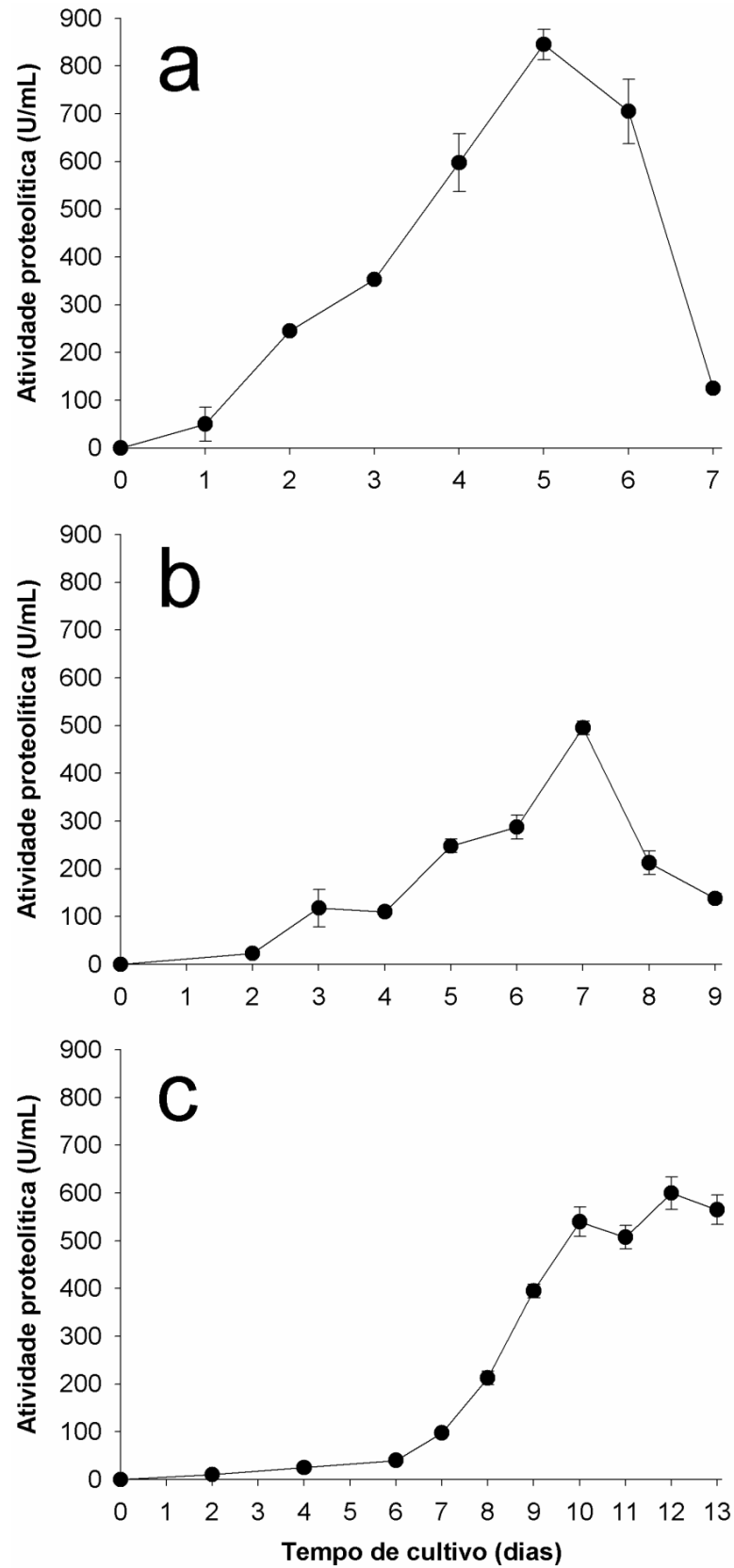


Figura 1 - Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 (a), *Bacillus* sp. CL33A (b) e *Bacillus* sp. CL14 (c), em cultivos submersos realizados em caldo pena contendo 10 g/L de penas de frango.

Considerando os resultados apresentados na Seção 3.1, e mediante a tendência para maior produção de enzimas em FB10 por *Bacillus* sp. CL18, a produção de proteases extracelulares por essa linhagem foi investigada em meios com maiores concentrações de penas (20-50 g/L). As atividades proteolíticas mais elevadas nos diferentes FBs foram alcançadas em cultivos de cinco dias em FB10 e FB50, em cultivos de seis dias em FB20, FB30 e FB40 (Figura 2).

*Bacillus* sp. CL18 apresentou a maior produção de enzimas azocaseinolíticas (1555 U/mL) durante cultivos submersos em FB30. Em FB40 e FB20, os picos de atividade variaram entre 1390 U/mL e 1410 U/mL, respectivamente. O incremento da concentração inicial de penas, de 10 g/L a 40 g/L, tendeu a resultar em maior produção de proteases; contudo, menor atividade proteolítica foi detectada em meio contendo 50 g/L de penas (Figura 2).

