



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

THÁLITA CRISTYNE DE OLIVEIRA ALVES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE AVICELASE E
CARBOXIMETILCELULASE DE *Bacillus licheniformis* CCMA – 1674 EM MEIO
DE CULTIVO CONTENDO CASCA DE CAFÉ CONILON TRATADA COM NaOH
E ULTRASSOM**

ALEGRE – ES
FEVEREIRO – 2023

THÁLITA CRISTYNE DE OLIVEIRA ALVES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE AVICELASE E
CARBOXIMETILCELULASE DE *Bacillus licheniformis* CCMA – 1674 EM MEIO
DE CULTIVO CONTENDO CASCA DE CAFÉ CONILON TRATADA COM NaOH
E ULTRASSOM**

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

Coorientador: Prof. DSc. Jussara Moreira Coelho

ALEGRE – ES

FEVEREIRO – 2023

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

O48e Oliveira Alves, Thálita Cristyne, 1989-
ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE AVICELASE E CARBOXIMETILCELULASE DE *Bacillus licheniformis* CCMA – 1674 EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO CASCA DE CAFÉ CONILON TRATADA COM NaOH E ULTRASSOM / Thálita Cristyne Oliveira Alves. - 2023.

67 f. : il.

Orientadora: Raquel Vieira de 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. Celulases. 2. *Bacillus*. 3. Resíduo Lignocelulósico. 4. Café Conilon. 5. Tratamentos de Resíduos. I. Vieira de Carvalho, Raquel. II. Moreira Coelho, Jussara. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

THÁLITA CRISTYNE DE OLIVEIRA ALVES

**“ ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
AVICELASE E CARBOXIMETILCELULASE DE *Bacillus
licheniformis* CCMA – 1674 EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO
CASCA DE CAFÉ CONILON TRATADA COM NaOH E
ULTRASSOM ”**

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 10 de fevereiro de 2023.

R. Carvalho

Profª. Drª. Raquel Vieira de Carvalho
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Orientadora

Jara Rebouças Pinheiro

Profª. Drª. Jara Rebouças Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora Externa

Priscilla Cortizo Costa Piero

Profª. Drª. Priscilla Cortizo Costa Piero
Instituto Federal do Espírito Santo-IFES
Examinadora Externa

AGRADECIMENTOS

Agradecer em primeiro lugar, a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Espírito Santo Campus Alegre, bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Espírito Santo (CAPES) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e concessão de bolsa de estudo, que foi fundamental para a permanência durante todo tempo de pesquisa e estudo.

Ao meu namorado e companheiro, Dario Vimercati por ter me ajudado nos momentos mais difíceis me dando força e sempre me incentivando a ter mais foco e dedicação.

Aos amigos, que mesmo distantes em outro estado, sempre estiveram ao meu lado. Pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho.

A professora Dr^a Raquel Vieira de Carvalho, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade e a professora Jussara Moreira Coelho, minha coorientadora, por todo o conhecimento passado.

Meus sinceros agradecimentos aos componentes da banca de defesa que se disponibilizaram na contribuição de seus conhecimentos, Prof^a Priscilla Cortizo e Prof^a Iara Pinheiro.

A minha colega de Laboratório Mariana Lugon e grande amiga, pela parceria e apoio e por tudo que compartilhamos durante todo o nosso período acadêmico realizado nesses anos.

A todos que participaram, incentivaram e apoiaram para a realização desse sonho.

Lista de figuras

- Figura 1. Ação sinérgica das celulases.....6
- Figura 2. (A) Fruto de café com partes. Café em: (B) diferentes estágios de maturação, (C) corte transversal do fruto com a casca removida, (D) grão com mucilagem, (E, F) grãos após secagem com o pergaminho e (G) grão cru com a película prateada 11
- Figura 3. Fluxograma da condução dos experimentos.....24
- Figura 4: Efeito do pH (■) e estabilidade (●) ao pH da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 33,573 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo)30
- Figura 5: Efeito do pH (○) e estabilidade ao pH (◻) da carboximetilcelulase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 0,618 U/mL). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.....31
- Figura 6: Efeito da temperatura (▲) e estabilidade à temperatura durante 60 minutos (●), da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 5,240 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo)32
- Figura 7: Efeito da temperatura (○) e estabilidade à temperatura durante 60 min (▲) da CMCase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 0,673 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo)33
- Figura 8: Efeito dos íons metálicos na atividade da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima na ausência de íon metálico = 9,373 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo)35
- Figura 9: Estabilidade da avicelase na ausência do íon (▲), e presença de Mn²⁺ (●), da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado

