



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS – PCTA

LEONARDO DA SILVA FREITAS

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ CONILON NA
PRODUÇÃO DE AVICELASES POR *Bacillus licheniformis* N378**

ALEGRE – ES

MARÇO – 2020

LEONARDO DA SILVA FREITAS

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ CONILON NA
PRODUÇÃO DE AVICELASES POR *Bacillus licheniformis* N378**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho

Coorientadora: Prof^a. DSc. Jussara Moreira Coelho

ALEGRE - ES

MARÇO – 2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F862u Freitas, Leonardo da Silva, 1994-
Utilização do resíduo do processamento de café Conilon na
produção de avicelases por *Bacillus licheniformis* N3B78us
licheniformis N3B78 / Leonardo da Silva Freitas. - 2020.
69 f. : il.

Orientadora: Raquel Vieira Carvalho.

Coorientadora: Jussara Moreira Coelho.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Enzimas. 2. Enzimas microbianas. 3. Fermentação. 4.
Celulose - Biodegradação. I. Carvalho, Raquel Vieira. II. Coelho,
Jussara Moreira. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

LEONARDO DA SILVA FREITAS

**" UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ
CONILON NA PRODUÇÃO DE AVICELASES POR *Bacillus
licheniformis* N378"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 12 de março de 2020.

R. Carvalho

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Vieira de Carvalho
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES
Orientadora

J. Moreira Coelho

Prof^ª. Dr^ª. Jussara Moreira Coelho
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Coorientadora

Jara Rebouças Pinheiro

Prof^ª. Dr^ª. Jara Pinheiro Rebouças
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora

Dedico este trabalho ao Vendedor de Sonhos, Jesus, que me vendeu a esperança de que o melhor da vida ainda está por vir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor da minha vida por me sustentar até aqui.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

À CAPES pela bolsa concedida.

À minha orientadora Raquel Carvalho, pela inestimável energia, paciência e dedicação ao projeto. Obrigado mesmo Raquel, sua orientação foi uma luz que iluminou toda a escuridão da minha incapacidade e desconhecimento sobre o assunto.

À minha inigualável companheira de análises, Viviane Lopes, que sem sombra de dúvidas, tornou muitos dos períodos de análises momentos de ótimas conversas e risadas. À você minha amiga, meus sinceros agradecimentos.

Aos técnicos Mauricio Carlos e Letícia Bastos agradeço pela amizade, auxílio e companheirismo. Vocês foram importantíssimos nessa conquista. Muito obrigado.

Aos amigos e companheiros do programa, obrigado por lutarmos juntos por um país melhor, que ao final a Ciência possa ser reconhecida e valorizada.

Aos membros da banca, as professoras Jussara Coelho e Lara Rebouças pela grande contribuição ao longo do projeto e pelas considerações feitas, que muito enriqueceram este trabalho.

À amada, Marialice, agradeço pela vida, sua luz ilumina os momentos de tristeza, faz meus dias melhores e meus sorrisos sinceros, ao seu lado conquisto todos os dias o maior prêmio de todos, sua doce companhia.

Aos meus pais, agradeço pelo trabalho de artesões, que com paciência e dedicação, moldaram princípios e valores que me fizeram ser um homem. Pai, Mãe, obrigado pelo exemplo de homem e mulher que são.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Resíduos agroindustriais.....	14
2.1.1. Resíduos de café.....	16
2.2. Bioprocessos na produção de enzimas.....	18
2.2.1. Fermentação submersa e semi sólida.....	18
2.3. Microrganismos produtores de enzimas.....	20
2.3.1. Gênero <i>Bacillus</i> na produção de enzimas	21
2.4. Enzimas	23
2.4.1. Celulases.....	25
2.4.2. Aplicação das celulases	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Microrganismos e meio de manutenção.....	30
3.2. Meios de cultivos para a seleção da cepa produtora de avicelase	30
3.3. Avaliação qualitativa da atividade enzimática	31
3.4. Preparo do pré-inóculo.....	31
3.5. Determinação do crescimento microbiano	31
3.6. Determinação da atividade enzimática da avicelase (EC 3.2.1.74 ou exo β - 1,4 glicanase).....	32
3.7. Curva de açúcares redutores	32
3.8. Influência do resíduo da casca de café no crescimento e secreção de celulases de <i>Bacillus licheniformis</i> N378	33
3.8.1. Preparo da casca de café.....	33
3.8.2. Pré-tratamento da casca	33
3.8.3. Preparo dos meios.....	34
3.9. Caracterização parcial da enzima	34

3.9.1.	Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima	35
3.9.2.	Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima	35
3.9.3.	Efeito da concentração salina na atividade da enzima	36
3.9.4.	Efeito dos íons metálicos na atividade da enzima	36
3.10.	Delineamento experimental.....	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Seleção da cultura bacteriana.....	37
4.2.	Avaliação qualitativa da atividade enzimática	38
4.3.	Influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e atividade celulolítica.....	39
4.4.	Caracterização da avicelase	44
4.4.1.	Efeito do pH na atividade e estabilidade da avicelase	44
4.4.2.	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da avicelase	45
4.4.3.	Efeito da concentração salina na atividade da avicelase.....	48
4.4.4.	Efeito dos íons metálicos na atividade da avicelase.....	50
5.	CONCLUSÃO	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

FREITAS, Leonardo da Silva. **Utilização do resíduo do processamento de café Conilon na produção de avicelase por *Bacillus licheniformis* N378**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho. Coorientadora: Prof^a. DSc. Jussara Moreira Coelho.

O emprego de bioprocessos permite a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, dentre eles, destacam-se as enzimas microbianas, que podem ser obtidas, inclusive, a partir do emprego de resíduos agroindustriais. A utilização destes, como fonte de substrato, tem garantido boa produção enzimática e redução dos custos do processo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de bactérias *Bacillus licheniformis*, isoladas durante a secagem natural de frutos de café Conilon, no sul do Estado do Espírito Santo, bem como avaliar o potencial de síntese de avicelase em cultivos contendo casca de café Conilon. As cepas selecionadas foram avaliadas quanto a sua capacidade de crescimento e produção de celulases em meio contendo carboximetilcelulose. A cepa N378 foi selecionada para avaliar o efeito do meio e do tratamento da casca de café na síntese enzimática, por apresentar maior produção de celulases. A casca de café foi utilizada na forma “*in natura*” e tratada com solução alcalina NaOH 1 % (m/V). Foi observado que a bactéria apresentou bom crescimento ao longo de todo o processo fermentativo quando incubada em meio contendo casca de café tratada, pH 7,0, temperatura de 37 °C a 150 rpm, apresentando maior densidade ótica de 1,0 e maior atividade enzimática (12,93 U/mL) encontrada no tempo de 144 horas de incubação. Estudos sobre a caracterização parcial da avicelase revelaram que a enzima possui pH ótimo em 7,0 e temperatura ótima de 90 °C, quando incubada pelo período de 10 minutos. No estudo de estabilidade da enzima, observou-se que a enzima manteve cerca de 80% de sua atividade após 3 horas de incubação em pH 6,5 e 7,5, ou seja, em pH próximos ao ótimo. A termoestabilidade da avicelase revelou que nas temperaturas de 50 °C e 60 °C a enzima manteve cerca de 100 % da atividade e cerca de 50% da atividade quanto exposta a 70 °C e 80 °C por 1 hora. Durante 2 horas de incubação, a enzima manteve cerca de 15 % de atividade nas temperaturas de 50 °C e 60 °C. A presença de íons cloretos de Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ e Ba²⁺ e sulfatos de Mg²⁺, Fe²⁺ e Cu²⁺, mostrou redução na atividade relativa da enzima, assim como nas concentrações de NaCl testadas (1 – 5%). Assim, o microrganismo, *Bacillus licheniformis* N378, foi capaz de crescer e produzir avicelase em meio de cultivo contendo casca de café Conilon, sendo observado também, que o pré-tratamento no resíduo proporcionou maior produção de enzimas pelo microrganismo.

Palavras – chave: resíduos lignocelulolíticos, *Bacillus licheniformis*, celulases

ABSTRACT

FREITAS, Leonardo da Silva. **Use of the residue from Conilon coffee processing in the production of avicelase by *Bacillus licheniformis* N378**. 2020. Dissertation (Master's degree in Food Science and Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre - ES. Advisor: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho. Co-supervisor: Prof^a. DSc. Jussara Moreira Coelho.

The use of bioprocesses allows the production of a large number of metabolites of industrial interest, including microbial enzymes, which can be obtained, even, from the use of agro-industrial residues. The use of these, as a source of substrate, has ensured good enzymatic production and reduced process costs. In this context, the present work aimed to study the growth of *Bacillus licheniformis* bacteria, isolated during the natural drying of Conilon coffee fruits, in the south of the State of Espírito Santo, as well as to evaluate the potential of avicelase synthesis in crops containing bark of Conilon coffee. The selected strains were evaluated for their ability to grow and produce cellulases in medium containing carboxymethylcellulose. The N378 strain was selected to evaluate the effect of the medium and the treatment of the coffee husk on the enzymatic synthesis, due to its higher production of cellulases. The coffee husk was used in the "in natura" form and treated with 1% NaOH alkaline solution (m / V). It was observed that the bacteria showed good growth throughout the fermentation process when incubated in a medium containing treated coffee husk, pH 7.0, temperature of 37 ° C at 150 rpm, presenting a higher optical density of 1.0 and greater activity enzyme (12.93 U / mL) found at 144 hours of incubation. Studies on the partial characterization of avicelase revealed that the enzyme has an optimum pH of 7.0 and an optimum temperature of 90 ° C, when incubated for 10 minutes. In the stability study of the enzyme, it was observed that the enzyme maintained about 80% of its activity after 3 hours of incubation at pH 6.5 and 7.5, that is, at pH close to optimum. The thermostability of avicelase revealed that at temperatures of 50 ° C and 60 ° C, the enzyme maintained about 100% of the activity and about 50% of the activity when exposed to 70 ° C and 80 ° C for 1 hour. During 2 hours of incubation, the enzyme maintained about 15% activity at temperatures of 50 ° C and 60 ° C. The presence of chloride ions of Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ and Ba²⁺ and sulfates of Mg²⁺, Fe²⁺ and Cu²⁺, showed a reduction in the relative activity of the enzyme, as well as in the tested NaCl concentrations (1 - 5%). Thus, the microorganism, *Bacillus licheniformis* N378, was able to grow and produce avicelase in a culture medium containing Conilon coffee husk, and it was also observed that the pre-treatment in the residue provided greater production of enzymes by the microorganism.

Keywords: lignocellulolytic residues, *Bacillus licheniformis*, cellulases

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais, em geral, incluem os subprodutos gerados durante processos industriais obtidos de atividades, e, ou produtos agrícolas. No entanto, pouco ou nenhum valor é atribuído a esses resíduos devido à falta de aplicação direta para os mesmos. Ressalta-se que constituintes naturais como açúcares, fibras, proteínas e minerais fazem parte da composição da maioria desses resíduos, possibilitando sua aplicação em bioprocessos, como substitutos de fontes sintéticas de substratos (PANESAR et al., 2016). Dentre os resíduos produzidos, destacam-se as matérias-primas lignocelulósicas, que são consideradas resíduos, tanto agroindustriais quanto urbanos (CASTRO et al., 2010).

No processo de beneficiamento do café, pós colheita, são gerados toneladas de resíduos orgânicos agroindustriais dado que é necessário cerca de 5,5 kg de café em frutos para obter 1 kg de grãos beneficiados no processamento úmido, ou seja, aproximadamente 82 % do fruto pode ser considerado resíduo e apenas 18 % constituirá o grão beneficiado (ADAMS; GHALY, 2007; CLEVES, 2009). No entanto, um grande excedente desse resíduo permanece inutilizado (GOUVEA et al., 2009; MURTHY; MADHAVA, 2012), favorecendo a deposição destes em locais inapropriados, assim como o destino incorreto, gerando problemas de cunho ambiental.

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES et al., 2004). Embora as enzimas ocorram amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam cerca de 90% do mercado, uma vez que possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como ampla diversidade bioquímica, suscetibilidade à manipulação genética, menor tempo e custo de produção (LIMA, 2001).

A capacidade de hidrolisar celulose é encontrada entre inúmeros gêneros do domínio *Bacteria* (LYND; ZHANG, 2002). As características do gênero *Bacillus*, como crescimento celular em ampla faixa de pH, tolerando condições ácidas, neutras e alcalinas, somado ao fato de alguns microrganismos desse gênero terem características de termófilos, fazem com que essas espécies conquistem espaço no

mercado. Assim, entre algumas dessas espécies com potencial celulolítico, destacam-se o *Bacillus brevis* (SINGH; KUMAR, 1998), *Bacillus subtilis* (SHABEB et al., 2010), *Bacillus sphaericus* (SINGH et al., 2004) e *Bacillus licheniformis* (AYGAN et al., 2011; SAJAHAN et al., 2017).

As enzimas celulolíticas podem ser produzidas por microrganismos, como fungos e bactérias, sendo divididas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, em: endoglicanases que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglicanases, que atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidases que hidrolisam oligossacarídeos solúveis, como a celulose e o amido, em glicose, ou seja, atuam sobre as ligações glicosídicas que formam os oligossacarídeos (LYND; ZHANG, 2002; DE CASTRO; SATO, 2015).

As exoglicanases (avicelase) agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina (avicel), encurtando as cadeias do polissacarídeo, por meio de uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização (LYND et al., 2002).

As celulases são enzimas de grande importância industrial, dado o fato de que são empregadas em diversos segmentos industriais, tais como: indústria têxtil e de detergente, indústria de polpa de celulose e papel, indústria de alimentação animal, indústria de biocombustíveis, indústria de sucos e na indústria de vinhos (BATH, 2000; CASTRO et al., 2010; LIMAYEN; RICK, 2012; MARCO, 2012; ORLANDELLI et al., 2012; YOON et al., 2014; CHOI et al., 2015; ONGARATTO; VIOTTO, 2015; WANG; XUE, 2016).

Entretanto, o elevado custo de produção das celulases e demais enzimas se caracteriza como o maior fator limitante para sua aplicação industrial. O meio ou o substrato utilizado, a complexidade da estrutura da celulose, etapas de tratamento no substrato, as baixas produtividades da celulase e as etapas de purificação, estão entre os principais fatores que influenciam na produção econômica das celulases (SRIDEVI, et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento das bactérias *Bacillus licheniformis*, isoladas durante a secagem natural de frutos de café Conilon, no sul do Estado do Espírito Santo, bem como avaliar o potencial de síntese de avicelase em cultivos contendo casca de café Conilon.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais, em geral, incluem os subprodutos gerados durante processos industriais obtidos de atividades, e, ou produtos agrícolas. No entanto, pouco ou nenhum valor é atribuído a esses resíduos devido à falta de aplicação direta para os mesmos. Ressalta-se que constituintes naturais como açúcares, fibras, proteínas e minerais fazem parte da composição da maioria desses resíduos, possibilitando sua aplicação em bioprocessos, como substitutos de fontes sintéticas de substratos (PANESAR et al., 2016). Dentre os resíduos produzidos, destacam-se as matérias-primas lignocelulósicas, que são consideradas as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza (CASTRO et al., 2010).