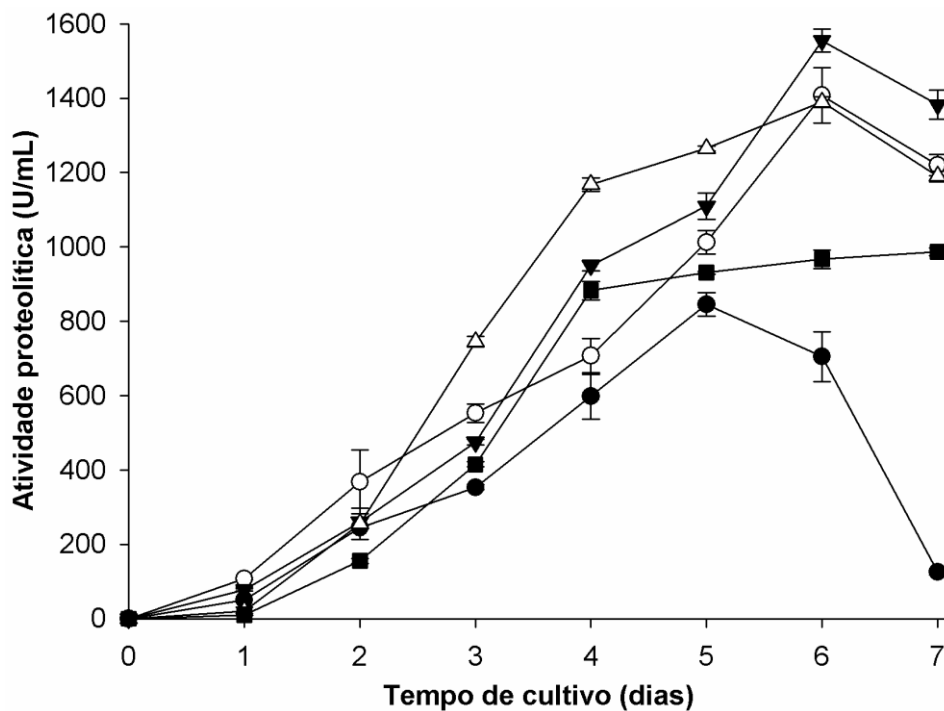


Figura 2 - Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 durante cultivos submersos em caldo pena contendo diferentes concentrações de penas de frango: 10 g/L (●), 20 g/L (○), 30 g/L (▼), 40 g/L (△), e 50 g/L (■).

Diversas investigações também verificaram a maior atividade enzimática com o aumento da concentração de substratos até uma determinada concentração

(FAKHFAKH et al., 2011; STIBOROVA et al., 2016). Concentrações mais elevadas de penas, especificamente em FB50, também podem atuar de forma negativa na produção enzimática, através da inibição pelo substrato e/ou repressão catabólica (GUPTA; RAMNANI, 2006). No entanto, a menor produção de protease neste meio (FB50) pode ter ocorrido pela maior viscosidade do meio e limitação da transferência de oxigênio para o meio de cultura (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

Além disso, após atingir níveis máximos, também foram observados declínios na produção de proteases ao final dos cultivos em FB10-FB40 (Figuras 1 e 2). Este comportamento pode ter resultado da escassez de substratos e/ou da inacessibilidade aumentada dos fragmentos de penas remanescentes (FONTOURA et al., 2014); ainda, pode ser consequência de um processo de autólise enzimática, desencadeado devido à ampla produção de proteases com atividades inespecíficas (DAROIT et al., 2012).

De todo modo, o incremento da produção de proteases foi aparentemente relacionado à maior degradação real (g/L) das penas de frango contidas nos FBs e à liberação de proteínas solúveis, que por sua vez afetou as bioatividades dos hidrolisados de penas (Seção 3.1). As proteases brutas produzidas por *Bacillus* sp. CL18 e *Bacillus* sp. CL33A, previamente caracterizadas, apresentam atividade ótima em condições moderadas de temperatura e pH, e demonstram potencial como biocatalisadores para a hidrólise de diversas proteínas (DE OLIVEIRA et al., 2017; RIEGER et al., 2017). Logo, a partir da degradação microbiana de penas é possível obter proteases de interesse biotecnológico e hidrolisados proteicos bioativos.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A biodegradação de penas por bactérias queratinolíticas do gênero *Bacillus*, mediada pela produção de proteases extracelulares, resultou em hidrolisados proteicos bioativos.

A notável capacidade de *Bacillus* sp. CL18 em hidrolisar penas de frango inteiras, durante cultivos submersos, originou hidrolisados que apresentaram as mais promissoras propriedades antioxidantes, conforme avaliado pelos ensaios de captura de radicais livres sintéticos (ABTS e DPPH), atividade quelante de  $Fe^{2+}$  e poder redutor. De forma complementar, a inibição *in vitro* das enzimas DPP IV e ACE indicaram as capacidades antidiabética e antihipertensiva, respectivamente, dos hidrolisados de pena.