com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 9,373 U/mL). (A) incubação a 50 °C, (B) incubação a 70 °C e (C) incubação a 90 °C36

Figura 10: Efeito dos íons metálicos na atividade da carboximetilcelulase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima na ausência de íon metálico = 0,484 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo)37

Figura 11. Estabilidade da carboximetilcelulase na ausência de íon (\ominus), na presença de Fe^{2+} ($\omin�$), produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 0,484 U/mL)38

Lista de tabelas

Tabela 1. Meios de crescimento	18
Tabela 2. Composição dos meios de cultivo contendo casca de café Conilon e <i>whey protein</i>	21
Tabela 3. Composição centesimal das amostras de casca de café com tratamento e sem tratamento.....	24
Tabela 4. Análises de extrativos totais, celulose, hemicelulose e lignina nas amostras de casca de café tratadas com NaOH e US (CT) e sem tratamento (ST).25	
Tabela 5. Avaliação do crescimento, pH e atividade de celulases secretadas pelo microrganismo <i>Bacillus licheniformis</i> CCMA 1674 em meio contendo casca de café tratada com NaOH e Ultrassom	26
Tabela 6. Resultados obtidos para o crescimento celular (D.O), pH e atividade das enzimas durante 168 h de cultivo a 37 °C e 150 rpm de agitação em meio de cultivo contendo 0,5% de casca de café tratada com NaOH e US (Meio 1)	27
Tabela 7. Resultados obtidos para o crescimento celular (D.O), pH e atividade das enzimas durante 168 h de cultivo a 37 °C e 150 rpm de agitação em meio de cultivo contendo 1,0% de casca de café tratada com NaOH e US (Meio 2)	28
Tabela 8. Resultados obtidos para o crescimento celular (D.O), pH e atividade das enzimas durante 168 h de cultivo a 37 °C e 150 rpm de agitação em meio de cultivo contendo 0,5% de casca de café tratada com NaOH e US e 0,3% de <i>whey protein</i> (ISOFORT [®] Vitafor) (Meio 3)	29

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Enzimas celulasas	4
3.1.1 Características	4
3.1.2. Microrganismos produtores de celulase.....	6
3.2. Aplicação das celulasas	7
3.3. Utilização de resíduos agroindustriais nos processos fermentativos para a produção de enzimas microbianas.....	9
3.3.1 Café.....	11
4. MATERIAL DE MÉTODOS	13
4.1 Microrganismo e meio de manutenção.....	13
4.2. Obtenção e conservação da casca de café conilon.....	14
4.2.1 Caracterização química e física da casca de café Conilon.....	14
4.3 Meio de crescimento do microrganismo e atividade da celulase.....	17
4.3.1 Preparo do pré-inóculo	18
4.3.2. Meios de cultivo e medidas do crescimento.....	18
4.3.3. Ensaio enzimáticos.....	19
4.4. Avaliação da concentração da casca de café Conilon tratada com NaOH e ultrassom e suplementação com <i>whey protein</i> (Vitafor®).....	20
4.5. Caracterização parcial da enzima.....	21
4.5.1. Avaliação do efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas	22
4.5.2. Avaliação do efeito da temperatura na atividade estabilidade das enzimas	22
4.5.3. Efeito dos íons metálicos na atividade das enzimas	23
4.6. Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Caracterização química e física da casca de café Conilon com e sem tratamento com NaOH e US	24
5.2. Crescimento do microrganismo e produção de celulasas em meios contendo casca de café tratada com NaOH e US	26
5.3. Efeito da concentração de casca de café Conilon tratadas com NaOH e US e suplementação do meio de cultivo com <i>whey protein</i> no crescimento do microrganismo e atividade de celulasas	27
5.4. Caracterização parcial das celulasas	30