Os materiais lignocelulolíticos representam uma grande parcela da biomassa vegetal de toda a biosfera. O complexo lignocelulolítico (Figura 1) compreende três tipos de polímeros, a celulose, hemicelulose e lignina que são fortemente ligadas quimicamente por meio de forças não covalentes e por ligações cruzadas covalentes (SÁNCHEZ, 2009).

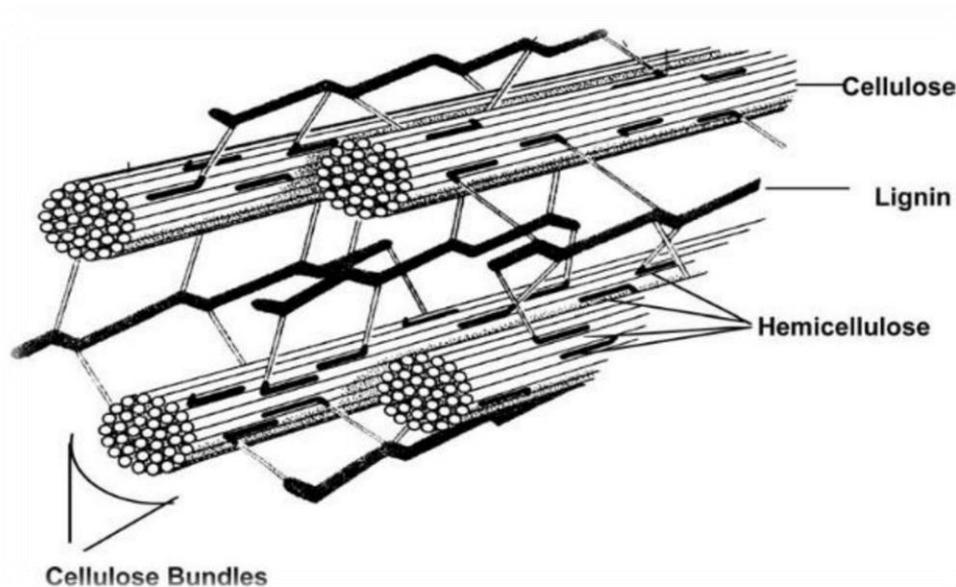


Figura 1. Representação da fibra de celulose e seus componentes, celulose, hemicelulose e lignina (Fonte: MURPHY; MCCARTHY, 2005).

A celulose se destaca como um dos constituintes de maior interesse dos resíduos lignocelulolíticos, sendo um polímero linear de glicose de alto peso molecular, podendo ter de 15 a 15.000 unidades de glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas que formam o dímero celobiose. Estes formam longas cadeias ligadas entre si por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. A celulose está presente geralmente na forma cristalina e uma pequena quantidade de suas cadeias está presente na forma amorfa. A conformação amorfa da celulose a torna mais suscetível à degradação enzimática (PÉREZ et al., 2002; BRODEUR et al., 2011).

A hemicelulose consiste num grupo de polissacarídeos heterogêneo formado por unidades de açúcares, como pentoses e hexoses, ácidos urônicos e radicais acetila, e atua como elo entre a lignina e a celulose. Os açúcares são ligados por ligações β -1,4-glicosídicas e também por ligações β -1,3-glicosídicas. A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose é que esta possui ramificações com cadeias laterais curtas constituídas por diferentes açúcares e a celulose consiste em oligômeros que podem ser facilmente hidrolisados (SÁNCHEZ, 2009; BRODEUR et al., 2011).

A lignina está ligada à hemicelulose e à celulose, formando uma barreira impermeável na parede celular da planta. Sua presença na parede celular, confere suporte estrutural, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e ao estresse oxidativo. É um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e óticamente inativo, formado por unidade de fenilpropano unidos por ligações fortes, além disso, é considerado um dos materiais mais resistentes da natureza (SÁNCHEZ, 2009; BRODEUR et al., 2011).

Algumas pesquisas têm sido desenvolvidas, com o intuito de agregar valor aos produtos e subprodutos da agricultura, visando contornar o aumento da geração de resíduos agroindustriais. Aliado ao fato de que a matéria-prima, comumente, representa um custo elevado aos bioprocessos, a utilização de resíduos lignocelulósicos como matéria-prima para bioprocessos industriais representa uma forma de agregar valor aos resíduos agroindustriais, assim como, redução de custos de processo (PANDEY et al., 2000; CANAKI, 2007; FERREIRA, 2009; MANERA, et al., 2011; NGUYEN, et al., 2017; BARROS, et al., 2019).

A utilização de resíduos agroindustriais como um substrato alternativo para os processos fermentativos, ajuda a reduzir custos de fabricação de produtos com alto valor agregado, além de contribuir para a redução de problemas de poluição ambiental relacionados ao acúmulo ou má disposição desses resíduos (BOTELLA et al., 2007; KAMMOUN et al., 2008).

2.1.1. Resíduos de café

O café é uma das bebidas mais consumidas do mundo, sendo a cultura comercial mais importante e a segunda *commodity* internacional mais valiosa, perdendo somente para o petróleo (ICO, 2019). O Brasil destaca-se como maior produtor e exportador de café do mundo, exportando cerca de 38,721 milhões de sacas no período de 2018/2019 resultando na receita cambial de US\$ 5.384.903 (EMBRAPA, 2019; ICO, 2019). A produção brasileira de café do tipo Conilon no ano de 2019 foi de 13,94 milhões de sacas, e o estado do Espírito Santo foi responsável por 9,419 milhões de sacas, valor correspondente a 67% da produção nacional (CONAB, 2019).

A produção de café no Brasil ocorre basicamente por via seca, gerando aproximadamente 30 milhões de sacas de cascas por ano. Quanto ao processo de beneficiamento pós-colheita do café, são geradas toneladas de resíduos orgânicos agroindustriais, dado que é necessário cerca de 5,5 kg de fruto de café, para obter 1 kg de grãos beneficiados no processamento úmido, ou seja, aproximadamente 82 % do fruto pode ser considerado resíduo e apenas 18 % constituirá o grão beneficiado (SOCCOL, 2002; ADAMS; GHALY, 2007; CLEVES, 2009).

Os resíduos mais importantes do pré processamento dos frutos de café são a polpa na via úmida e a casca na via seca (SOCCOL, 2002). Outros subprodutos, como mucilagem e pergaminho, são fontes potenciais de constituintes como carboidratos, proteínas, fibras e minerais. A polpa de café pode ser facilmente utilizada por leveduras ou metabolizada por bactérias acidoláticas, produzindo bebidas alcoólicas e vinagres (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). Além da possibilidade desses resíduos

serem utilizados como substratos em bioprocessos para a produção de enzimas (SAMPAIO et al., 2013).

Em geral, a casca de café apresenta altos teores de matéria orgânica e boa quantidade de açúcares fermentescíveis, conforme a Tabela 1. A composição química da casca de café varia de acordo com vários fatores, tais como variedade de café, tipo de solo, plantio, condições climáticas, tipo de processamento entre outros (SOCOOL, 2002; ADAMS; GHALY, 2007; CLEVES, 2009; PANDEY, et al., 2017).

Tabela 1. Composição da casca de café em base seca.

Autores	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Andrade (2009)		32,15	13,23
Gouvea et al. (2009)	16	11	9
Ayele; Reinhardt (2010)	24,5	29,7	23,7
Albuquerque; Araújo (2016)		24	19
Baêta et al. (2017)	29,17	28,96	22,35
Santos et al. (2018)	32,5	20,8	27,1

Devido ao elevado teor de fontes de carbono e sua disponibilidade como resíduo agroindustrial, a casca de café pode ser empregada como alternativa, além de promissora para o cultivo de microrganismos em bioprocessos (PANDEY et al., 2007) e para a produção de enzimas (SAMPAIO et al., 2013; GUSMÃO et al., 2014).

2.2. Bioprocessos na produção de enzimas

2.2.1. Fermentação submersa e semi sólida

Bioprocesso é uma das formas mais antigas de produção de enzimas, nele os microrganismos utilizam substratos presentes no meio como fonte de energia necessária para a sua subsistência. Na maioria desses processos de produção, esses compostos essenciais não estão disponíveis na forma que permita aos microrganismos utilizá-los diretamente, fazendo com que os mesmos tenham que sintetizar enzimas, com o objetivo de degradar esses compostos a substâncias disponíveis para o uso metabólico (FEITOSA, 2009).

Os bioprocessos para a produção de enzimas podem ser classificados como sólido e submerso; e a diferença principal entre eles é a quantidade de água livre em cada sistema. Os processos submersos são os mais utilizados para a síntese da maioria das celulases comercializadas e podem ser definidos como os processos em que os microrganismos se desenvolvem em meio de cultura com agitação e o crescimento ocorre com uma suspensão em meio líquido, no qual vários nutrientes são dissolvidos (DASARI et al., 2019).

No bioprocessos submerso, os constituintes estão diluídos no meio fermentativo, e são geralmente utilizadas bactérias, enquanto no bioprocessos sólido, o substrato é apenas umedecido, e o emprego de microrganismos se restringe basicamente aos fungos filamentosos (MITCHEL, 2000; VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

A fermentação submersa apresenta algumas vantagens, frente à fermentação sólida, como maior facilidade de controles do processo e maiores possibilidades de recuperação do produto final, visto que as enzimas excretadas ficam dispostas no meio líquido, já na fermentação sólida grande parte das celulases ficam confinadas dentro do material sólido devido à grande afinidade como o substrato. Além disso, na fermentação submersa o sistema enzimático encontra-se prontamente dissolvido no meio líquido, promovendo menores perdas de metabólitos e menos etapas para extração da enzima (DASARI et al., 2019). A maior parte das indústrias produtoras de

enzimas utiliza o sistema submerso, por possibilitar maiores controles do processo (MITCHEL, 2000; VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

Para a seleção do tipo de bioprocesso a ser utilizado deve ser considerado inúmeros fatores, tais como: complexidade do meio, custo do meio, atividade de água, concentração de substrato, aeração, temperatura, controle de parâmetros do processo, purificação dos produtos e o comportamento do microrganismo. Cada tipo de bioprocesso tem suas particularidades, que impactam diretamente no tipo e na quantidade de produto que será formado (MITCHEL, et al., 2000; GARZON, 2018).

Os processos biotecnológicos apresentam vantagens e desvantagens, devido à forma como alguns parâmetros afetam e ou influenciam em cada sistema, como por exemplo, temperatura, pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, presença de íons metálicos, presença de sais, inibidores, cofatores, concentração de substratos, quantidade de oxigênio, entre outras condições específicas para cada bioprocessos, microrganismo e produto de metabolismo desejado (SABAT; GUPTA, 2010; LEI, et al., 2012; TAKAHASHI, et al., 2013).

A temperatura afeta o crescimento do microrganismo, assim como sua produção de metabólitos. Os microrganismos têm uma temperatura ótima de crescimento e quando esta encontra-se fora da temperatura ótima, seja com temperaturas maiores ou menores, o crescimento do microrganismo tende a acontecer de maneira mais lenta, sendo que em condições extremas de temperatura pode-se ocorrer a morte celular (BHUNIA, et al., 2012; ADAV, et al., 2013).

O pH é o principal fator que influencia as vias metabólicas, afetando a eficiência da síntese e da produção enzimática dos microrganismos (ADAV et al., 2011). Além disso, alterações de pH extracelular podem induzir estresse sobre funções celulares, como função de proteínas e potencial de membrana, que afetam diretamente na disponibilidade de micronutriente para a célula. Para contornar essas alterações de pH, a célula ativa suas vias de sinalização de controle de pH extracelular, que sintetizam compostos com o objetivo de realizar a regulação de pH, mecanismo que faz com que a célula possa evitar o estresse ácido e desempenhar suas funções celulares. Essa regulação da célula acontece em condições amenas de mudança de

pH e varia conforme a resistência ácida de cada microrganismo (SELVIG; ALSPAUGH, 2001).

A utilização de fontes de carbono pelos microrganismos se baseia em dois processos principais: indução ou repressão catabólica de carbono, que tem o objetivo de evitar o gasto desnecessário de energia com a produção de enzimas extracelulares e com vias metabólicas, que não serão utilizadas. Portanto, no processo de crescimento de um microrganismo, as fontes de carbono, seja orgânica ou inorgânica visam manter as condições mínimas necessárias para que atendam às exigências nutricionais de cada célula específica (BENOCCI et al., 2017).

A via de indução ou repressão catabólica de nitrogênio consiste no mecanismo utilizado pelos microrganismos para selecionar a quantidade e o tipo de fonte de nitrogênio que será utilizado, dentro do metabolismo global de nitrogênio, influenciando diretamente no crescimento, síntese e produção de metabólitos (KRAPPMANN; BRAUS, 2005; TUDZYNSKI, 2014).

2.3. Microrganismos produtores de enzimas

A obtenção de microrganismos com a capacidade de produção de enzimas para aplicação industrial poder ser realizada de várias formas, tais como o isolamento a partir de recursos naturais, obtenção de microrganismos mutantes naturais, aquisição de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de recombinantes por técnicas da engenharia genética (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O custo da produção de enzimas microbianas pode ser fortemente influenciado pela produtividade do organismo empregado, mostrando como a seleção de um microrganismo para um processo de produção de enzimas é importante (KUMAR et al., 2014). Após a seleção, o microrganismo é cultivado em reatores para a produção do biocatalisador. Fatores como meio de cultivo, pH, temperatura, aeração e agitação devem ser otimizados com o objetivo de potencializar a produção da enzima em questão (MONTEIRO; SILVA, 2009).

2.3.1. Gênero *Bacillus* na produção de enzimas

Dentre os microrganismos envolvidos na degradação de materiais celulósicos, as bactérias do gênero *Bacillus* têm merecido destaque em muitos estudos. Suas características como tolerância a altas temperaturas, crescimento rápido e alta atividade enzimática fazem com que espécies deste gênero tenham alcançado espaço no mercado, principalmente nos processos de biorremediação e uso em detergentes. Entre algumas dessas espécies com potencial celulolítico, destacam-se o *Bacillus brevis* (SINGH; KUMAR, 1998), *Bacillus subtilis* (SHABEB et al., 2010), *Bacillus sphaericus* (SINGH et al., 2004) e *Bacillus licheniformis* (AYGAN et al., 2011; SAJAHAN et al., 2017).