O potencial bioativo dos hidrolisados de pena, particularmente aquele produzido por *Bacillus* sp. CL18 em meio contendo 40 g/L de penas, foi superior ou comparável a hidrolisados produzidos a partir de penas, a partir de outros subprodutos proteicos e mesmo produzidos a partir de proteínas alimentares.

Considerando a continua expansão e desenvolvimento da indústria avícola, e as enormes quantidades de penas produzidas durante o processamento de aves para obtenção de carne, a utilização destes subprodutos recalcitrantes para a produção de hidrolisados proteicos através de abordagens biotecnológicas pode ser significativa para o manejo e valorização das penas. Logo, processos de bioconversão microbiana de penas ampliam as alternativas de recuperação eficiente e sustentável destes recursos proteicos, que podem assim ser consideradas como matérias-primas subexploradas.

As bioatividades de hidrolisados de pena, ora demonstradas, são reportadas de forma escassa na literatura científica. Estes hidrolisados podem representar uma fonte relevante de moléculas bioativas naturais, levando em consideração também a facilidade do processo de obtenção. Como hidrolisados brutos, estes poderiam ser utilizados, por exemplo, para nutrição animal. Ainda, surgem como perspectivas a identificação e caracterização dos peptídeos responsáveis pelas bioatividades observadas, que podem apresentar potencial significância no contexto da saúde humana e qualidade alimentar.

## REFERÊNCIAS

- ADETUNJI, C. O.; MAKANJUOLA, O. R.; AROWORA, K. A.; AFOLAYAN, S. S.; ADDETUNJI, J. B. Production and application of keratin-based organic fertilizer from microbially hydrolyzed feathers to cowpea (*Vigna unguiculata*). **International Journal of Scientific and Engineering Research**, v. 3, p. 1-9, 2012.
- ARAI, K. M.; TAKAHASHI, R.; YOKOTE, Y.; AKAHANE, K. Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. **European Journal of Biochemistry**, v. 132, p. 501-507, 1983.
- BÁLINT, B.; BAGI, Z.; TÓTH, A.; RÁKHELY, G.; PEREI, K.; KOVÁCS, K. L. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 404-410, 2005.
- BARBA, C.; MÉNDEZ, S.; RODDICK-LANZILOTTA, A.; KELLY, R.; PARRA, J. L.; CODERCH, L. Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. **Skin Research and Technology**, v. 14, p. 243-248, 2008.
- BENESOVA, P.; KUCERA, D.; MAROVA, I.; OBRUCA, S. Chicken feather hydrolysate as an inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, p. 182-188, 2017.
- BERTSCH, A.; COELLO, N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1703-1708, 2005.
- BHANGE, K.; CHATURVEDI, V.; BHATT, R. Ameliorating effects of chicken feathers in plant growth promotion activity by a keratinolytic strain of *Bacillus subtilis* PF1. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, p. 1-10, 2016.
- BHAVSAR, P. S.; ZOCCOLA, M.; PATRUCCO, A.; MONTARSOLO, A.; MOSSOTTI, R.; ROVERO, G.; GIANSETTI, M.; TONIN, C. Superheated water hydrolysis of waste wool in a semi-industrial reactor to obtain nitrogen fertilizers. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, p. 6722-6731, 2016.
- BHAVSAR, P.; ZOCCOLA, M.; PATRUCCO, A.; MONTARSOLO, A.; ROVERO, G.; TONIN, C. Comparative study on the effects of superheated water and high temperature alkaline hydrolysis on wool keratin. **Textile Research Journal**, v. 87, p. 1696-1705, 2017.
- BOSE, A.; PATHAN, S.; PATHAK, K.; KEHARIA, H. Keratinolytic protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B using feather meal as substrate and application of feather hydrolysate as organic nitrogen input for agricultural soil. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 595-605, 2014.
- BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735-1750, 2010.
- BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, J. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3-12, 2015a.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015b.

- CAO, Z. J.; LU, D.; LUO, L. S.; DENG, Y. X.; BIAN, Y. G.; ZHANG, X. Q.; ZHOU, M. H. Composition analysis and application of degradation products of whole feathers through a large scale of fermentation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2690-2696, 2012.
- CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.8, p. 345-358, 2009.
- CHOI, J. M.; NELSON, P. V. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. Using poultry feathers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, p. 634-638, 1996.
- CHOIŃSKA, A.; ŁABA, W.; RODZIEWICZ, A.; BOGACKA, A. Proteolysis of chicken feather keratin using extra-cellular proteolytic enzymes of *Bacillus cereus* B5E/SZ strain. **Żywność. Nauka. Technologia. Jakość**, v. 6, p. 204-213, 2011.
- COLLA, G.; NARDI, S.; CARDARELLI, M.; ERTANI, A.; LUCINI, L.; CANAGUIER, R.; ROUPHAEL, Y. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 28-38, 2015.
- CONTRERAS, M. M.; CARRÓN, R.; MONTERO, M. J.; RAMOS, M.; RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 566-573, 2009.
- 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 & Biodegradation**, v. 64, p. 1-6, 2010.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J. G.; MEIRA, S. M. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2247-2254, 2011.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.
- COWARD-KELLY, G.; CHANG, V. S.; AGBOGBO, F. K.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1337-1343, 2006.
- DALEV, P. An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 71-72, 1990.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; CANALES, M. M.; COELHO, J. G.; HIDALGO, M. E.; TICHOTA, D. M.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science and Technology**, v. 92, p. 335-351, 2012.
- DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 372-384, 2014.
- DE OLIVEIRA, C. T.; RIEGER, T. J.; DAROIT, D. J. Catalytic properties and thermal stability of a crude protease from the keratinolytic *Bacillus* sp. CL33A. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 270-277, 2017.