5.4.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da Avicelase (AVCase) e Carboximetilcelulase (CMCase)	30
5.4.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de AVCase e CMCase.....	32
5.4.3. Efeito dos íons metálicos na atividade e estabilidade da AVCase e CMCase	34
6. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

ALVES, Thálita Cristyne de Oliveira. 2023. **Estudo da produção e caracterização parcial de avicelase e carboximetilcelulase de *Bacillus licheniformis* CCMA – 1674 em meio de cultivo contendo casca de café Conilon tratada com NaOH e ultrassom.** 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.

Processos biotecnológicos permitem a produção de grandes quantidades de metabólitos com alto valor agregado e de aplicação industrial, como, por exemplo, as enzimas celulolíticas. Estas enzimas podem ser produzidas por microrganismos em meios de cultivo contendo resíduos agroindustriais, os quais podem ser encontrados em abundância por todo o território brasileiro. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar as condições ótimas de cultivo e produção de celulases pela bactéria *Bacillus licheniformis* CCMA-1674, em meio contendo casca de café Conilon. As mesmas foram tratadas com solução alcalina de NaOH a 1% (m/v) e posteriormente com ultrassom por 20 min à 30 °C e 40 KHz. *Bacillus licheniformis* CCMA-1674 foi capaz de produzir avicelase e carboximetilcelulase em meio com 1,0% de casca de café Conilon tratado com NaOH e US e 0,3% de *whey protein* (ISOFORT® Vitafor), durante 120 h a 37 °C e 150 rpm. A avicelase apresentou atividade ótima em pH 5,0 e temperatura de 40 °C (2,296 U/mL), enquanto a carboximetilcelulase apresentou atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 90 °C (12,640 U/mL). Houve aumento de mais de 100% na atividade de avicelase na presença do íon Mn²⁺ em temperaturas de 50, 70 e 90 °C durante 120 min. E atividade de carboximetilcelulase 25 vezes maior quando a enzima foi incubada a 50 °C e na presença de Fe²⁺.

Palavras chave: Celulases, *Bacillus*, resíduo lignocelulósico, café conilon, tratamentos de resíduos

ABSTRACT

ALVES, Thálita Cristyne de Oliveira. 2023. **Study of the production and partial characterization of avicelase and carboxymethylcellulase from *Bacillus licheniformis* CCMA – 1674 in a culture medium containing conilon coffee husk treated with NaOH and ultrasound.** Dissertation (Master's in Food Science and Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre - ES. Advisor: Prof^a. DSc. Raquel Vieira de Carvalho. Co- Advisor: Prof^a. DSc. Jussara Moreira Coelho.

Biotechnological processes allow the production of large amounts of metabolites with high added value and industrial application, such as, for example, cellulolytic enzymes. These enzymes can be produced by microorganisms in culture media containing agro-industrial residues, which can be found in abundance throughout Brazil. In this context, the objective of this work was to study the optimal conditions for the cultivation and production of cellulases by the bacteria *Bacillus licheniformis* CCMA-1674, in medium containing conilon coffee husks. They were treated with an alkaline solution of NaOH at 1% (w/v) and subsequently with ultrasound for 20 min at 30°C and 40 KHz. *Bacillus licheniformis* CCMA-1674 was able to produce avicelase and carboxymethylcellulase in a medium with 1.0% Conilon coffee hulls treated with NaOH and US and 0.3% Whey protein (ISOFORT® Vitafor), during 120h at 37 °C and 150 rpm. Avicellase showed optimal activity at pH 5.0 and temperature of 40 °C (2.296 U/mL), while carboxymethylcellulase showed optimal activity at pH 7.0 and temperature of 90 °C (12.640 U/mL). There was an increase of more than 100% in the avicelase activity in the presence of the Mn²⁺ ion at temperatures of 50, 70 and 90 °C during 120 min. And carboxymethylcellulase activity was 25 times greater when the enzyme was incubated at 50 °C and in the presence of Fe²⁺.