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias gram positivas, membros do filo Firmicutes que possuem forma de bastonete, são formadoras de endósporos, podem estar isoladas, em pares ou filamentos de tamanhos variados e a maioria é aeróbica, podendo apresentar motilidade por flagelos peritríquios, ou serem imóveis (YOUSEF; JUNEJA, 2002).

Por serem habitantes comuns de solos e de sedimentos aquáticos, espécies dentro do gênero são difundidas na natureza e encontradas em praticamente todos os ambientes. Crescem em temperaturas entre 25 °C e 37 °C, apesar de existirem espécies com crescimento em temperaturas muito altas ou muito baixas. Algumas espécies ainda toleram condições de pH extremas, podendo crescer entre pH 2 e 10. Essa grande heterogeneidade de ambientes e condições de crescimento reflete na variedade de nichos ecológicos em que podem ser encontrados a espécie *Bacillus*, assim como a quantidade de substratos que esta espécie pode utilizar no crescimento e também ao grande complexo enzimático produzido pela mesma (YOUSEF; JUNEJA, 2002; ROONEY et al., 2009).

O grupo de *B. subtilis sensu lato* compreende as espécies: *B. subtilis sensu stricto*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* e *B. sonorensis* (WANG et al., 2007). As espécies desse grupo não são patogênicas e apresentam grande potencial biotecnológico (STRESHINSKAYA et al., 2011). As principais aplicações na indústria são: a produção de enzimas (proteases,

amilases e celulasas, dentre outras hidrolases), antibióticos, fermentação de alimentos, vitaminas, entre outras (WANG et al., 2007; JEYARAM et al., 2011).

A espécie *Bacillus licheniformis* é caracterizada por organismos anaeróbios facultativos, gram-positivos, possuem motilidade, formam esporos elipsoidais a cilíndricos. As células cultivadas em ágar glicose possuem coloração uniforme, medindo de 0,6-0,8 por 1,5-3,0 µm, ocorrem isoladamente ou em pares, e cadeias. A morfologia colonial é variável, dentro e entre as cepas, e, como ocorre com *B. subtilis*, pode dar a aparência de uma cultura mista (YOUSEF; JUNEJA, 2002).

A colônia tem forma arredondada a irregular e diâmetro moderado (2-4 mm), com margens variando entre ondulada para fimbriada; a cor é esbranquiçada, e pode se tornar cremosa ou marrom e até vermelha em meios contendo ferro em quantidade suficiente; as texturas variam de úmido e brilhante ou mucoide, até membranoso com aspecto áspero e duro conforme elas secam; as colônias de *B. licheniformis* tendem a ser bastante aderentes ao ágar. As condições médias de crescimento são 15 °C a 50 °C, e pH entre 5,7 e 6,8, apesar de algumas subespécies tolerarem condições mais extremas tanto de temperatura como de pH (LLARCH et al., 1997; YOUSEF; JUNEJA, 2002).

Heck et al., (2002), realizaram um estudo para avaliar a produção de celulase e xilanase por cepas de *Bacillus* isoladas da Amazônia no cultivo semi sólido, tendo como fonte de substrato o resíduo da indústria da soja, e concluíram que apesar da utilização de bactérias como microrganismos no cultivo semi sólido ser bem incomum, as cepas de *Bacillus* foram capazes de sintetizar as enzimas celulasas, xilanasas e algumas proteases.

Rehman et al., (2012), propuseram um estudo para produção de poligalacturonase a partir de *Bacillus licheniformis* em cultivo submerso, no qual variaram parâmetros como fonte e concentração de substrato, temperatura, pH e fonte de nitrogênio, concluindo que o microrganismo foi capaz de produzir 1015 U / mg de poligalacturonase em pH 7,0, temperatura de 37 ° C, usando a pectina de maçã (1,0 %) como fonte de substrato e o extrato de levedura (0,3 %) como fonte de nitrogênio.

Parrado et al., (2014), avaliaram a produção de enzimas por *Bacillus licheniformis* usando diferentes resíduos de penas de aves como substrato para

fermentação submersa e concluíram que o microrganismo foi capaz de produzir enzimas hidrolíticas como, queratinase, gama-glutamil transpeptidase, quitosanases e glicosidases.

Lakshmi e Hemalatha, (2016), estudaram a produção de protease alcalina de *Bacillus licheniformis* usando a otimização estatística, concluíram que ao selecionar as variáveis mais significativas do meio, conseguiram um aumento de 40 % na produção de protease em relação ao meio basal não otimizado.

2.4. Enzimas

As enzimas são proteínas de alto peso molecular que desempenham funções catalíticas em processos bioquímicos e são responsáveis por inúmeros processos metabólicos de um organismo vivo. Esses biocatalisadores são extremamente eficientes, pois apresentam grande especificidade por seus substratos, e são altamente exigentes quanto às condições de processos, presença de substratos, atividade de água, temperatura, pH, presença de íons metálicos, cofatores, entre outros. Essas particularidades das enzimas, quando bem conhecidas e controladas, asseguram uma alta eficiência catalítica (PORTER et al., 2016; SINDHU et al., 2017).

Em função da sua forma de atuação, a utilização de enzimas em processos industriais, em substituição a catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, torna o processo mais eficiente, já que reduz a formação de subprodutos e conseqüentemente reduz os custos operacionais. Devido a isso, a aplicação de enzimas como catalisadores torna-se cada vez mais atrativa em diversos setores industriais (SHELDON; PELT, 2013; ADRIO; DEMAIN, 2014).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas estão classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que atuam (SHULER, 1992).

No Quadro 1, estão apresentadas as classes das enzimas e suas respectivas funções.

QUADRO 1 - Classes e funções das enzimas

Classes	Funções
1. Oxirredutases	Catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
2. Transferases	Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil e carboxil.
3. Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.
4. Liases	Catalisam reações de remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
5. Isomerases	Catalisam reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos.
6. Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes.

Fonte: Lima et al. (2001)

As enzimas podem ser secretadas por reações que ocorrem dentro (intracelulares) ou fora das células (extracelulares), sendo que as de natureza extracelular existem em maior quantidade. As enzimas intracelulares que são secretadas dentro das células e permanecem no citoplasma, são utilizadas quando não há outra forma de síntese, principalmente quando a replicação do DNA é necessária. Portanto, as mais utilizadas industrialmente são as extracelulares, que são secretadas no ribossomo próximo à membrana celular e transferidas para fora da célula (BOURGAIZE et al., 2000).

O mercado mundial de enzimas foi avaliado no valor de 10,5 bilhões de dólares no ano de 2018 e estima-se que o setor irá obter um valor de mercado superior a 19 bilhões de dólares até o ano de 2025 (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). Enzimas

destinadas às indústrias dos segmentos têxteis, papel, amido, couro, produtos de limpeza e de higiene representam 65% das vendas. Enzimas para as indústrias de alimentos correspondem a 25% do mercado e enzimas destinadas a ração animal completam as estatísticas com uma parcela de 10% do mercado (KUMAR e SINGH, 2013).

2.4.1. Celulases

As celulases são um grupo de enzimas que catalisam reações de hidrólise em celulose e celooligosacarídeos. Composta por uma mistura complexa de proteínas enzimáticas com diferentes especificidades para realizar a hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas. A ação sinérgica de hidrólise desse complexo enzimático ocorre pela ação conjunta de pelo menos três grupos de enzimas: endo-(1,4)- β -D-glicanase (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- β -D-glicanase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), conforme ilustrado na Figura 2. As endoglicanases têm ação randômica, causando rápida mudança no grau de polimerização, por meio da hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras da molécula. A exoglicanase é ativa sobre a celulose cristalina, agindo sobre os terminais redutores e não redutores da cadeia. Já a β -glicosidase hidrolisa ligações glicosídicas β -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, liberando monômeros de glicose (SÁNCHEZ, 2009; KUHAD et al., 2011; NARRA et al., 2012; VALENCIA; CHAMBERGO, 2013).

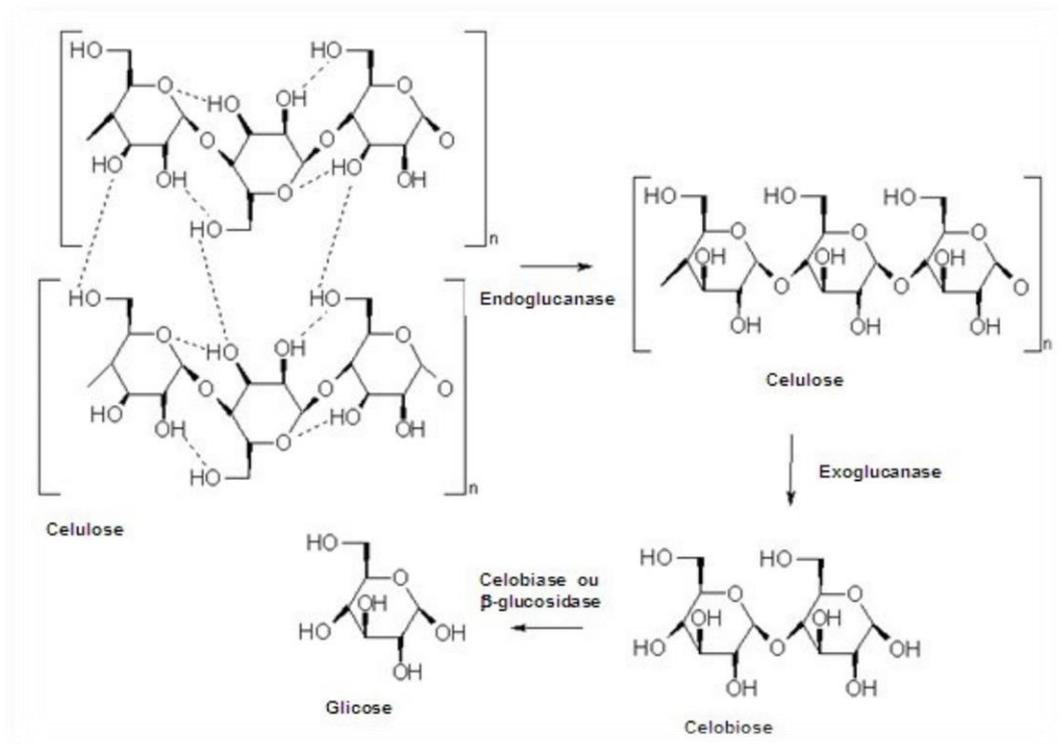


Figura 2. Atuação sinérgica entre endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011).

As celulasas são enzimas altamente específicas. O processo de ação dessas enzimas ocorre em três etapas subsequentes: primeiro ocorre a adsorção da celulase na superfície celulósica, depois a hidrólise da celulose em glicose e por fim a desorção da celulase da superfície do substrato (SWIATEK et al., 2014).

Para a utilização das celulasas em processos industriais sob condições ótimas de atividade, é necessário que suas propriedades sejam conhecidas e determinadas, principalmente no que se refere aos fatores cinéticos e físico-químicos. De forma geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6 – 5,0), enquanto que bactérias chegam a tolerar valores de pH alcalinos e ainda produzir enzimas, além de as temperaturas ótimas para atuação serem encontradas em sua maioria acima de 40 °C (CASTRO et al., 2010).

Como exemplo, Zhang e colaboradores (2004) trabalharam com uma linhagem de *Bacillus sp.*, cultivando-a, para a produção de celulasas, em pH 10,5. Em relação às celulasas de actinomicetos (especialmente do gênero *Streptomyces*), os resultados obtidos indicam que elas possuem melhor atuação em valores de pH entre neutros e

moderadamente ácidos e temperaturas por volta de 50 °C (JANG; CHEN, 2003; LIMA, et al., 2005).

Quanto as propriedades cinéticas, os valores das constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$ geralmente variam na ordem de grandeza, possivelmente devido à forma de apresentação de seus valores, ao substrato utilizado, à heterogeneidade das metodologias de quantificação e, principalmente, à origem do extrato enzimático utilizado (TUOHY, et al., 2002; HUANG; MONK, 2004).

Outra propriedade das enzimas celulolíticas é sua capacidade de ser influenciada por outras moléculas, especialmente metais, seja sofrendo efeito indutor ou inibidor. Dentre os íons metálicos estudados, os que inibem mais frequentemente as celulasas são Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^+ e Zn^{2+} , que podem provocar total inibição da atividade enzimática, mesmo em pequenas concentrações como 2 mM (AKIBA et al., 1995; YAZDI, et al., 2003; HUANG; MONK, 2004; LIMA, et al., 2005).

Embora grande parte da produção comercial de celulasas seja veiculada por fungos, as celulasas bacterianas têm sido estudadas devido à alta velocidade de crescimento, termoestabilidade e propriedades alcalinas (SADHU; MAITI, 2013). Entre as celulasas de bactérias, o complexo denominado celulosoma, tal como o encontrado na bactéria termofílica *Clostridium thermocellum*, tem despertado interesse (ZHANG; XING, 2004).

Entre as bactérias celulolíticas, destaca-se: *Anoxybacillus sp.* (LIANG et al., 2010), *Bacillus sp.* (LADEIRA, 2013; FERNANDES, 2016), *Bacillus subtilis* (HACK et al., 2002; DEKA et al., 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* (LEE et al, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (BEKARE et al, 2005), *Nocardiopsis sp.* (SARATALE; OH, 2011) e *Bacillus licheniformis* (KAZEEM et al., 2016; SHAJAHAN et al., 2017; WANG et al., 2018).

2.4.2. Aplicação das celulasas

A produção de celulasas em escala industrial começou visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, em meados da década de 80, com o objetivo de

aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, sua utilização começou a ganhar espaço e passou a ser empregada como um insumo para a indústria de alimentos, com o objetivo de melhorar propriedades sensoriais das massas em geral. Nesse setor, as celulases também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final (CASTRO et al., 2010).

Na indústria de biocombustíveis, as celulases são usadas durante a hidrólise da celulose, proporcionando a liberação dos açúcares e facilitando o processo de fermentação e posterior formação do bioetanol (LIMAYEN; RICK, 2012). O emprego da celulase no processo de sacarificação gera menos transtornos ambientais, evitando-se o uso do ácido sulfúrico, tornando o processo mais eficiente e menos corrosivo, já que a enzima apresenta maior eficiência na catálise da celulose em glicose, comparada aos processos químicos (LANGARO et al., 2015).

Na indústria de detergentes, são empregadas as celulases de caráter alcalino. Quando utilizadas melhoram o desempenho dos detergentes, pois permitem a remoção de pequenas fibrilas difusas do tecido, conferindo assim brilho e maciez ao tecido (MARCO, 2012).

Na indústria de sucos, as celulases auxiliam no processo de extração, maceração e clarificação do suco da fruta, devido a capacidade de romper a rede de celulose que auxilia na retenção de líquido nas células vegetais, alterando assim a viscosidade e aumentando a taxa de filtração, estabilidade e rendimento do produto final. Na produção da cerveja a ativação das hidrolases ocorre durante a maltagem e a fermentação (BATH, 2000; ONGARATTO; VIOTTO, 2015).