- DI BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; NEILL, E. O.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1296-1307, 2011.
- DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 368, p. 1696-1705, 2006.
- EREMEEV, N. L.; NIKOLAEV, I. V.; KERUCHEN'KO, I. D.; STEPANOVA, E. V.; SATRUTDINOV, A. D.; ZINOV'EV, S. V.; ISMAILOVA, D. YU.; KHOTCHENKOV, V. P.; TSURIKOVA, N. V.; SINITSYN, A. P.; VOLIK, V. G.; KOROLEVA, O. V. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing stock for obtaining protein hydrolysates. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, p. 648-655, 2009.
- ESCUADERO, E.; MORA, L.; FRASER, P. D.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1282-1288, 2013.
- FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; HADDAR, A.; MNIF, I. H.; DAHMEN, I.; NASRI, M. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1731-1737, 2011.
- FAKHFAKH, N.; GARGOURI, M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; EL FEKI, A.; NASRI, M. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 938-949, 2012.
- FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; SIALA, R.; NASRI, M. 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, p. 424-433, 2013.
- FERNANDES, M. M.; LIMA, C. F.; LOUREIRO, A.; GOMES, A. C.; CAVACO-PAULO, A. Keratin-based peptide: biological evaluation and strengthening properties on relaxed hair. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, p. 338-346, 2012.
- FERRARO, V.; ANTON, M.; SANTÉ-LHOUELLIER, V. The "sisters"  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: functionality, bioactivity and trends of application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 65-75, 2016.
- FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A.; WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 980-988, 2004.
- FONTOURA, R.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; MEIRA, S. M. M.; MOSQUERA, M.; BRANDELLI, A. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New Biotechnology**, v. 31, p. 506-513, 2014.
- FORGÁCS, G.; ALINEZHAD, S.; MIRABDOLLAH, A.; FEUK-LAGERSTEDT, E.; HORVÁTH, I. S. Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, p. 1747-1753, 2011.
- FORGÁCS, G.; LUNDIN, M.; TAHERZADEH, M. J.; SÁRVÁRI HORVÁTH, I. Pretreatment of chicken feather waste for improved biogas production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 2016-2028, 2013.
- FREEMAN, S. R.; POORE, M. H.; MIDDLETON, T. F.; FERKET, P. R. Alternative methods for disposal of spent laying hens: Evaluation of the efficacy of grinding,

- mechanical deboning, and of keratinase in the rendering process. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4515-4520, 2009.
- GARCIA, R. A.; PYLE, D. J.; PIAZZA, G. J.; WEN, Z. Hydrolysis of animal protein meals for improved utility in non-feed applications. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 27, p. 269-275, 2011.
- GIONGO, J. L.; LUCAS, F. S.; CASARIN, F.; HEEB, F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 375-382, 2007.
- GOUSTEROVA, A.; NUSTOROVA, M.; PASKALEVA, D.; NAYDENOV, M.; NESHEV, G.; VASILEVA-TONKOVA, E. Assessment of feather hydrolysate from thermophilic actinomycetes for soil amendment and biological control application. **International Journal of Environmental Research**, v. 5, p. 1065-1070, 2011.
- GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; DE JONG, E. V.; BRANDELLI, A. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. **Science and Technology**, v. 126, p. 135-144, 2006.
- GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F. A.; JONG, E. V.; BRANDELLI, A. Poultry feather hydrolysate as a protein source for growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 61-67, 2008.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.
- GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 9931-9940, 2013a.
- GUPTA, R.; SHARMA, R.; BEG, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, p. 216-228, 2013b.
- GURAV, R. G.; JADHAV, J. P. A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 4532-4539, 2013.
- HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 7-15, 2008.
- HAQUE, E.; CHAND, R.; KAPILA, S. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. **Food Reviews International**, v. 25, p. 28-43, 2009.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.
- HATANAKA, T.; INOUE, Y.; ARIMA, J.; KUMAGAI, Y.; USUKI, H.; KAWAKAMI, K.; KIMURA, M.; MUKAIHARA, T. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v. 134, p. 797-802, 2012.
- HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from Fish Processing Co-Products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, p. 289-297, 2013.
- HOLKAR, C. R.; JADHAV, A. J.; BHAVSAR, P. S.; KANNAN, S.; PINJARI, D. V.; PANDIT, A. B. Acoustic cavitation assisted alkaline hydrolysis of wool based keratins to produce organic amendment fertilizers. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, p. 2789-2796, 2016.