Keywords: Cellulases, *Bacillus*, lignocellulosic waste, Conilon coffee, waste treatments

1. INTRODUÇÃO

Celulase é um grupo de enzimas que atuam nos materiais celulósicos, hidrolisando-os e decompondo-os, para convertê-los em uma forma mais simples e solúvel de açúcares (BINOD et al., 2012; CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Este grupo de enzimas compreendem as endo- β -1,4 glucanases (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4 glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21), responsáveis pela hidrólise das ligações da celobiose em moléculas de açúcares livres (LYND, et al., 2002).

Segundo Papadaki et al. (2020), o mercado global de enzimas foi avaliado em média, com um valor de US\$ 7,1 bilhões em 2017 e muito provavelmente deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões no ano de 2024, a uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024. A Europa foi responsável por 1/3 da produção global de enzimas em 2017 e, estima-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos. Grande parte dessas enzimas vêm sendo usadas, em larga escala, pelas indústrias de alimentos e bebidas, como as amilases, pectinases, proteases, celulases, entre outras (GRIEBELER et al., 2015; MEHTA et al., 2021; MURUGAN et al., 2020; RIGO et al., 2021; SURIYA et al., 2016).

Celulases comerciais têm sido obtidas, principalmente, de fungos filamentosos como *Trichoderma*, *Hemicola*, *Aspergillus* e *Penicillium*, porém, as celulases bacterianas vêm despertado atenção em função da sua alta diversidade na natureza, alta taxa de crescimento, facilidade na recuperação de seus produtos e habilidade de produzir enzimas que resistem a condições ambientais severas como temperaturas e pHs (DEKA et al, 2011; MAKI, LEUNG, QIN, 2009).

Bactérias do gênero *Bacillus*, em geral são saprófitas inofensivas, ou seja, que não produzem toxinas e são incluídas no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (MAHMOOD et al., 1998) ou ainda chamadas de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (ALCARAZ et al., 2010). Portanto estudos para a produção de celulases pelo gênero têm sido muito investigada e reportada como os das culturas de *Bacillus licheniformis*, como cepas KIBEG-IB2 (SILVA, MELO FINKLER, 2021), NCIM 5556 (SHAJAHAM, et al., 2017) e CGMCC 2876 (CHEN et al., 2017). As características do gênero *Bacillus*, como

desenvolvimento em ampla faixa de pH, resistência a condições ácidas, neutras e alcalinas, além de certos microrganismos do gênero possuírem características termofílicas, tornam essas espécies capazes de utilização na indústria e no meio científico. Além disso, essas bactérias possuem taxas de reação mais rápidas e são menos propensas à contaminação (SINGH; KUMAR, 1998; SINGH et al., 2004; SHABEB et al., 2010; AYGAN et al., 2011; SAJAHAN et al., 2017).

A casca de café é um resíduo industrial que apresenta altos teores de matéria orgânica e boa quantidade de açúcares fermentescíveis. Sua composição química 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). Conforme SANTOS (2018) a composição consiste aproximadamente de 32,5% de celulose, 20,8% de hemicelulose, 27,1% de Lignina. A presença de lignina impede o acesso de enzimas microbianas, por isso, pré-tratamentos da biomassa lignocelulolítica são necessários previamente à sua aplicação nos processos seguintes (EJAZ; SOHAIL, 2020).

A utilização de pré-tratamentos para a remoção da lignina de biomassas celulósicas como o uso de agentes alcalinos diluídos são comumente empregados para a deslignificação dessas biomassas, no entanto pode resultar em um aumento substancial da área superficial das fibras devido a celulose (ALVIRA, et al., 2010). Assim, há vários tratamentos que podem ser empregados na etapa de pré-tratamento desses resíduos e cada um poderá contribuir de forma diferente sobre as frações de celulose, hemicelulose e lignina. Dentre eles, destacam-se os tratamentos físicos como a aplicação do ultrassom (US), que tem como finalidade aumentar a área superficial a ser hidratada e reduzir a polimerização da celulose, não havendo remoção da lignina, apenas alterando sua estrutura e podendo solubilizar a hemicelulose. A utilização de banho ultrassônico (US) promove intensa vibração de moléculas, gerando calor e causando alterações estruturais das fibras celulósicas (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; ALVIRA et al., 2010).