Na indústria de vinhos, os principais benefícios dessas enzimas ocorrem em três etapas da produção: na maceração da pele da uva, na filtração e na clarificação da bebida, pois ajudam na extração de substâncias aromatizantes presentes na casca da fruta e também degradam compostos que provocam sabores e aromas desagradáveis pela liberação de substâncias flavorizantes (BATH, 2000; ONGARATTO; VIOTTO, 2015).

Na indústria de polpa e papel, as celulases estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação

da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (ORLANDELLI et al., 2012). Já no caso de tratamento de efluentes da indústria de papel, a aplicação direta do microrganismo demonstrou resultados satisfatórios, além de um custo menor (MARCO, 2012).

Na indústria têxtil, as celulasas são utilizadas nos processos de lavagens de tecido para dar aparência de desbotado. As enzimas atuam quebrando as fibras dos fios de algodão, permitindo um afrouxamento entre os fios restantes, impedindo a retenção dos corantes utilizados, sendo facilmente removidos na lavagem (WANG; XUE, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e meio de manutenção

Para realização do presente estudo, foram utilizadas 04 cepas bacterianas de *Bacillus licheniformis* (N301, N378, S349 e S355), isolada por Pereira (2018) durante a secagem via natural de frutos de café Conilon do sul do Estado do Espírito Santo, armazenada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCAE/UFES, e identificada no Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Os microrganismos foram mantidos em tubos em ágar inclinado em meio TSY, composto por (g.L⁻¹ de água destilada): triptona - 20; NaCl - 10; extrato de levedura - 10; ágar - 20; sob refrigeração a 4 °C.

3.2. Meios de cultivos para a seleção da cepa produtora de avicelase

O crescimento do microrganismo foi avaliado semeando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após este período, 10 mL do meio de crescimento estéril (g.L⁻¹: KH₂PO₄, 1,36; (NH₄)₂SO₄, 1; NaCl, 2; MgSO₄.7H₂O, 0,2; FeSO₄, 0,01; extrato de levedura, 1; ágar, 20; carboximetilcelulose, 2) foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do respectivo meio de crescimento e incubadas por 24 horas em *skaker* rotatório da marca CIENLAB (modelo CE – 720) a 37 °C sob agitação de 150 rpm. Após este tempo, foi medido o crescimento celular, por turbidimetria em espectrofotômetro marca Thermo Fisher Scientific e a densidade ótica determinada a 600 nm de comprimento de onda. Os microrganismos que apresentaram maiores valores de densidade ótica foram utilizados para a avaliação qualitativa da atividade enzimática.

3.3. Avaliação qualitativa da atividade enzimática

A análise qualitativa da atividade celulolítica do microrganismo *Bacillus licheniformis* foi realizada em placas de Petri. O meio TSY foi suplementado, separadamente, com carboximetilcelulose 0,5 % (m/v) e celulose microcristalina a 0,5 % (m/v). Com o auxílio de uma agulha estéril, o microrganismo foi inoculado nas placas e incubado a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, as placas foram coradas com 10 mL de lugol 1 % (v/v) por 15 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e adicionada 10 mL de solução de NaCl 1 M por 30 minutos. Após este tempo, o excesso de solução salina foi removido e realizada a observação das zonas de hidrólise em torno das colônias. A presença do halo foi considerada como teste positivo para a atividade enzimática (SHAJAHAN et al. 2017).

3.4. Preparo do pré-inóculo

Após a seleção do microrganismo, conforme a avaliação qualitativa, o pré-inóculo foi preparado semeando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas semeadas foram incubadas em incubadora marca LIMATEC, modelo LT 320 T, a 37 °C durante 24 horas. Após este período, 10 mL do meio de cultivo foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram sugadas com auxílio de uma pipeta estéril, inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por 24 horas em *shaker* rotatório a 37 °C sob agitação de 150 rpm. Posteriormente este pré-inoculo foi utilizado para inocular os meios de cultivo.

Todos os experimentos foram conduzidos em frascos erlenmeyers de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL com 1 mL do pré-inóculo.

3.5. Determinação do crescimento microbiano

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio, medindo-se a densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro marca Thermo Fisher Scientific em intervalos de tempo determinados. Foi utilizada também a medida

do pH do meio, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, para acompanhar o crescimento celular (IAL, 2005).

3.6. Determinação da atividade enzimática da avicelase (EC 3.2.1.74 ou exo β -1,4 glicanase)

Amostras dos meios de cultivo foram centrifugadas em centrífuga (HERMLEZ 383K, Wehingen, Alemanha), a 12000 g por 15 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células. Este extrato bruto foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

A atividade da avicelase foi determinada por meio de uma mistura contendo 0,5 mL da preparação enzimática e 0,5 mL de uma solução de avicel 1,0 % (m/v) em tampão fosfato de sódio (0,05 M e pH 7,0), incubada em banho-maria à 60 °C durante 10 minutos. Após este período, a reação foi paralisada com adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura. Em seguida, esta mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos, resfriada em banho de gelo por 5 minutos e volume completado para 7 mL com água destilada (GHOSE, 1987). A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém a adição de 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi realizada após a paralisação da reação com a adição do DNS e esta mistura incubada nas mesmas condições descritas para as amostras. Uma unidade de avicelase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto por mL da enzima nas condições de ensaio acima descritos, usando uma curva padrão de açúcar redutor.

3.7. Curva de açúcares redutores

Para a construção da curva de calibração, foi utilizada solução de glicose em concentrações variando de (0 a 90 μ mol.mL⁻¹) (MILLER, 1959).

3.8. Influência do resíduo da casca de café no crescimento e secreção de celulases de *Bacillus licheniformis* N378

3.8.1. Preparo da casca de café

A casca de café Conilon variedade Vitória, da safra 2017/2018, foi obtida no distrito de Boa Vista, Município de Cachoeiro de Itapemirim, ES, à uma altitude de aproximadamente 550 metros. O material foi previamente seco e armazenado sob refrigeração (6 – 10 °C) em embalagens hermeticamente fechadas, até realização das análises e experimentos.

3.8.2. Pré-tratamento da casca

As cascas foram trituradas em moinho de facas da marca SOLAB tipo Willy e peneiradas para obtenção de partículas com 0,42 mm (malha com 40 *mesh*) de espessura. Em seguida, parte da amostra foi submetida ao tratamento alcalino e outra armazenada até utilização. As amostras foram pré tratadas com solução alcalina 1 % (m/v) de NaOH em autoclave (121 °C) por 1 hora, com a razão de 1:10 de substrato e solução alcalina, seguindo a metodologia proposta por Shajahan et al. (2017).

Após o pré-tratamento, os sólidos foram filtrados, utilizando filtro de papel Whatman N° 1, com auxílio da bomba a vácuo, e então secos em estufa a 105 °C até obtenção do peso constante, com umidade de 4,5 % e armazenados sobre refrigeração (6 – 10 °C) até a realização das análises.

As cascas de café (Tabela 2), caracterizada por Barreto, (2018), foram empregadas separadamente para avaliar o crescimento do microrganismo e a secreção da enzima, da seguinte forma:

- Casca “*in natura*” ou não tratada – CNT;
- Casca tratada com solução alcalina (NaOH 1%, m/v) – CT.

Tabela 2. Caracterização celulolíticas da casca de café Conilon.

Composição (%)	Hemicelulose	Celulose	Lignina
Casca de café Conilon	13,21	36,78	19,87

3.8.3. Preparo dos meios

Em experimentos preliminares e baseados em dados da literatura, foram testados diferentes meios de cultivo, para avaliar a influência das cascas de café no crescimento do *Bacillus licheniformis* N378 (conforme item 3.5) e produção de celulases (item 3.6), selecionando-se três meios, descritos a seguir (Tabela 3).

Tabela 3. Composição dos diferentes meios de cultivo contendo casca e café *in natura* e tratada com solução de NaOH 1 % (m/v).

Composição (g.L ⁻¹)	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Extrato de levedura	2	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6	0,2	0,2
KH ₂ PO ₄	6,4	1,36	1,36
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	1	1
NaCl	-	1	1
KCl	-	0,29	0,29
K ₂ HPO ₄	5,32	0,87	0,87
CaCl ₂	0,003	0,29	0,29
Citrato de sódio	10	-	-
MnCl ₂	0,005	-	-
FeSO ₄	0,003	0,01	0,01
Solução traços de metal*	1 mL	1 mL	1 mL
Casca não tratada	5	5	-
Casca tratada**	-	-	5

*Solução traços de metais (g.L⁻¹): ZnO – 2,5×10⁻³; FeCl₃.6H₂O – 2,7×10⁻²; MnCl₂.4H₂O – 1,0×10⁻²; CuCl₂.2H₂O – 8,5×10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O – 2,4×10⁻³; NiCl₃.6H₂O – 2,5×10⁻⁴; H₃BO₃ – 3,0×10⁻⁴; Na₂MoO₄ – 1,0×10⁻³.

** Casca de café tratada com solução de NaOH 1% (m/v).

3.9. Caracterização parcial da enzima

Para a caracterização parcial da enzima, foi utilizado o meio de cultivo em que o microrganismo produziu maior atividade enzimática. O meio foi então preparado, inoculado com o microrganismo e incubado a 37 °C, 150 rpm durante o período determinado previamente nos experimentos anteriores. Após este tempo foram

realizadas as medidas de densidade ótica para avaliar o crescimento do microrganismo, pH e atividade de avicelase conforme os itens 3.5 e 3.6.

3.9.1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima

A influência do pH sobre a atividade da avicelase foi avaliada na faixa de 4,0 a 10,0 com intervalo de 0,5 unidades. Para o preparo dos substratos foi utilizada uma mistura tamponante contendo acetato de sódio (pH 4,0-5,5), fosfato de sódio (pH 6,0-8,0), tris/HCl (pH 8,5-9,5) e tampão glicina-NaOH (pH 10,0) na concentração final de 50 mM.

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato (avicel 0,5%) nas soluções tampão com diferentes valores de pH e incubando o mesmo com 0,5 mL do extrato enzimático em banho-maria a 60 °C, por 10 minutos, de acordo com a metodologia descrita anteriormente. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme item 3.6.

A estabilidade da enzima em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato bruto enzimático, nos tampões anteriormente descritos, por 3 horas à temperatura ambiente (25 °C \pm 2). Após este tratamento, a atividade relativa das enzimas foi determinada conforme descrito no item 3.6.

3.9.2. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima

A determinação da temperatura ótima foi realizada incubando-se a mistura de reação, contendo o extrato bruto, no melhor pH (encontrado no item 3.9.1) em temperaturas variando de 30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C. Após 10 minutos de incubação, a atividade da enzima foi dosada conforme item 3.6.

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se o extrato bruto enzimático em temperaturas variando de 40 a 90 °C, com intervalos de 10 °C por 1 e 2 horas. A cada hora foi dosada a atividade relativa das enzimas na temperatura ótima determinada anteriormente. Foi verificado também a termoestabilidade da avicelase à 90 °C, durante 1 hora a cada 10 minutos conforme item 3.6.

3.9.3. Efeito da concentração salina na atividade da enzima

O efeito da concentração salina na atividade enzimática foi avaliado incubando-se o extrato bruto enzimático com solução salina variando a concentração de NaCl de 0 a 5 % por 60 minutos a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) no pH que apresentou atividade ótima (item 3.9.1.). Após este tempo, a atividade da enzima foi determinada conforme mencionada no item 3.6, no melhor pH e temperatura encontrados anteriormente.

3.9.4. Efeito dos íons metálicos na atividade da enzima

Para avaliar a influência dos íons metálicos na atividade da avicelase, o extrato bruto enzimático foi incubado na temperatura e no pH ótimos encontrados (itens 3.9.1. e 3.9.2.) com o íon correspondente, na concentração de 5 mM durante 20 minutos. Foram utilizados os íons cloretos de Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ba^{2+} e sulfatos de Mg^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} . O controle consistiu na incubação do extrato bruto na ausência dos íons e considerado como 100% de atividade. A atividade enzimática relativa foi determinada nas condições descritas anteriormente no item 3.6, como padrão.

3.10. Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado com três repetições. Em cada repetição, foram realizadas duplicatas de cada frasco cultivado. Os resultados foram avaliados por meio de média (Equação 1), desvio padrão (Equação 2) e construção de gráficos utilizando o Microsoft Excel® 2016 e Oring Pro 8.0.

$$\text{Equação 1: } M = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\text{Equação 2: } D_p = \frac{\sum (X_i - M)^2}{n-1}$$

M = média

X_i = valor individual

n = número de amostras

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção da cultura bacteriana

As cepas bacterianas de *Bacillus licheniformis* utilizadas no estudo foram capazes de crescer em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose (Figura 3).

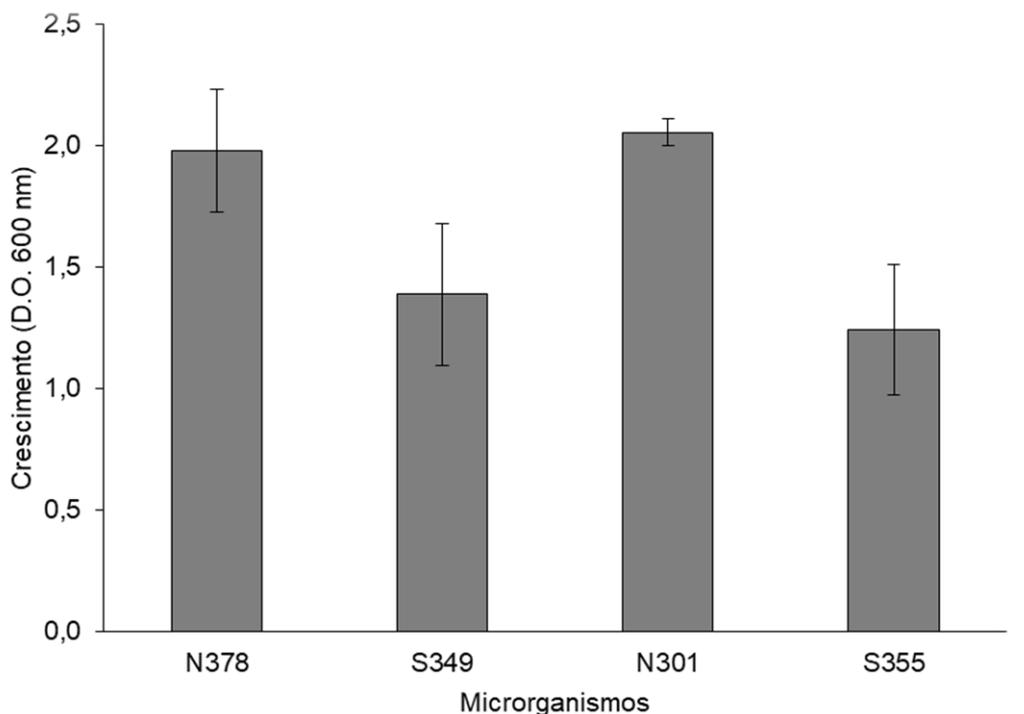


Figura 3. - Crescimento celular das cepas N378, N301, S355 e S349 a 37 °C a 150 rpm por 24 h de fermentação em meio contendo carboximetilcelulose como substrato.