- HONG, F.; MING, L.; YI, S.; ZHANXIA, L.; YONGQUAN, W.; CHI, L. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs?. **Peptides**, v. 29, p. 1062-1071, 2008.
- HOU, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; WANG, G.; WU, G. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1-13, 2017.
- HU, Y.; CHENG, H.; TAO, S. Environmental and human health challenges of industrial livestock and poultry farming in China and their mitigation. **Environment International**, v. 107, p. 111-130, 2017.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1853, 2005.
- HUANG, S. -L.; JAO, C. -L.; HO, K. -P.; HSU, K. -C. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. **Peptides**, v. 35, p. 114-121, 2012.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária, Março 2018**. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2018\\_mar.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_mar.pdf)>. Acesso em: 08 maio 2018.
- IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindústrias associadas**. Brasília: IPEA, 2012.
- IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 114-134, 2014.
- JAIN, R.; JAIN, A.; RAWAT, N.; NAIR, M.; GUMASHTA, R. Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: a potential low cost soil amendment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, p. 672-677, 2016.
- JAO, C. -L.; HUNG, C. -C.; TUNG, Y. -S.; LIN, P. -Y.; CHEN, M. -C.; HSU, K. -C. The development of bioactive peptides from dietary proteins as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the management of type 2 diabetes. **Biomedicine**, v. 5, p. 9-15, 2015.
- JONES, L. N.; SINCLAIR, R. D.; CARVER, J.; ECROYD, H.; LUI, Y.; BENNETT, L. E. Bioprospecting keratinous materials. **International Journal of Trichology**, v. 2, p. 47-49, 2010.
- KARAMAĆ, M.; FLACZYK, E.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; AMAROWICZ, R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hydrolysates obtained from muscle food industry by-products – a short report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14/55, p. 133-138, 2005.
- KAZAKOS, K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 93, p. 32-36, 2011.
- KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 318-327, 2011.
- KHARDENAVIS, A. A.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J. Processing of poultry feathers by alkaline keratinhydrolyzing enzymes from *Serratia* sp. HPC1383. **Waste Management**, v. 29, p. 1409-1415, 2009.

- KIM, W. K.; LORENZ, E. S.; PATTERSON, P. H. Effect of enzymatic and chemical treatments on feather solubility and digestibility. **Poultry Science**, v. 81, p. 95-98, 2002.
- KIM, J. M.; CHOI, Y. M.; SUH, H. J. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus pumilus* KHS-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 472-476, 2005.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.
- KORNÍŁOWICZ-KOWALSKA, T., BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, p. 1689-1701, 2011.
- KSHETRI, P.; ROY, S. S.; SHARMA, S. K.; SINGH, T. S.; ANSARI, M. A.; PRAKASH, N.; NGACHAN, S. V. 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. 1, p. 1-11, 2018.
- KUCINSKA, J. K.; MAGNUCKA, E. G.; OKSINSKA, M. P.; PIETR, S. J. Bioefficacy of hen feather keratin hydrolysate and compost on vegetable plant growth. **Compost Science and Utilization**, v. 22, p. 179-187, 2014.
- KUMAR, A. G.; SWARNALATHA, S.; GAYATHRI, S.; NAGESH, N.; SEKARAN, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 411-419, 2008.
- KUMAR, D. J. M.; PRIYA, P.; BALASUNDARI, S. N.; DEVI, G. S. D. N.; REBECCA, A. I. N.; KALAICHELVAN, P. T. Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* sp. MPTK6 and its antioxidant potential. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, p. 900-907, 2012.
- ŁABA, W.; SZCZEKAŁA, K. B. Keratinolytic proteases in biodegradation of pretreated feathers. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 22, p. 1101-1109, 2013.
- ŁABA, W.; ŻAROWSKA, B.; CHORAŻYK, D.; PUDŁO, A.; PIEGZA, M.; KANCELISTA, A.; KOPEĆ, W. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. **AMB Express**, v. 8, p. 1-14, 2018.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 403-422, 2012.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7500-7506, 2013.
- LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, p. 227-239, 2014.
- LAI, H. Y.; WANG, S.; SINGH, V.; NGUYEN, L. T. H.; NG, K. W. Evaluating the antioxidant effects of human hair protein extracts. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 29, p. 1081-1093, 2018.
- LAMMI, C.; ZANONI, C.; ARNOLDI, A.; VISTOLI, G. Peptides derived from soy and lupin protein as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors: *in vitro* biochemical screening and *in silico* molecular modeling study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 9601-9606, 2016.