Assim, o presente trabalho realizou o estudo do uso da casca de café Conilon tratada com NaOH e US em meios de cultivo, para produção de celulases pela bactéria *Bacillus licheniformis* CCMA-1674, e avaliou algumas características das enzimas produzidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a produção de celulases pela bactéria *Bacillus licheniformis* CCMA-1674, em meios de cultivo contendo casca de café Conilon tratada com NaOH e ultrassom (US).

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar o resíduo, casca de café Conilon sem tratamento e tratado com NaOH e US simultaneamente;

Avaliar a suplementação do meio com *whey protein* ISOFORT® Vitafor;

Avaliar o crescimento do microrganismo *B. licheniformis* CCMA-1674 em meios contendo, casca de café tratada com NaOH e US simultaneamente;

Avaliar a produção de celulases pelo microrganismo em meio contendo, casca de café tratada com NaOH e US;

Avaliar a atividade e estabilidade de celulases produzidas em relação ao pH, temperatura e íons metálicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enzimas celulases

Nos últimos anos, o crescente interesse industrial pela implementação de processos sustentáveis e eficientes tem aumentado significativamente. A substituição de catalisadores químicos por catalisadores bioquímicos levou a um aumento na quantidade de pesquisas e a produção de enzimas com atividades industrialmente relevantes que foram identificadas e aplicadas em processos industriais e biotecnológicos (SANTOS, 2022; EJAZ, et al., 2023).

As celulases são enzimas industriais altamente demandadas no mercado comercial global devido à sua ampla utilidade em diferentes setores industriais (EJAZ et al., 2021; REHMAN et al., 2014).

A celulase é a enzima mais comumente aplicada no tratamento de biomassa lignocelulósica (KOUAIE et al., 2019), mas também é amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, detergentes, bebidas como sucos, vinhos e cervejas, papel, tecidos (jeans), produtos farmacêuticos, química fina, biocombustíveis como etanol e biogás, no tratamento de efluentes e para fins de biorremediação (MAHATO et al., 2021; SHAH et al., 2019; GURUNG et al., 2013).

Entre as vantagens da utilização dessas enzimas, destaca-se o fato de ser um produto natural, que apresenta um alto grau de especificidade nas reações, contribuindo para a eficiência do processo, e ainda, por apresentar a atividade que pode ser regulada, atuando em baixas concentrações e sob condições brandas de pH e temperatura (BON; FERRARA; CROVO, 2008).

3.1.1 Características

As celulases desempenham um papel importante na degradação da biomassa lignocelulósica, hidrolisando as ligações 1,4- β -D-glicosídicas da celulose.