Observa-se que as cepas avaliadas cresceram no meio de cultivo, com destaque para as cepas N378 e N301. O termo N indica “Face Noruega”, refere-se as cepas isoladas de lavouras de café que recebem menor incidência de radiação solar direta ao longo do ano, sendo mais sombreadas, úmidas e menos aquecidas, com temperaturas médias anuais mais baixas. Já o termo S, indica “Face Soalheira”, refere-se a cepas isolada de lavouras que recebem maior incidência de radiação solar direta ao longo do ano, sendo mais aquecida, o que faz com que a umidade relativa seja menor quando comparada à “Face Noruega” (SEDIYAMA et al., 2001).

A microbiota presente nos frutos do café é densa e diversa e inclui leveduras, fungos filamentosos e bactérias. A população de cada grupo microbiano depende do

método de processamento e da extensão da perda de água dos frutos durante o processo natural de secagem do café (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008).

Pelos resultados obtidos, as cepas isoladas da “Face Noruega” apresentaram maiores crescimentos, com maiores valores de densidade ótica (D.O.), 2,06 para a cepa N301 e 1,99 para a cepa N378, quando comparadas aos valores encontrados para as cepas da “Face Soalheira”, 1,40 (S349) e 1,25 (S355) como mostrado na Figura 3. Indicando que as condições de cultivo da lavoura da “Face Noruega”, favoreceram o crescimento das cepas N301 e N378. Entretanto, são necessários mais estudos para avaliar como os fatores extrínsecos do ambiente contribuem para o crescimento das cepas estudadas.

Cepas de *Bacillus* isoladas da água e solo da região Amazônica por Heck e colaboradores, (2002), demonstraram a capacidade de *Bacillus* de degradar compostos complexos, em que foram usados resíduos lignocelulolíticos oriundos do beneficiamento de soja, para promover o crescimento e a síntese de celulasas.

De acordo com Makky, (2009), uma das características interessantes, que a espécie do gênero *Bacillus* apresenta, é a habilidade de degradar substratos amorfos, tais como a carboximetilcelulose. Shajahan et al., (2017), estudaram a produção de celulasas por *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolado de fontes termais na Índia, em meio contendo carboximetilcelulose e concluíram que o microrganismo possui capacidade de crescer e sintetizar celulasas quando incubado em meio contendo fonte de carbono complexa.

As cepas avaliadas apresentaram bom crescimento quando inoculadas no meio de crescimento, contendo fonte de carbono complexa, carboximetilcelulose, isso revela a capacidade do microrganismo de sintetizar enzimas que degradam esses substratos em monômeros menores, para que possam ser metabolizados, assim como nos trabalhos citados.

4.2. Avaliação qualitativa da atividade enzimática

As cepas da face Noruega (N378 e N301), por terem apresentado maiores valores de crescimento foram avaliadas qualitativamente quanto a sua produtividade

enzimática. Ocorreu a formação de halos para ambas as cepas testadas, entretanto os halos observados para a cepa N378 foram mais evidentes (Figura 4).

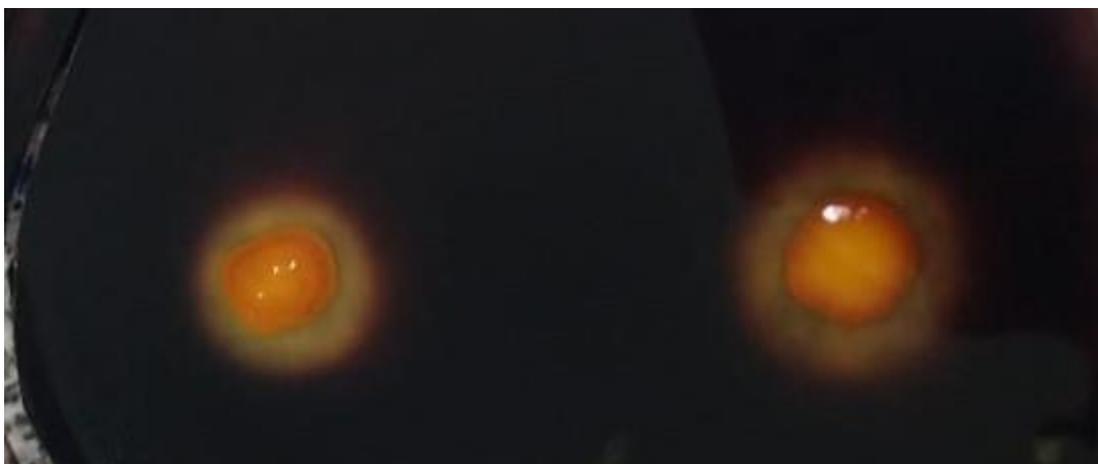


Figura 4. Halo de inibição formado pela cepa N378

A formação dos halos é observada pela interação do lugol com os polissacarídeos, tais como a celulose, e ao fato de não interagir com dissacarídeos e monossacarídeos. Sendo assim, a formação dos halos se dá pela hidrólise dos polissacarídeos do meio, liberando dissacarídeos e monossacarídeos, os quais não reagem com o lugol, levando a formação dos halos translúcidos ao redor da colônia, que corresponde à zona de hidrólise dos substratos celulósicos (JANG; CHEN, 2003; SADHU; MAITI, 2013).

A cepa N378 foi selecionada por ser capaz de degradar a celulose microcristalina, usando-a como fonte de carbono para seu crescimento, indicando assim, sua capacidade de sintetizar enzimas celulolíticas.

4.3. Influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e atividade celulolítica

Ao avaliar o crescimento do microrganismo utilizando fontes complexas de carbono, foram utilizados tempos de incubação de até 192 horas. O meio 1 apresentou maior crescimento com valores de D.O. de 2,19, já em relação ao pH foi observado um aumento quase que contínuo até o valor de 8,54 (Figura 5), indicando que o

microrganismo cresce ao passo que compostos de nitrogênio orgânico são assimilados, tornando o pH do meio mais alcalino.

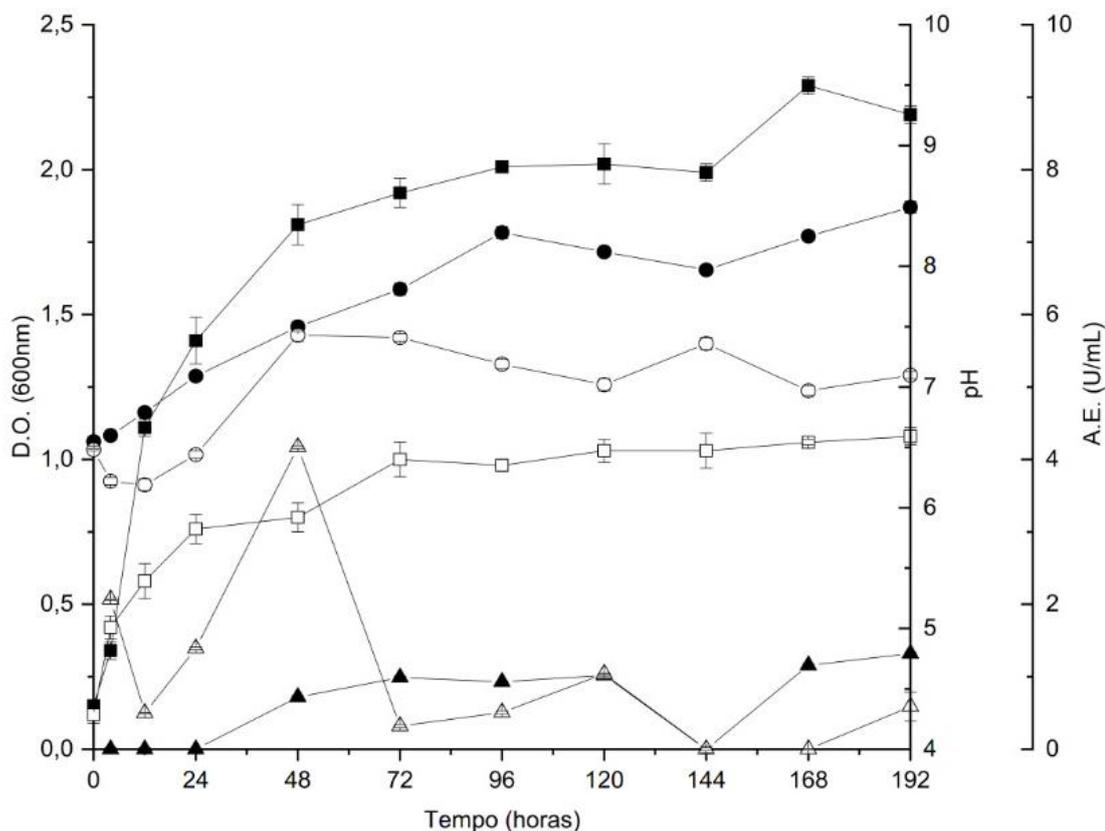


Figura 5 - Curva de crescimento, pH e atividade de avicelase em função do tempo de cultivo de *Bacillus licheniformis* N378 em diferentes meios, pH inicial 7,0 a 37 °C a 150 rpm. D.O. meio 1 (■), D.O. meio 2 (□), pH meio 1 (●), pH meio 2 (○), A. E. meio 1 (▲) e A. E. meio 2 (△).

O microrganismo mostrou maior crescimento no meio 1 quando comparado ao meio 2, como era esperado já que o meio 1 era mais rico, com maiores porcentagens de extrato de levedura, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 , citrato de sódio e $MnCl_2$.

Em relação ao pH, o microrganismo incubado no meio 1, mostrou um aumento no pH durante todo o tempo do cultivo, chegando a valores de pH de 8,54. Diferente comportamento foi observado no meio 2, em que ocorreu uma ligeira queda no crescimento nas primeiras 12 horas, seguida de um aumento até valores de 7,15.

Comparando-se o meio 1 com o meio 2, percebe-se que a quantidade de extrato de levedura é duas vezes menor no meio 2 e a concentração de sulfato de amônio é quatro vezes menor, mostrando que o meio favoreceu o crescimento.

Segundo relatado por Ming Chu (1992), a acidificação ou a alcalinização do meio de cultivo é reflexo do consumo de substrato por parte dos microrganismos, por exemplo, quando íons amônio estão sendo utilizados nas vias metabólicas, o meio torna-se mais ácido e quando o nitrogênio orgânico está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino.

Sendo assim, no presente estudo era de se esperar que o meio 1 apresentasse maiores valores de pH, já que continha em sua composição maior concentração de extrato de levedura, sendo uma fonte orgânica de nitrogênio, que quando metabolizada favorece a alcalinização do meio, além da presença do citrato de sódio que por meio da dissociação dos íons de sódio pode ter influenciado também na alcalinização do meio.

Oliveira e colaboradores, (2014) estudaram a produção de avicelase por *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo 0,5% de avicel como fonte de carbono e suplementado com 0,5% de água de maceração de milho, incubado em pH 7,0 a 50 °C por 192 horas e encontraram valores de D.O. (600 nm) de 1,0 e pH de 9,0. Podendo ser observado ligeira semelhança de comportamento com a cepa N378 no meio 2, que apresentou valores de D.O. próximos de 1 e pH tendendo ao alcalino.

No presente experimento, verificou-se que apesar do meio 1 ter permitido um crescimento praticamente duas vezes maior que o meio 2, o mesmo apresentou atividade enzimática para a avicelase ligeiramente menor, com valor máximo de atividade de 1,32 U/mL no tempo de 192 horas de incubação.

O microrganismo apresentou um menor crescimento no meio 2, no entanto maior atividade enzimática de avicelase, 4,17 U/mL com 48 horas de incubação.

A composição do meio pode influenciar na produção da enzima. Segundo Abdel-Fattah (2007) as concentrações de avicel, extrato de levedura e sulfato de amônio foram os fatores que mais influenciaram na produtividade da enzima, como também ficou evidenciado nesse estudo.

Como o objetivo do trabalho foi a produção de avicelase, o meio 2 foi selecionado por apresentar maior produção da enzima. Assim, a utilização da casca de café sem tratamento (meio 2) e com tratamento alcalino (meio 3), foi avaliada.

Observa-se que o microrganismo (Figura 6) apresentou um crescimento bem semelhante quando incubado nos meios 2 e 3. As curvas de crescimento, assim como os valores de pH foram bem semelhantes, nos meios, mostrando que o microrganismo foi capaz de crescer. Entretanto, percebe-se que no meio 3, contendo casca de café tratada com solução alcalina, proporcionou um maior crescimento inicial.

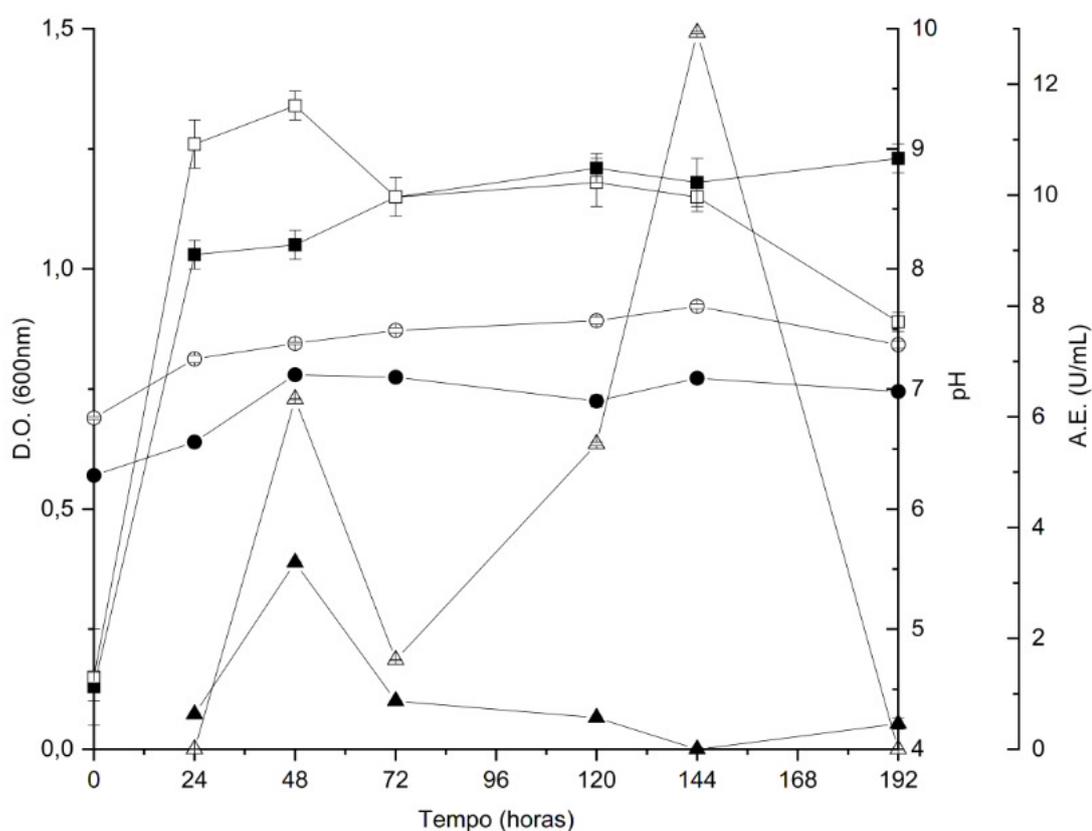


Figura 6 - Curva de crescimento, pH e atividade de avicelase em função do tempo de cultivo de *Bacillus licheniformis* N378 em meio contendo casca não tratada (meio 2) e casca tratada com NaOH 1% (m/v) (meio 3), pH inicial 7,0 a 37 °C a 150 rpm. D.O. meio 2 (■), D.O. meio 3 (□), pH meio 2 (●), pH meio 3 (○), A. E. meio 2 (▲) e A. E. meio 3 (△).