- 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, p. 2083-2096, 2016.
- LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552-565, 2013.
- LEE, J. S.; YOO, M. A.; KOO, S. H.; BAEK, H. H.; LEE, H. G. Antioxidant and ACE inhibitory activities of soybean hydrolysates: effect of enzyme and degree of hydrolysis. **Food Science Biotechnology**, v. 17, p. 873-877, 2008.
- LEE, Y., S.; PHANG, L. Y.; AHMAD, S. A.; OOI, P. T. Microwave-alkali treatment of chicken feathers for protein hydrolysate production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, p. 1147-1157, 2016.
- LEMES, A. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; EGEEA, M. B.; FERNANDES, K. F. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-24, 2016a.
- LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; EGEEA, M. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 210-216, 2016b.
- LI, M. H.; ROBINSON, E. H.; BOSWORTH, B. G.; OBERLE, D. F.; LUCAS, P. M. Evaluation of hydrolyzed poultry feathers as a dietary ingredient for pond-raised channel catfish. **North American Journal of Aquaculture**, v. 75, p. 85-89, 2013.
- LI-CHAN, E. C. Y.; HUNAG, S. -L.; JAO, C. -L.; HO, K. -P.; HSU, K. -C. Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 973-978, 2012.
- LIN, C. C.; LIANG, J. H. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. **Journal of Food Science**. v. 67, p. 530-533, 2002.
- LIU, R.; XING, L.; FU, Q.; ZHOU, G.; ZHANG, W. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. **Antioxidants**, v. 5, p. 1-15, 2016.
- LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OTTE, J.; VAN CAMP, J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1277-1293, 2006.
- MACIEL, J. L.; WERLANG, P. O.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of protein-rich hydrolysates produced through microbial conversion of waste feathers. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1177-1186, 2017.
- MAEZAKI, H.; BANNO, Y.; MIYAMOTO, Y.; MORITOU, Y.; ASAKAWA, T.; KATAOKA, O.; TAKEUCHI, K.; SUZUKI, N.; IKEDO, K.; KOSAKA, T.; SASAKI, M.; TSUBOTANI, S.; TANI, A.; FUNAMI, M.; YAMAMOTO, Y.; TAWADA, M.; AERTGEERTS, K.; YANO, J.; OI, S. Discovery of potent, selective, and orally bioavailable quinoline-based dipeptidyl peptidase IV inhibitors targeting Lys554. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4482-4498, 2011.
- MARTIN, M.; DEUSSEN, A. Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 20 pp., 2018.

- MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: a review. **Food Research International**, v. 73, p. 204-212, 2015.
- MAZOTTO, A. M.; ASCHERI, J. L. R.; GODOY, R. L. O.; DAMASO, M. C. T.; VERMELHO, A. B. Production of feather protein hydrolyzed by *B. subtilis* AMR and its application in a blend with cornmeal by extrusion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 701-709, 2017.
- MCCARTHY, A. L.; O'CALLAGHAN, Y. C.; O'BRIEN, N. M. Protein hydrolysates from agricultural crops - bioactivity and potential for functional food development. **Agriculture**, v. 3, p. 112-130, 2013.
- MCINTOSH, C. H. S.; DEMUTH, H.-U.; POSPISILIK, J. A.; PEDERSON, R. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: How do they work as new antidiabetic agents?. **Regulatory Peptides**, v. 128, p. 159-165, 2005.
- MEIRA, S. M.; DAROIT, D. J.; HELFER, V. E.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; CARRO, S.; BRANDELLI, A. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, v. 48, p. 322-329, 2012.
- MENDOZA, R.; DIOS, A.; VAZQUEZ, C.; CRUZ, E.; RICQUE, D.; AGUILERA, C.; MONTEMAYOR, J. Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolysates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the pacific-white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 1-9, 2000.
- MOKREJS, P.; SVOBODA, P.; HRNCIRIK, J.; JANACOVA, D.; VASEK, V. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. **Waste Management and Research**, v. 29, p. 260-267, 2011.
- MOKREJS, P.; HUTTA, M.; PAVLACKOVÁ, J.; EGNER, P. Preparation of keratin hydrolysate from chicken feathers and its application in cosmetics. **Journal of Visualized Experiments**, v. 129, p. 1-9, 2017.
- MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive Peptides and Proteins from Foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, p. 171-182, 2008.
- MORA, L.; REIG, M.; TOLDRÁ, F. Bioactive peptides generated from meat industry by-products. **Food Research International**, v. 65, p. 344-349, 2014.
- NÄÄS, I. A.; MOLLO NETO, M.; CANUTO, S.A.; WAKER, R.; OLIVEIRA, D. R. M. S.; VENDRAMETTO, O. Brazilian chicken meat production chain: a 10-year overview. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, p. 87-94, 2015.
- NEVES, A. C.; HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 396-405, 2017.
- NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and anti-oxidant properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. **Peptides**, v. 39, p. 157-163, 2013.
- NONGONIERMA, A. B.; MOONEY, C.; SHIELDS, D. C.; FITZGERALD, R. J. *In silico* approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. **Peptides**, v. 57, p. 43-51, 2014.
- NURDIAWATI, A.; NAKHSHINIEV, B.; ZAINI, I. N.; SAIDOV, N.; TAKAHASHI, F.; YOSHIKAWA, K. Characterization of potential liquid fertilizers obtained by hydrothermal treatment of chicken feathers. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 37, p. 375-382, 2018.