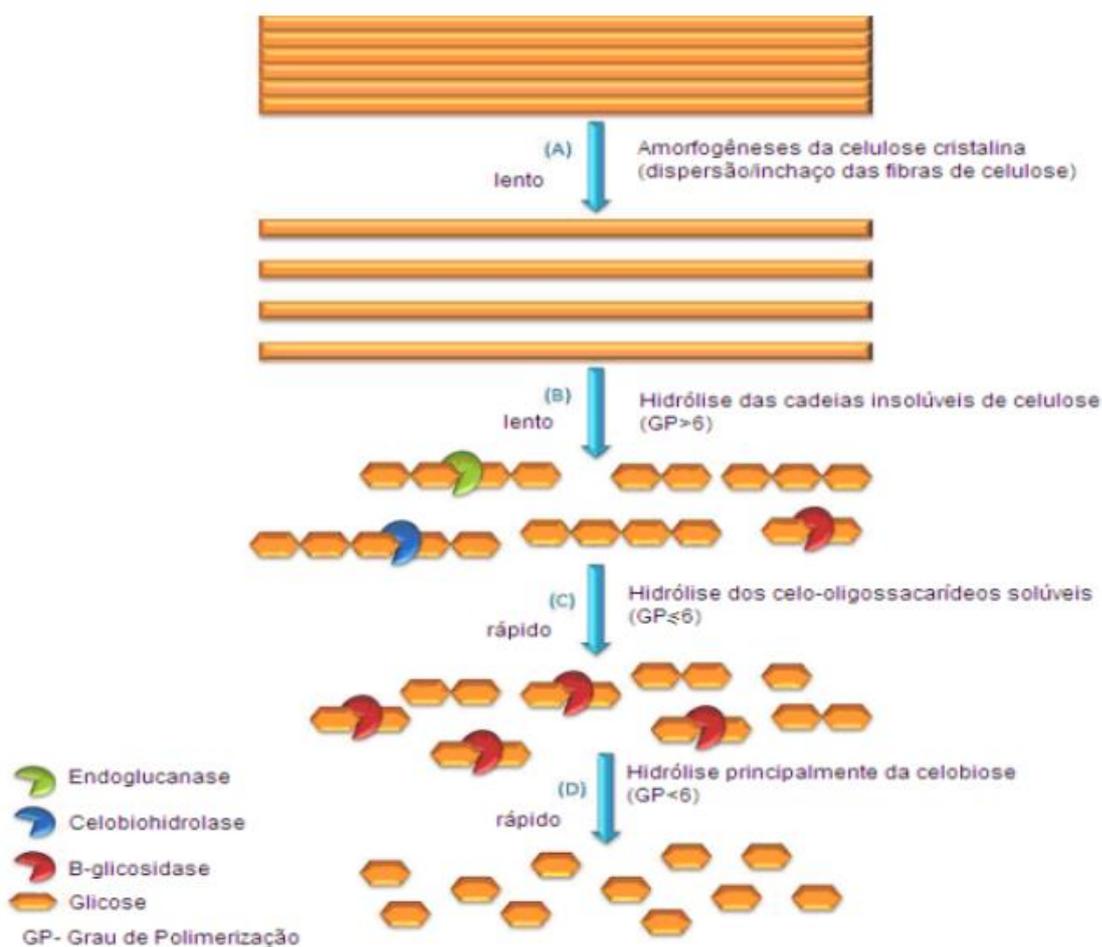
Três grupos principais de enzimas compõem esse complexo celulolítico, e sua classificação se baseia no grau de despolimerização do substrato em que atuam. Assim, as (1) endoglucanases (endo-1,4- β -glucanase ou 1,4- β -D-

glucano-4-glucanohidrolase), conhecidas como carboximetilcelulases (E.C. 3.2.1.4), são enzimas que hidrolisam aleatoriamente ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, produzindo oligômeros com vários graus de polimerização, ou seja, atuam na região interna da fibra de celulose; (2) exoglucanases (exo-1,4- β -D-glucanase) enzimas que atuam nas extremidades da fibra celulósica resultando na liberação de celobiose, como a celodextrinase (1,4- β -D-glucano-glucanohidrolase) hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas dos oligômeros nas extremidades redutora (E.C.3.2.1.176), ou celo-biohidrolase (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase) hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas dos oligômeros nas extremidades não redutoras (E.C. 3.2.1.91); (3) β -glicosidases (1,4- β -D-glicosidase), também conhecidas como celobiasas (E.C.3.2.1.21) responsáveis pela quebra das ligações da celobiose, resultando em moléculas livres de glicose (LYND, et al., 2002; ZHANG; LYND, 2004; MAEDA; BARCELOS; HASUNUMA et al., 2013; PEREIRA, 2013; JUTURU; WU, 2014; IUBMB, 2022; ZHOU et al., 2021).

As enzimas celulolíticas atuam sinergisticamente, utilizando o mesmo mecanismo químico de ação, e o processo de bioconversão da celulose em glicose ocorre em duas etapas (Figura 1).

As exoglucanases e endoglucanases são responsáveis pela primeira etapa, que leva à redução do grau de polimerização da celulose na etapa de liquefação, liberando a celobiose e a segunda etapa é realizada pela β -glicosidase que cliva a celobiose em glicose (ZHANG; LYND, 2004; MAEDA; BARCELOS; PEREIRA, 2013).