O propósito do pré-tratamento utilizado nos resíduos lignocelulolíticos consiste na remoção de parte da lignina e hemicelulose, além de reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais lignocelulósicos, tornando-os mais facilmente metabolizáveis (SINGH et al., 2009). Assim, o pré-tratamento de alguns

resíduos lignocelulósicos torna a celulose mais disponível e com maior potencial de utilização por parte dos microrganismos (HUANG; MONK, 2004).

A maior atividade enzimática foi encontrada com 144 horas de fermentação (12,93 U/mL). Observa-se ainda, que em um tempo menor de cultivo (48 horas), também havia produção da enzima com aproximadamente metade da atividade (6,32 U/mL).

Abdel-Fattah e colaboradores (2007) descreveram a produção de avicelase por um isolado termofílico de *Geobacillus* crescendo em meio otimizado e encontraram atividade máxima de 0,8 U/mL no tempo de 12 horas. Oliveira e colaboradores (2014) encontraram valor de atividade máxima da avicelase (1,5 U/mL) no tempo de 120 horas. Valores bem abaixo do encontrado no presente trabalho.

Shajahan e colaboradores (2017), encontraram valores máximos de atividade de celulasas de 42,99 UI/mL após 72 horas de incubação em condições otimizadas de processo.

Esses estudos mostram que a cepa N378, tem potencial para produção de avicelase, e que se otimizados os parâmetros de processos e mais elucidados os mecanismos que influenciam na síntese da enzima, o referido microrganismo tende a aumentar sua atividade.

4.4. Caracterização da avicelase

O meio contendo (g.L⁻¹: extrato de levedura, 1; MgSO₄.7H₂O, 0,2; KH₂PO₄, 1,36; (NH₄)₂SO₄, 1; NaCl, 1; KCl, 0,29; K₂HPO₄, 0,87; CaCl₂, 0,29; FeSO₄, 0,01; solução traços de metal, 1 mL; casca tratada, 5), foi utilizado para a caracterização parcial da avicelase, a 37 °C, 150 rpm em intervalos de tempo com produção de enzima.

4.4.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da avicelase

A avicelase produzida pelo *Bacillus licheniformis* N378 foi avaliada na faixa de pH entre 4,0 e 10,0 (Figura 7). O pH ótimo encontrado foi de 7,0. Observa-se que no intervalo de pH 6,5 a 7,5 a enzima manteve cerca de 80 % da sua atividade relativa, e em valores de pH de 6,0 e 8,0 a atividade permaneceu em torno de 55 %, quase metade da atividade máxima relativa encontrada no pH 7,0.

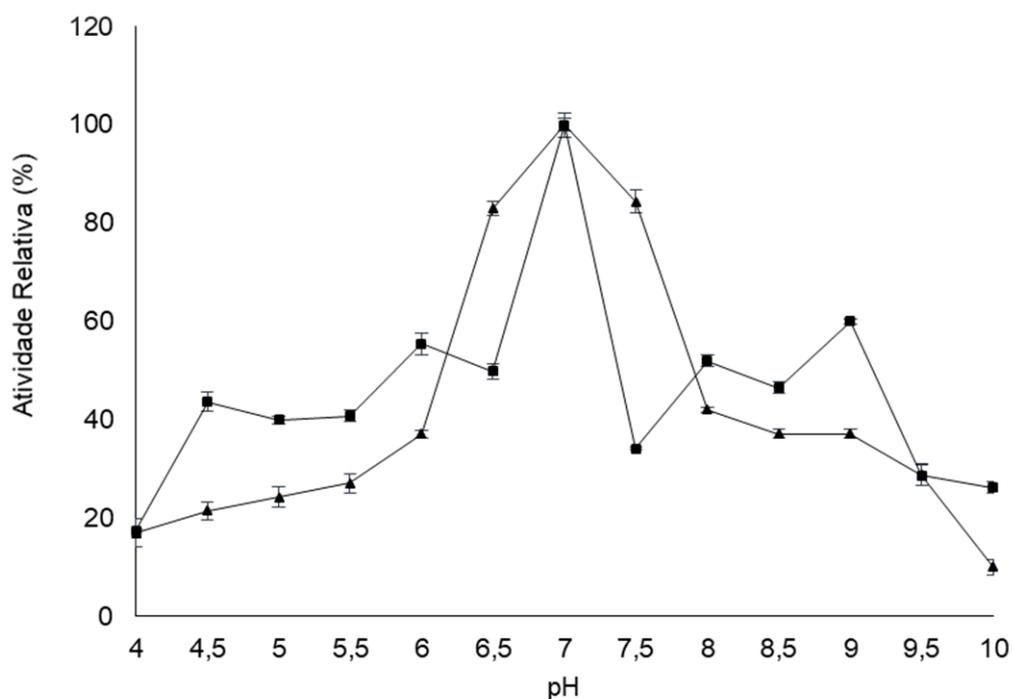


Figura 7. pH ótimo (■) e estabilidade (▲) da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* N378, cultivado à 37 °C por 120 horas em frascos agitados contendo em meio líquido. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 3,06 U/mL).

Alguns trabalhos, avaliando a caracterização de celulases microbianas, mostraram valores de pH ótimo semelhantes ao presente estudo. Avicelases produzidas por *Geobacillus stearothermophilus* mostraram pH ótimo em 7,0 (MAKKY, 2009), celulases de *Bacillus licheniformis* com pH ótimo de 6,5 (SHAJAHAN, et al., 2017), avicelase de *Bacillus sp.* com pH ótimo de 8,5 (OLIVEIRA, et al., 2014). Esses dados mostram que cada microrganismo possui condições específicas para a síntese de enzimas.

Em relação à estabilidade da enzima do presente estudo, verificou-se que a avicelase manteve cerca de 80 % de atividade após 3 horas de incubação em pH 6,5 e 7,5, ou seja, em pH próximos ao ótimo. Em pH 6, 8, 8,5 e 9, foi capaz de manter apenas 40% de atividade relativa e para os demais perdeu aproximadamente 80% de atividade. De acordo com Ravindran e Jaiswal, (2016), é comum que enzimas sejam mais estáveis em valor de pH igual ao seu pH ótimo de atividade, o que pode ser observado no presente estudo.

No estudo de Makky (2009), a avicelase manteve cerca de 80% da atividade relativa nos intervalos de pH próximos ao ótimo 6,0 – 8,0, quando incubada por 4 horas em temperatura ambiente. Oliveira et al. (2014) obtiveram resultados que mostram que a enzima manteve cerca de 80 % da sua atividade em pH próximos ao ótimo 6,5 – 8,5, quando incubada por 2 horas em temperatura ambiente.

4.4.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da avicelase

A enzima obtida durante o cultivo de 120 horas de fermentação a 37 °C e 150 rpm de agitação, foi analisada em diferentes temperaturas, abrangendo uma faixa de 30 °C a 100 °C em pH 7,0. Observa-se na Figura 8 que a atividade da enzima aumentou com o aumento da temperatura, até atingir 90 °C (temperatura ótima), e depois diminuiu, com perda completa da atividade em temperatura de 100 °C.

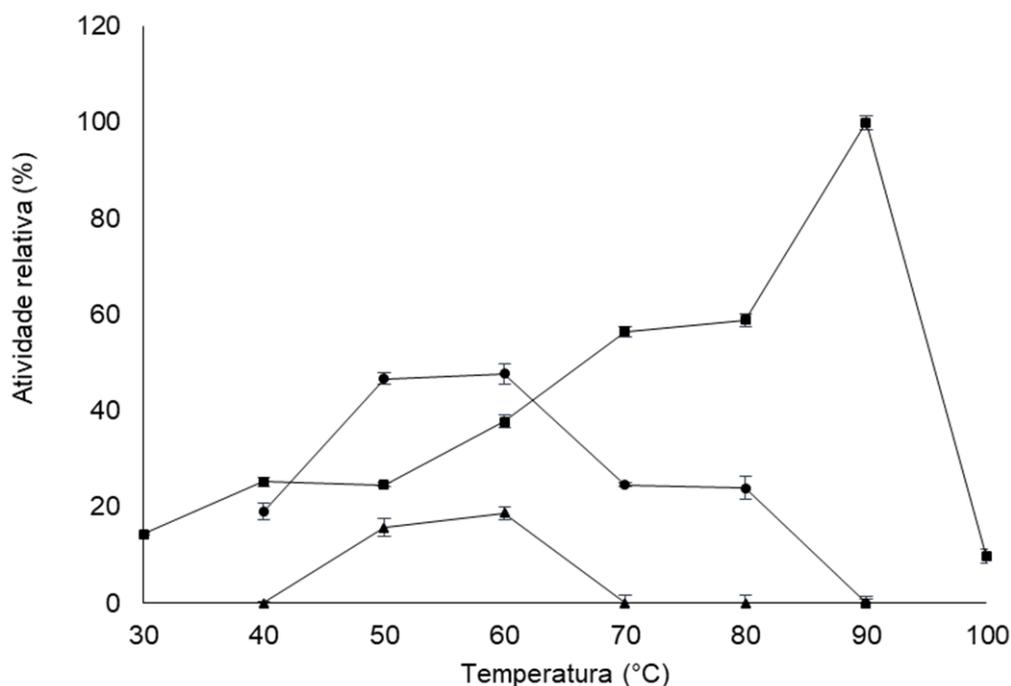


Figura 8. Temperatura ótima (■), estabilidade por 1 h (●) e 2 h (▲) da avicelase produzida pelo *Bacillus licheniformis* N378 cultivado a 37 °C por 120 horas (100% da atividade da enzima = 3,38 U/mL).

Makky (2009) e Oliveira et al., (2014), encontraram valores de temperatura ótima para a enzima avicelase de 50 °C e 70 °C, respectivamente, ambos os autores trabalharam com o gênero *Bacillus* caracterizados como termófilos. Comparando-se os estudos com o presente trabalho, verificou-se que o *Bacillus licheniformis* cepa N378, apresentou melhores atividades da avicelase em temperaturas mais altas de incubação, apesar de não ser classificado como termofílico.

A termoestabilidade da avicelase foi determinada incubando-se o extrato bruto enzimático na ausência de substrato, nas temperaturas de 40 a 100 °C, por 1 e 2 horas, medindo a atividade residual a 90 °C, (conforme o item 3.6). Foi observado que nas temperaturas de 50 °C e 60 °C a enzima manteve cerca de 50 % da atividade enzimática e cerca de 25 % da atividade quando exposta a 70 °C e 80 °C por 1 hora. Durante 2 horas de incubação, nota-se que a enzima manteve cerca de 20 % de atividade nas temperaturas de 50 °C e 60 °C, e que nos demais intervalos de temperatura a atividade foi completamente perdida (Figura 8).

Aygan e Arıkan, (2008) ao estudarem celulases termoestáveis de *Bacillus* sp. C14, encontraram a temperatura de 50 °C como ótima e que a atividade enzimática

foi de 88 %, no intervalo de temperatura de 20 °C a 60 °C, 85 % de atividade, no intervalo de temperatura de 20 °C a 80 °C, e atividade de 65 %, quando no intervalo de 90 °C a 100 °C, quando incubados por 30 minutos.

Liang et al., (2009), ao estudarem celulases de *Brevibacillus* sp. termofílico, estirpe JXL, encontraram a temperatura de 50 °C como ótima e a enzima manteve 50 % da sua atividade ao ser incubada por 1 hora a temperatura de 100 °C. A enzima encontrada no presente estudo, apresentou baixa estabilidade quando incubada por 1 hora nas temperaturas de 70 °C e 80 °C, mantendo cerca de 25 % da sua atividade, e total perda da atividade na temperatura de 90 °C, quando incubada por 1 hora.

Para avaliar o efeito da temperatura de 90 °C na atividade da enzima durante 60 minutos, foi obtido o extrato bruto enzimático, em fermentação a 37 °C / 150 rpm durante 72 horas de cultivo. A atividade foi medida conforme o item 3.6. O extrato bruto enzimático foi incubado a 90 °C por 60 minutos e avaliados em intervalos de tempo de 10 minutos (Figura 9). O tempo 0 foi considerado como 100 % da atividade.

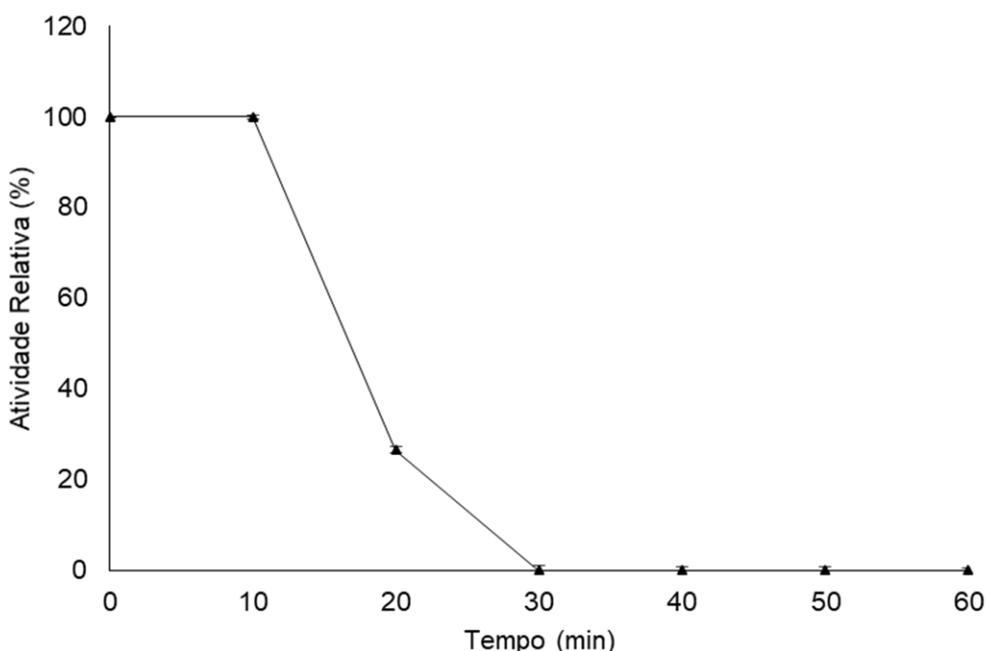


Figura 9. Estabilidade da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* N378 a 90 °C durante 60 minutos, cultivado a 37 °C/150 rpm por 72 horas de fermentação (100% da atividade da enzima = 1,26 U/mL).