- OHBA, R.; DEGUCHI, T.; KISHIKAWA, M.; ARSYAD, F.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Physiological functions of enzymatic hydrolysates of collagen or keratin contained in livestock and fish waste. **Food Science and Technology Research**, v. 9, p. 91-93, 2003.
- 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**, v. 66, p. 1-11, 1998.
- ORAK, T.; CAGLAR, O.; ORTUCU, S.; OZKAN, H.; TASKIN, M. Chicken feather peptone: a new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 56-62, 2018.
- PATINVOH, R. J.; FEUK-LAGERSTEDT, E.; LUNDIN, M.; SÁRVÁRI HORVÁTH, I.; TAHERZADEH, M. J. Biological pretreatment of chicken feather and biogas production from total broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1401-1415, 2016.
- PAUL, T.; HALDER, S. K.; DAS, A.; BERA, S.; MAITY, C.; MANDAL, A.; DAS, P. S.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 50-57, 2013.
- PAUL, T.; DAS, A.; MANDAL, A.; HALDER, S. K.; DASMOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Valorization of chicken feather waste for concomitant production of keratinase, oligopeptides and essential amino acids under submerged fermentation by *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 575-584, 2014.
- PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643-654, 2009.
- PLEISSNER, D.; VENUS, J. Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2133-2140, 2016.
- PONGKAI, P.; SAISAVOEY, T.; SANGTANOO, P.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Effects of protein hydrolysate from chicken feather meal on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. **The Food Science and Biotechnology**, v. 26, p. 1199-1208, 2017.
- POWER, O.; NONGONIERMA, A. B.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 34-46, 2014.
- RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron-oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) magnetic nanoparticles coupled  $\beta$ -keratinase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 632-644, 2015.
- RAMAKRISHNAN, J.; BALAKRISHNAN, H.; RAJA, S. T. K.; SUNDARARAMAKRISHNAN, N.; RENGANATHAN, S.; RADHA, V. N. Formulation of economical microbial feed using degraded chicken feathers by a novel *Streptomyces* sp: mitigation of environmental pollution. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 825-834, 2011.

- RAMNANI, P.; GUPTA, R. Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1537-1540, 2007.
- RIEGER, T. J.; DE OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, p. 329-335, 2017.
- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 395-399, 2006.
- RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Bioactive Peptides from Muscle Sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3, p. 765-791, 2011.
- SALMINEN, E.; RINTALA, J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 13-26, 2002.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 229-254, 2011.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.
- SAVITHA, G. J.; TEJASHWINI, M. M.; REVATI, N.; SRIDEVI, R.; ROMA, D. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 689-693, 2007.
- SCHAAFSMA, G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 1161-1168, 2009.
- SERNA-COCK, L.; RENGIFO-GUERRERO, C. A.; ROJAS-RESTREPO, M. A. Use of earthworm (*Eisenia foetida*) flour and hydrolyzed chicken feathers as sources of nitrogen and minerals for ethanol production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, p. 1-10, 2017.
- SHARMA, S.; GUPTA, A.; CHIK, S. M. S. T.; KEE, C. G.; MISTRY, B. M.; KIM, D. H.; SHARMA, G. Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 189-196, 2017.
- SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1-15, 2005.
- SILVEIRA, S. T.; JAEGER, M. K.; BRANDELLI, A. Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 361-366, 2009.
- SILVEIRA, S. T.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; RECIO, I.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1072-1077, 2013.
- SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.
- SINKIEWICZ, I.; SŁIWIŃSKA, A.; STAROSZCZYK, H.; KOŁODZIEJSKA, I. Alternative methods of preparation of soluble keratin from chicken feathers. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1043-1048, 2017.



- SINKIEWICZ, I.; STAROSZCZYK, H.; ŚLIWIŃSKA, A. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, article e12494, p. 1-11, 2018.
- SIVAKUMAR, N.; RAVEENDRAN, S. Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage. **British Poultry Science**, v. 56, p. 210-217, 2015.
- SRINIVAS, S.; PRAKASH, V. Bioactive peptides from bovine milk  $\alpha$ -casein: isolation, characterization and multifunctional properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 16, p. 7-15, 2010.
- STIBOROVA, H.; BRANSKA, B.; VESELA, T.; LOVECKA, P.; STRANSKA, M.; HAJŠLOVA, J.; JIRU, M.; PATAKOVA, P.; DEMNEROVA, K. Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 1629-1637, 2016.
- SUNDARAM, M.; LEGADEVI, R.; AFRIN BANU, N.; GAYATHRI, V.; PALANISAMMY, A. A study on anti bacterial activity of keratin nanoparticles from chicken feather waste against *Staphylococcus aureus* (bovine mastitis bacteria) and its anti oxidant activity. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 3, p. 1-5, 2015.
- TAMREIHAO, K.; DEVI, L. J.; KHUNJAMAYUM, R.; MUKHERJEE, S.; ASHEM, R. S.; NINGTHOUJAM, D. S. Biofertilizing potential of feather hydrolysate produced by indigenous keratinolytic *Amycolatopsis* sp. MBRL 40 for rice cultivation under field conditions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 317-320, 2017.
- TASKIN, M.; SISMAN, T.; ERDAL, S.; KURBANOGLU, E. B. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 657-665, 2011.
- TASKIN, M.; KURBANOGLU, E. B. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 826-834, 2011.
- TASKIN, M.; OZKAN, B.; ATICI, O.; AYDOGAN, M. N. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 597-602, 2012.
- TASKIN, M. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 535-541, 2013.
- TASKIN, M.; UNVER, Y.; FIRAT, A.; ORTUCU, S.; YILDIZ, M. Sheep wool protein hydrolysate: a new peptone source for microorganisms. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 1675-1680, 2016.
- TESFAYE, T.; SITHOLE, B.; RAMJUGERNATH, D.; CHUNILALL, V. Valorisation of chicken feathers: characterisation of physical properties and morphological structure. **Journal of Cleaner Production**, v. 149, p. 349-365, 2017.
- THURIÈS, L.; PANSU, M.; FELLER, C.; HERRMANN, P.; RÉMY, J. C. Kinetics of added organic matter decomposition in a Mediterranean sandy soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 997-1010, 2001.
- TOLDRÁ, F.; MORA, L.; REIG, M. New insights into meat by-product utilization. **Meat Science**, v. 120, p. 54-59, 2016.