Figura 1: Ação sinérgica das celulases



Fonte: FLORENCIO, 2011

3.1.2. Microrganismos produtores de celulase

As enzimas celulolíticas podem ser secretadas por vários microrganismos, como fungos, bactérias e actinomicetos, sendo os fungos as espécies dominantes, capazes de produzir celulases (SANTOS, et al., 2022; MESA et al., 2016).

Segundo Kuhad et al. (2016) e Rathinam et al. (2017), com base em sua adaptação ambiental, os grupos de microrganismos, produtores de enzimas, podem ser ainda categorizados como aeróbios e anaeróbios, mesófilos, termófilos e extremófilos e em sistemas microbianos complexos e não complexos.

Embora muitas espécies bacterianas e fúngicas sejam bem relatadas para a produção potencial de celulase (FARIQ, 2016; MESA et al., 2016; SETHI et al.,

2016), os fungos aeróbicos, bem como as espécies bacterianas, produzem enzimas livres em formas não complexas (ACHARYA E CHAUDHARY, 2012; GUSAKOV, 2011). Portanto, para fins comerciais, os microrganismos aeróbicos são preferidos aos anaeróbicos, porque as celulases livres têm maior atividade, além de facilitar no processo de sua recuperação.

Os microrganismos são geralmente cultivados em grandes câmaras de fermentação sob condições controladas para maximizar a produção de enzimas. As enzimas se acumulam dentro das células ou segregam no meio do fermentador. Nas etapas subsequentes, várias técnicas químicas, mecânicas e térmicas são usadas para recuperar as células danificadas ou o meio contendo a enzima (VIGNESWARAN et al., 2014).

A celulase pode ser produzida por muitos microrganismos quando a fermentação ocorre em estado sólido (FES), onde os substratos lignocelulósicos, são ideais para o crescimento, principalmente de fungos filamentosos (MAEDA et al., 2013). Entre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos são proeminentes porque têm o potencial de produzir enzimas degradantes a partir de materiais vegetais, incluindo celulase (ZHENG et al., 2015).

Porém, nos últimos anos, tem havido maior interesse por bactérias produtoras de celulase, pois têm a capacidade de suportar condições adversas, como altas temperaturas e valores extremos de pH, o que tornam essas enzimas estáveis às condições geralmente utilizadas durante os processos industriais (EJAZ et al., 2023; SHAH, et al, 2021; SILVA; MELO; FINKLER, 2021; HUANG, 2004).

3.2. Aplicação das celulases

As celulases contribuem com a demanda mundial de enzimas industriais e segundo as avaliações (GRAND VIEW RESEARCH, 2022), o mercado global de enzimas foi avaliado em em US\$ 10,69 bilhões em 2020 e deve se expandir a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,5% de 2021 a 2028. Neste contexto, aproximadamente 70% se referem às enzimas proteases e carboidrases, grupo no qual se encontram, as celulases (ARBIGE et al., 2019). A elevada procura por este grupo de enzimas está associada aos vários setores em que são aplicadas, destacando-se a produção de biocombustíveis, com a

obtenção de energia limpa e renovável, processamento de alimentos e bebidas, indústrias têxteis para polimento de tecidos de algodão, indústrias de detergentes e branqueamento de polpa de papel (DADWAL; SHARMA, SATYANARAYANA, 2019; ACHARYA; CHAUDHARY, 2012).

As celulasas têm sido consideradas fundamentais há décadas, para a produção de bioetanol, utilizando a biomassa lignocelulolítica como substrato, como processo alternativo aos combustíveis fósseis, além de ser um processo limpo e sustentável (SINGHANIA, et al., 2021). Diversos estudos vêm investigando a produção de celulasas por microrganismos distintos, como termofílicos, além de otimização de meios de cultivo que possibilitem a maior produtividade dessas enzimas com características para esse seguimento (CHANDEL, et al., 2019).