A atividade foi mantida por 10 minutos, e nos demais intervalos ocorreu uma perda de 73 % no tempo de 20 minutos e a partir de 30 minutos a enzima perdeu toda atividade.

Rastogi et al., (2010), ao estudarem a caracterização de celulases termoestáveis produzidas por *Bacillus* e *Geobacillus*, relataram que os isolados WSUCF₁ e DUSELR₁₃ mantiveram 89 % e 78 % das atividades enzimáticas iniciais, após um dia de incubação à 70 °C.

Huang e Monk, (2004) relataram que a termoestabilidade de uma enzima está ligada a complexas interações dos fatores extrínsecos do meio onde a enzima está inserida, o que evidencia a necessidade de estudos para elucidar quais fatores influenciam a termoestabilidade da avicelase encontrado no presente estudo.

Certas regiões instáveis denominadas de pontos fracos, ou seja, regiões mais propensas a desdobramentos, são determinantes na estabilidade enzimática e estão localizadas normalmente perto da superfície da molécula de proteína. A estabilidade térmica das enzimas pode ser atribuída de uma maneira geral a sua maior hidrofobicidade, maior capacidade de enovelamento, redução dos pontos de ramificação, substituição de resíduos de aminoácidos, aumento dos resíduos de prolina, entre outros fatores (KUMAR, 2003). Mostrando a grande variedade de fatores que podem influenciar a estabilidade térmica de uma enzima.

4.4.3. Efeito da concentração salina na atividade da avicelase

Para avaliar o efeito da concentração salina na atividade enzimática, o extrato bruto foi incubado em concentrações de 1% a 5% de NaCl por 60 minutos em temperatura ambiente e em pH 7. Conforme ilustrado na Figura 10, a enzima perdeu cerca de 80 % da sua atividade com as concentrações de 1%, 2% e 3%, e cerca de 90% da sua atividade nas concentrações de 4% e 5%. Mostrando que a enzima não tem características halofílicas, perdendo grande parte da atividade em ambientes com presença de sal.

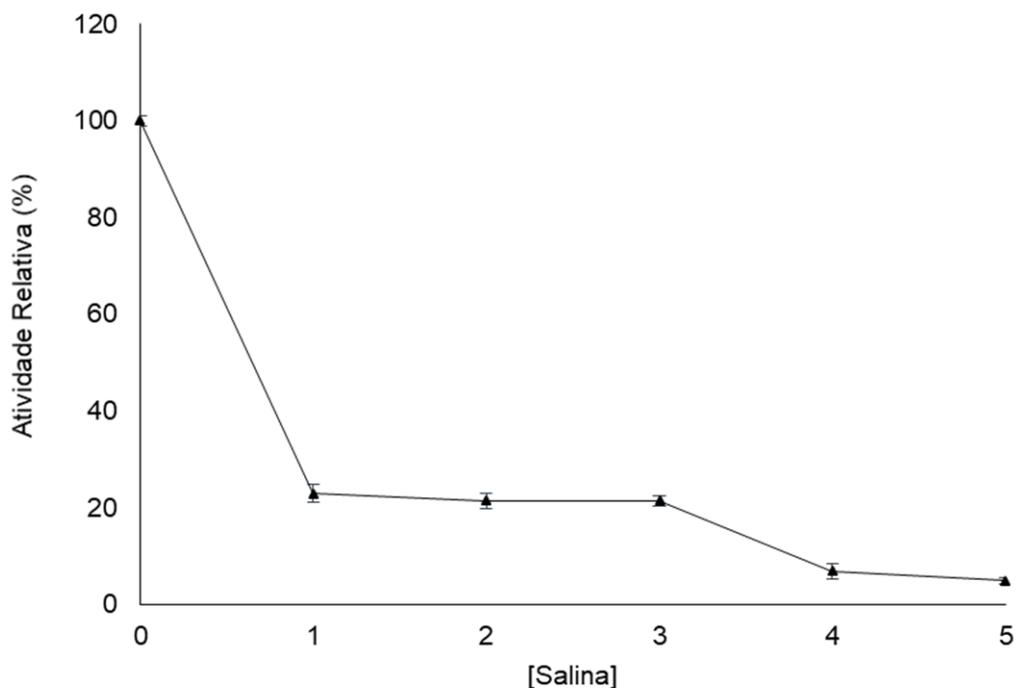


Figura 10. Efeito da concentração salina na atividade da avicelase produzida pelo *Bacillus licheniformis* N378 a 37 °C/150 rpm durante 144 horas de fermentação (100% de atividade relativa = 5,66 /mL).

Aygan e Arikan, (2008) ao estudarem celulasas termoestáveis de *Bacillus* sp. C14, caracterizado como moderadamente halofílico, encontraram que a celulase produzida teve atividade ótima em concentração de NaCl de 20 %, e ainda manteve 75 % e 70 % da sua atividade quando incubada por 1 e 6 horas respectivamente nessa mesma concentração salina.

Valores bem diferentes do encontrado no presente estudo, onde a enzima perdeu grande parte de sua atividade relativa quando exposta à pequenas concentrações de NaCl. No entanto, as características do microrganismo, quanto a sua tolerância osmótica, assim como, do local onde o mesmo foi isolado, podem estar associados com o fato do microrganismo possuir ou não, a capacidade de sintetizar enzimas com maior atividade em altas concentrações salinas.

Como exemplo, Cabrera et al., (2013) ao estudarem diversas bactérias celulolíticas isoladas dos solos de chinampas, encontraram 14 isolados de *Bacillus* produtores de celulasas e avaliaram a capacidade das enzimas em degradar compostos quando incubada em ambiente com concentração salina de 1, 3, 5, 7 e 9 % de NaCl. Concluíram que as celulasas produzidas por todos os isolados tiveram

atividade enzimática em 1 % NaCl, porém, nenhuma enzima produzida apresentou atividade em 9 % de NaCl.

4.4.4. Efeito dos íons metálicos na atividade da avicelase

A Figura 11 apresenta os resultados encontrados para o efeito dos íons metálicos na atividade da avicelase e mostram que todos os íons estudados reduziram drasticamente a atividade da enzima.

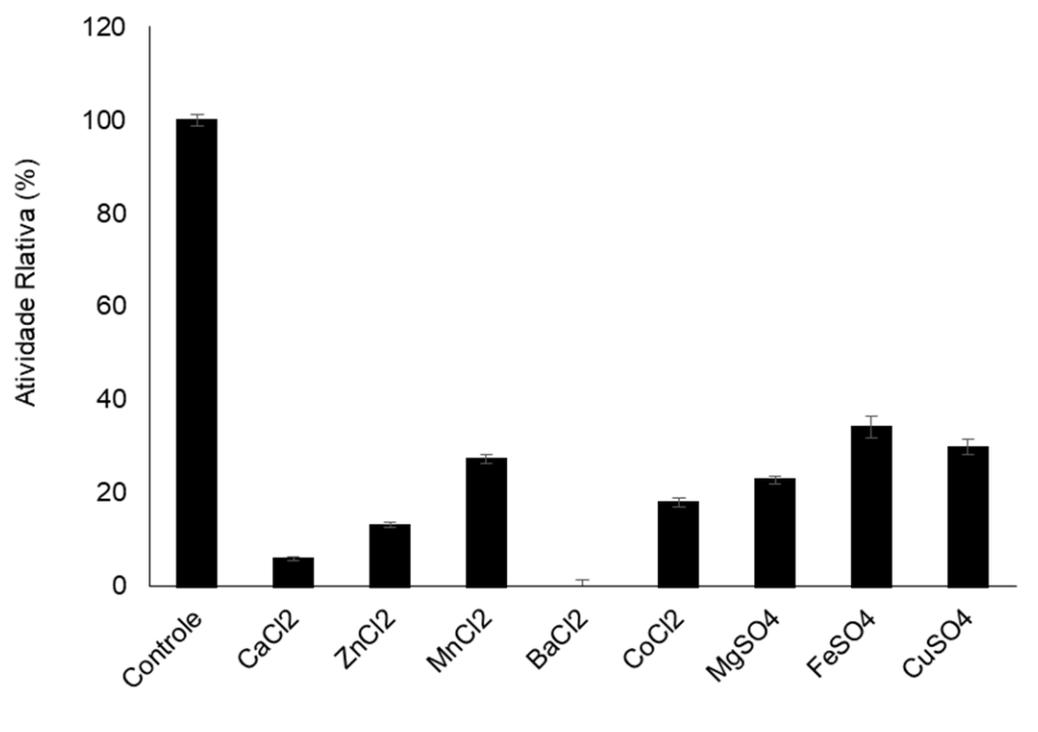


Figura 11. Atividade da avicelase produzida pelo *Bacillus licheniformis* N378 após 144 horas de incubação a 37 °C/150 rpm. A enzima incubada na presença de íons metálicos na concentração de 5 mM por 20 minutos em temperatura ambiente (25 °C ± 2) (100% da atividade relativa = 5,66 U/mL).

Mukherjee et al., (2011), ao avaliarem o efeito de Mn⁺², Fe⁺², Cu⁺² e Hg⁺², constataram que Mn⁺² e Fe⁺², foram capazes de aumentar a atividade enzimática, ao passo que o Cu⁺² e Hg⁺² diminuíram a atividade.

Shajahan et al., (2017), encontraram efeitos positivo na atividade enzimática para os íons CaCl₂.6H₂O, NiSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O e para o FeSO₄.7H₂O, relatando efeito não positivo na atividade enzimática somente para o íons MnCl₂.4H₂O.

Enzimas microbianas extracelulares são geralmente conhecidas por exigir cátions divalentes para a atividade e sua estabilização, entretanto, a enzima avicelase estudada apresentou redução da atividade para todos os íons testados, resultado que difere de vários autores (MAKKY, 2009; MUKHERJEE et al., 2011; LIN, 2012; OLIVEIRA et al., 2014). De acordo com Aygan e Arikan, (2008), alguns íons metálicos na sua forma de sal, interagem com a enzima evitando a desnaturação térmica, desempenhando papel importante na estabilidade de enzimas à altas temperaturas.

No entanto, a presença de íons metálicos pode também levar à oxidação dos grupamentos tiol, podendo levar a formação de complexos com grupamentos específicos, ocasionando em redução na viabilidade da enzima, e conseqüentemente, na sua atividade (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a bactéria *Bacillus licheniformis* cepa N378, isolada durante a secagem natural de frutos de café Conilon, do sul do Estado do Espírito Santo, foi capaz de produzir avicelase em fermentação submersa a partir de resíduos do beneficiamento de café *in natura* e com tratamento alcalino. Uma alternativa viável que pode favorecer a produção dessa enzima com menor custo, além de reduzir o impacto ambiental negativo.

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com sucesso, visando a produção de celulases por microrganismos do gênero *Bacillus*, mostrando sua grande aplicação no trabalho, assim como seu potencial para aplicações futuras.

Como perspectivas para novos trabalhos, sugerem-se estudos para otimização do meio de cultivo para produção de enzimas e estudos para avaliar quais são os principais fatores indutores e repressores da secreção de avicelase, além de estudos da aplicação da enzima comparando-a com as enzimas de uso comercial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R.; EL-HELOW, E. R.; GHANEM, K. M.; LOTFY, W. A. Application of factorial designs for optimization of avicelase production by a thermophilic *Geobacillus* isolate. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 13-23, 2007.

ACHARYA, P. B.; ACHARYA, D. K.; MODI, H. A. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 22, 2008.

ADAMS, M.; GHALY, A. E. Maximizing sustainability of the Costa Rican coffee industry. **Journal of Cleaner Production**, Nova Scotia, v. 15, n. 17, p. 1716-1729, 2007.

ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; CHAO, L. T.; TAN, L.; SINGH, S.; SZE, S. K. Proteomic analysis of pH and strains dependent protein secretion of *Trichoderma reesei*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 10, p. 4579-4596, 2011.

ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S. K. Proteomic analysis of temperature dependent extracellular proteins from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state culture condition. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 6, p. 2715-2731, 2013.

ADRIO, Jose L.; DEMAIN, Arnold L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AKIBA, S.; KIMURA, Y.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 125-130, 1995.

ALBUQUERQUE L. S.; DE ARAUJO J. C. Produção de biogás por co-digestão utilizando uma mistura de dejetos bovinos e casca de café conilon. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 2, n. 3, p. 44-54, 2016.

ANDRADE, A. P. S. **Análise química e avaliação do potencial alelopático da casca do café (*Coffea arabica*)**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2009.

ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, 2018.

AYGAN, A. S. H. A.; ARIKAN, B. U. R. H. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus sp.* C14 isolated from Van soda lake. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 10, n. 4, p. 369-374, 2008.

AYGAN, A.; KARCIOGLU, L.; ARIKAN, B. Alkaline Thermostable and halophilic andoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 789 – 796, 2011.

BAÊTA B. E. L.; CORDEIRO P. H. M.; PASSOS F.; GURGEL L. V. A.; AQUINO S. F.; POLANCO F. F. Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 66-72, 2017.

BANERJEE, A. C.; KUNDU, A.; GHOSH, S. K. Genetic manipulation of filamentous fungi. In: **New Horizons in Biotechnology**. Springer, Dordrecht, p. 193-198, 2003.

BARRETO, L, S. **Pré-tratamento ácido de palha de café: Primeira etapa do processo de obtenção de etanol celulósico**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Espírito Santo. 2018.

BARROS, R. N.; SANTOS, M. S. M.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. A utilização de resíduos agroindustriais para produção de bioetanol. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 31-43, 2019.

BATH, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BEKALO, S. A.; REINHARDT, H. W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**, v. 43, n. 8, p. 1049-1060, 2010.

BEKARE, M. K.; ADEWALE, I. O.; AJAYI, A.; SHONUKAN, O. O. Purification characterization of cellulose from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 898-904, 2005.