- TRONINA, P.; BUBEL, F. Production of organic fertilizer from poultry feather wastes excluding the composting process. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 10, p. 33-36, 2008.
- TULIPANO, G.; SIBILIA, V.; CAROLI, A. M.; COCCHI, D. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. **Peptides**, v. 32, p. 835-838, 2011.
- UENISHI, H.; KABUKI, T.; SETO, Y.; SERIZAWA, A.; NAKAJIMA, H. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. **International Dairy Journal**, v. 22, 24-30, 2012.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; GOUSTEROVA, A.; NESHEV, G. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 1008-1012, 2009.
- VELARDE-SALCEDO, A. J.; BARRERA-PACHECO, A.; LARA-GONZÁLEZ, S.; MONTERO-MORÁN, G. M.; DÍAZ-GOIS, A.; GONZÁLEZ DE MEJIA, E.; BARBA DE LA ROSA, A. P. *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. **Food Chemistry**, v. 136, p.758-764, 2013.
- VERCRUYSSSE, L.; CAMP, J. V.; SMAGGHE, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8106-8115, 2005.
- VERMA, A.; SINGH, H.; ANWAR, M. S.; KUMAR, S.; ANSARI, M. W.; AGRAWAL, S. Production of thermostable organic solvent tolerant keratinolytic protease from *Thermoactinomyces* sp. RM4: IAA production and plant growth promotion. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-13, 2016.
- VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 357-366, 2004.
- VESELÁ, M.; FRIEDRICH, J. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 84-90, 2009.
- VILLA, A. L. V.; ARAGÃO, M. R. S.; SANTOS, E. P.; MAZOTTO, A. M.; ZINGALI, R. B.; SOUZA, E. P.; VERMELHO, A. B. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. **BMC Biotechnology**, v. 13, 15, p. 1-11, 2013.
- WAN, M.-Y.; DONG, G.; YANG, B.-Q.; FENG, H. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysate. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 643-649, 2016.
- WANG, H. Y.; LIU, D. M.; LIU, Y.; CHENG, C.F.; MA, Q. Y.; HUANG, Q.; ZHANG, Y. Z. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1-6, 2007.
- WANG, B.; YANG, W.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, p. 229-318, 2016.
- WILLIAMS, C. M.; LEE, C. G.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poultry Science**, v. 70, p. 85-94, 1991.

- WU, R.; WU, C.; LIU, D.; YANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, J.; LIAO, B.; HE, H.; LI, H. Overview of antioxidant peptides derived from marine resources: the sources, characteristic, purification, and evaluation methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 1815-1833, 2015.
- YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p. 1138-1143, 2002.
- YEO, I.; LEE, Y. -J.; SONG, K.; JIN, H. -S.; LEE, J. -E.; KIM, D.; LEE, D. -W.; KANG, N. J. Low-molecular weight keratins with anti-skin aging activity produced by anaerobic digestion of poultry feathers with *Fervidobacterium islandicum* AW-1. **Journal of Biotechnology**, v. 271, p. 17-25, 2018.
- ZENG, W. C.; ZHANG, W. C.; ZHANG, W. H.; SHI, B. Antioxidant activity and characterization of bioactive polypeptides from bovine hair. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, p. 573-578, 2013.
- ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2084-2089, 2010.
- ZHU, G. Y.; ZHU, X.; WAN, X. L.; FAN, Q.; MA, Y. H.; QIAN, J.; LIU, X. L.; SHEN, Y. J.; JIANG, J. H. Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids in subcritical water. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 88, p. 187-191, 2010.
- ZOU, T. -B.; HE, T. -P.; LI, H. -B.; TANG, H. -W.; XIA, E. -Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, article 72, p. 1-14, 2016.