BENOCCI, T.; AGUILAR-PONTES, M. V.; ZHOU, M.; SEIBOTH, B.; DE VRIES, R. P. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 152, 2017.

BHUNIA, B.; BASAK, B.; DEY, A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus spp.* **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, p. 448-457, 2012.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011. BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 98-101, 2007.

BOURGAIZE, D., JEWELL, T.R., BUISER, R.G. **Biotechnology: Demystifying the Concepts**. Benjamin/Cummings, San Francisco, 2000.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de *okara* e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p.652-659, jul./set. 2006.

BRAAKSMA, M.; PUNT, P. J. **Aspergillus as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, 2011.

CABRERA, Y. T.; MENDOZA, A. P.; MURRIETA, M. S. V.; ORDUNA, F. N. R.; WANG, E. T. Diversas bactérias celulolíticas isoladas dos solos chinampa de húmus alcalino e salino. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 779-792, 2013.

CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 183-190, 2007.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. A.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 151-158, 2010.

CHAUDHARY, S.; SAGAR, S.; KUMAR, M.; SENGAR, R. S.; TOMAR, A. The Use of Enzymes in Food Processing: A Review. **South Asian Journal of Food Technology and Environment**, v. 1, n. 4, p. 2394-5168, 2015.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.

CLEVES, R. Ecological processing of coffee and use of byproducts. In: WINTGENS, J.N. (Ed.). **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, p.725–738, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Boletim Café setembro de 2019. **CONAB**, 2019. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 17 de set. de 2019.

CORRÊA, R. C. G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

DA SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.

DASARI, P. R.; RAMTEKE, P. W.; KESRI, S.; KONGALA, P. R. Comparative Study of Cellulase Production Using Submerged and Solid-State Fermentation. In: **Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases**. Springer, Cham, 2019. p. 37-52.

DE ALMEIDA, A. C. P. S.; SILVA, L. M. M. M.; NETO, J. S. B.; CELESTINO, E. L. F. G.; SILVA, J. M.; SILVA, C. S.; NASCIMENTO, M. S.; CRISTO, C. C. N.; SANTOS, T. M. C. Cultivo axênico de cogumelos comestíveis em resíduos agroindustriais. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 3, n. 1, p. 6651, 2018.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, Campinas, v. 6, n. 6, p. 1085-1093, 2015.

DEKA, D.; DAS, S. P.; SAHOO, N.; DAS, D.; JAWED, M.; GOYAL, D.; GOYAL, A. Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, Article ID 965310, 2013.

DONINI, I. A. N.; SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Relatório Mensal setembro 2019. **EMBRAPA**, 2019. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/CECAFE_Relatorio_Mensal_SETEMBRO_2019.pdf>. Acesso em 17 de set. de 2019.

FARAHAT, S. M.; RABIE, A. M.; FARAG, A. A. Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains. **Food chemistry**, v. 36, n. 3, p. 169-180, 1990.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, R. N. **Utilização do bagaço da cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de celulases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2016

GARZON, N. G. R. **Estudo da alteração do perfil de proteínas de fungos filamentosos em diferentes condições de cultivo utilizando ferramentas**

proteômicas e ensaios enzimáticos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, New Delhi, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOUVEA, B. M.; TORRES, C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E.S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, Belo Horizonte, v. 31, n. 9, p. 1315-1319, 2009.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market Size Expected To Reach \$17.50 Billion By 2024.** Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market>>. Acesso em: outubro de 2019.

GUSMÃO, R. O.; FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, 2014.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2002.

HUANG, X. P.; MONK, C. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 85-92, 2004.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p., 2005.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Exportações de café pelos países exportadores. **ICO**, 2019. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics>. Acesso em: 17 de set. de 2019.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 1, p. 92, 2013.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263-268, 2003.

JEYARAM, K.; ROMI, W.; SINGH, T. A.; ADEWUMI, G. A.; BASANTI, K.; OGUNTOYINBO, F. A. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 2, p. 161-164, 2011.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5602-5609, 2008.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 239-243, 2004.

KAZEEM, M. O.; SHAH, U. K. M.; BAHARUDDIN, A. S.; RAHMAN, N. A. A. Enhanced cellulase production by a novel thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55: characterization and application in lignocellulosic saccharification. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 5404-5423, 2016.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, p. 1008-1014, 2005.

KOCHER, G.; KALRA, K.; BANTA, G. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 21-28, 2008.

KRAPPMANN, S.; BRAUS, G. H. Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 43, n. sup1, p. 31-40, 2005.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; SINGH, A.; ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950-4962, 2011.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Co-cultivation of *Penicillium sp.* AKB-24 and *Aspergillus nidulans* AKB-25 as a cost-effective method to produce cellulases for the hydrolysis of pearl millet stover. **Fermentation**, v. 2, n. 2, p. 12, 2016.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365-378, 2013.

LADEIRA, S. A. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanas por espécies de *Bacillus sp.*** Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2013.

LAKSHMI, B. K. M.; HEMALATHA, K. P. J. Production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* through statistical optimization of growth media by response surface methodology. **Fermentation Technology**, v. 5, n. 2, p. 130-137, 2016.

LANGARO, C.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L.; MUNHEIRO, P. M.; DEAK, J. C. S.; FACHESATTO, C.; BERTUAL, L. C.; GEBERT, D. G. C. Otimização do processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por hidrólise enzimática com celulases fúngicas. **Revista Tecnológica**, p. 53-62, 2015.

LEE, Y. J.; KIM, B. K.; LEE, B. H.; JO, K. I.; LEE, N. K.; CHUNG, C. H.; LEE, Y. C.; LEE, J. W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 378-386, 2008.

LEI, G.; ZHU, W. C.; LIU, C. Fermentation conditions optimization of anti-tumor active metabolites from marine *Penicillium sp.* HGQ6. In: **Advanced Materials Research**, p. 344-350, 2012.

LIANG, Y.; YESUF, J.; SCHMITT, S.; BENDER, K.; BOZZOLA, J. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus sp.* strain JXL. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 961-970, 2009.

LIANG, Y.; FENG, Z.; YESUF, L.; BLACKBURN, J. W. Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus sp.* 527. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1841-1852, 2010.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 272-277, 2005.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMICELL, W. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Edgard Blucher Ltda.** São Paulo: vol. 3, 2001.

LIMA, G. S.; MANHÃES, J. H. C.; PESSOA, T. N.; MIGUEL, D. L.; SIMÕES, M. L. G. Utilização de casca de café como substrato para produção de celulase por *Trichoderma spp.* **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil.** 2013.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in energy and combustion science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LIN, L.; KAN, X.; YAN, H.; WANG, D. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 2-2, 2012.

LIU, Y. T.; LUO, Z. Y.; LONG, C. N.; WANG, H. D.; LONG, M. N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **New Biotechnology**, v. 28, p.733-737, 2011.

LLARCH, À.; LOGAN, N. A.; CASTELLVÍ, J.; PRIETO, M. J.; GUINEA, J. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus spp.* from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. **Microbial Ecology**, v. 34, n. 1, p. 58-65, 1997.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical

framework and methodological approach. **Biotechnology and bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MAAREL, M. J. E. C. V. D.; VEEN, B. V. D.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

MAKKY, E. A. Avicelase production by a thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* isolated from soil using sugarcane bagasse. **World Academy of Science Engineering and Technology**, v. 57, p. 487-91, 2009.

MANERA, A. P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; FILHO, F. M. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2011.

MARCO, E. G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus sp.* **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Natick, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: **New Products and New Areas of Bioprocess Engineering**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. p. 61-138.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Production of extra cellular exoglucanase by *Rhizopus oryzae* from submerged fermentation of agro wastes. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 3, 2011.

MURPHY, J. D.; MCCARTHY, K. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. **Applied Energy**, v. 82, n. 2, p. 148-166, 2005.

MURTHY, P. S.; MADHAVA, N. M. Sustainable management of coffee industry by-

products and value addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, New Delhi, v. 66, p. 45-58, 2012.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

OLEMPСКА-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 144-158, 2006.

OLIVEIRA, L. R. C.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L.; MARTINS, M. A. Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus sp.* SMIA-2. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 215-222, 2014.

ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Effect of the enzymatic treatment on the viscosity and fiber and pectin contents of pitanga (*Eugenia uniflora L.*) juice. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 231-238, 2015.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PANDEY, A.; SOCCOLB, C. R.; NIGAMC, P.; BRANDB, D.; MOHANB, R.; ROUSSOSD, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, n. 153-162, 2000.

PANESAR, P. S.; KAUR, R.; SANGWAN, R. S. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016.

PARRADO, J.; MORGADO, B. R.; TEJADA, M.; HERMANDEZ, T.; GARCIA, C. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 1-7, 2014.

PEREIRA, P. V. **Dinâmica microbiana e aspectos físicos e químicos de café conilon (*Coffe canephora* Pierre e Froehner) cultivado em diferentes ambientes**

e processado por via natural. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DOURADO, J.; LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZ, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 197-203, 2016.

QUITAIN, A. T.; ORO, K.; KATOH, S.; MORIYOSHI, T. Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 13, p. 1509-1514, 2006.

RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. R.; CHRISTOPHER, L. P.; SANI, R. K. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8798-8806, 2010.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Exploitation of food industry waste for high-value products. **Trends in Biotechnology**, Dublin, v. 34, n. 1, p. 58-69, 2016.

RÊGO, A. P. B.; CUNHA, J. R. B.; SANTOS, R. S.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Produção de enzimas CMCase e pectinase por processo fermentativo utilizando casca de café suplementada com manipueira como substrato. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 8, n. 1, 2019.

REHMAN, H. U. R.; QADER, S. A. U. I.; AMAN, A. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 387-391, 2012.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

ROONEY, A. P.; PRICE, N. P. J.; EHRHARDT, C.; SWEZEY, J. L.; BANNAN, J. D. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2429-2436, 2009.

SABAT, J.; GUPTA, N. Nutritional factors affecting the antifungal activity of *Penicillium steckii* of mangrove origin. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 126-135, 2010.

SADHU, S.; MAITI, K. Cellulase production by bacteria: A review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3 (3), p. 235-258, 2013.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SAMPAIO, A.; DRAGONE, G.; VILANOVA, M.; OLIVEIRA, J. M. Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. **LWT-Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 557-563, 2013.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, L. C.; ADARME, O. F. H.; BAËTA, B. E. L.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 601-612, 2018.

SARATALE, D. G.; OH, S. E. Production of thermo-tolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiopsis* sp. KNU. **Biodegradation**, v. 22, p. 905-919, 2011.

SEDIYAMA, G. C.; JUNIOR, J. C. F. M.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, A.; COSTA, M. H.; HAMAKAWA, P. J.; COSTA, J. M. N.; COSTA, L. C. Zoneamento agroclimático do

cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para o Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, n. 3, p. 501-509, 2001.

SELVIG, K.; ALSPAUGH, J. A. pH response pathways in fungi: adapting to host-derived and environmental signals. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 249-256, 2011.

SHABEB, M. S. A.; YOUNIS, M. A. M.; HEZAYEN, F. F.; NOUR-ELDEIN, M. A. Production of cellulase in low cost médium by *Bacillus subtilis* KO strain. **Word Applied Science Journal**, 8:35-42, 2010.

SHAJAHAN, S.; MOORTHY, I. G.; SIVAKUMAR, N.; SELVAKUMAR, G. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University-Science**, v. 29, n. 3, p. 302-310, 2017.

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951-957, 2008.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p. 571-576, jul./set. 2006.

SINDHU, R.; BINOD, P.; MADHAVAN, A.; BEEVI, U. S.; MATHEW, A. K.; ABRAHAM, A.; PANDEY, A.; KUMAR, V. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1740-1748, 2017.

SINGH, V. K.; KUMAR, A. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* vs-1. **IUBMB Life**, v. 45, p. 443 – 452, 1998.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolated, *Bacillus sphaericus* JS1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p.51 - 56, 2004.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulase. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6679-6681, 2009.

SOCCOL, C. R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. **Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil**. 2002.

SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A. UMIDA. 1. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 455-458, 2003.

SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G.; REDDY, B. Rajasekhar. Production of cellulase by *Aspergillus niger* on natural and pretreated lignocellulosic wastes. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 580-592, 2009.

STRESHINSKAYA, G. M.; SHASHKOV, A. S.; POTEKHINA, N. V.; KOZLOVA, Y. I.; TUL'SKAYA, E. M.; SENCHENKOVA, S. N.; KUDRYASHOVA, E. B.; ANAN'INA, L. N. Carbohydrate-containing cell wall polymers of some strains of the *Bacillus subtilis* group. **Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 21-29, 2011.

SUKUMARAN, R. K.; SURENDER, V. J.; SINDHU, R.; BINOD, P.; JANU, K. U.; SAJNA, K. V.; RAJASREE, K. P.; PANDEY, A. Lignocellulosic ethanol in India: prospects, challenges and feedstock availability. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4826-4833, 2010.

ŚWIĄTEK, K.; LEWANDOWSKA, M.; ŚWIĄTEK, M.; BEDNARSKI, W.; BRZOZOWSKI, B. The improvement of enzymatic hydrolysis efficiency of rape straw and *Miscanthus giganteus* polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 323-331, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; TELES, A.; BRACARENSE, A. A. P.; GOMES, D. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 773-789, 2013.

TUDZYNSKI, Bettina. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 656, 2014.

TUOHY, M. G.; WALSH, D. J.; MURRAY, P. G.; CLAEYSSSENS, M.; CUFFE, M. M.; SAVAGE, A.; COUGHLAN, M. P. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1596, n. 2, p. 366-380, 2002.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, 2007.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; ROMERO-GOMEZ, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGURD, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 157-167, 2003.

WANG, L. T.; LEE, F. L.; TAI, C. J.; KASAI, H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1846-1850, 2007.

WANG, L.; XUE, B. Effects of Cellulase Supplementation on Nutrient Digestibility, Energy Utilization and Methane Emission by Boer Crossbred Goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 2, p. 204, 2016.

WANG, J.; LIU, S.; LI, Y.; WANG, H.; XIAO, S.; LI, C.; LIU, B. Central carbon metabolism influences cellulase production in *Bacillus licheniformis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 49-54, 2018.

YAZDI, M. T.; KHOSRAVI, A. A.; NEMATI, M.; MOTLAGH, N. D. V. Purification and characterization of two intracellular β -glucosidases from the *Neurospora crassa* mutant cell-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 79-84, 2003.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, Kuala Lumpur, v. 67, p. 319-338, 2014.

YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. CRC Press, 2002.

ZHANG, C.; XING, X. H.; LIU, M. S. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 181-187, 2004.

ZHANG, R.; EL-MASHAD, H. M.; HARTMAM, K.; WANG, F.; LIU, G.; CHOATE, C.; GAMBLE, P. Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v.98, n. 4, p. 929 – 935, 2007.