Na indústria de bebidas, as enzimas celulase são utilizadas na produção de sucos porque têm a capacidade de destruir a rede de celulose e, como a rede de celulose ajuda a reter líquido nas células vegetais, a celulase pode promover a extração e maceração do suco para produzir néctar. Para a produção de vinho, essas enzimas ajudam a extrair as substâncias aromatizantes presentes na casca, e também podem liberar substâncias aromatizantes para degradar compostos que causam sabor e aroma desagradáveis (ONGARATTO, 2015).

As celulasas também são utilizadas na indústria de detergentes, onde são adicionadas à formulação dos detergentes, juntamente com outras enzimas, incluindo proteases, lipases, amilases, oxidases e peroxidases. Essas enzimas ajudam a quebrar diferentes tipos de ligações químicas presentes nas sujidades dos tecidos, ou superfícies onde são aplicadas (LADEIRA, et al., 2015).

As celulasas são conhecidas ainda por catalisar a síntese de celooligosacarídeos (COS) a partir da fração de celulose da biomassa (BARBOSA, et al., 2020). Os COS têm outras aplicações, são usados como prebióticos, adoçantes e agentes anti-higroscópicos na indústria de alimentos, além de produtos cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos agrícolas (PATEL; GOYAL, 2011). Os hidrolisados ricos em celobiose foram usados como substratos fermentativos para diferentes bactérias lácticas e foi observado que pode estimular eficientemente o crescimento de duas cepas probióticas de *Lactobacillus* (*Lactobacilli* e *Bifidobacteria*), sugerindo sua potencial utilidade

como prebióticos (KARNAOURI, et al, 2019). No entanto, ainda há informações limitadas sobre a produção em larga escala de COS (CHU et al., 2014).

Na indústria de papel, a celulose é utilizada no processo de melhoria da resistência mecânica da polpa e aumento da capacidade de branqueamento da polpa, reduzindo assim o referido desperdício. Além disso, neste campo industrial, o uso de celulase e outras enzimas (como a xilanase) ajuda a tornar o papel e o papelão mais facilmente degradáveis (ACHARYA E CHAUDHARY, 2012).

3.3. Utilização de resíduos agroindustriais nos processos fermentativos para a produção de enzimas microbianas

O alto custo de produção de celulase, assim como outras enzimas microbianas, é o principal obstáculo à sua aplicação industrial. Os fatores que afetam a produção econômica de celulase incluem: o meio ou substrato usado, a complexidade da estrutura da celulose, a pequena quantidade de celulase produzida pelos microrganismos que decompõem a celulose, devido à inibição do catabolismo, o estágio de purificação, entre outros (SRIDEVI, et al., 2009).

A seleção de componentes do meio de cultivo e microrganismos é crítica para o sucesso do processo de fermentação e sua viabilidade econômica. No entanto, um meio que permite o desenvolvimento ideal da cultura nem sempre conduz à formação de enzimas. É necessário avaliar o rendimento ideal e os parâmetros que afetam a síntese de enzimas, porque as condições ideais para diferentes microrganismos e diferentes enzimas irão variar (SANTOS et al., 2005).

Estima-se que cerca de 30% a 40% do custo envolvido na produção da enzima esteja relacionado ao meio utilizado para o crescimento dos microrganismos. No entanto, na maioria dos casos, com a adoção de métodos simples, como o uso de um meio específico e otimizado, o rendimento das enzimas pode ser significativamente aumentado e os custos de produção podem ser reduzidos (KUMAR; TAKAGI, 1999; JOO; CHANG, 2005).

De um modo geral, os resíduos industriais agrícolas incluem os subprodutos produzidos durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou de origem animal ou obtidos a partir de atividades agrícolas.

Normalmente, como esses resíduos geralmente não são aplicados diretamente, há pouco ou nenhum valor econômico atribuível a eles, como palha, caules, folhas, cascas, vegetais e grãos (arroz, trigo, milho, sorgo, batata e cevada) e muitos mais. No entanto, açúcar, fibras, proteínas e minerais são compostos comuns na composição desses resíduos, o que os torna uma fonte alternativa de carboidratos e nitrogênio, substituindo as fontes sintéticas desses nutrientes utilizadas nos processos biológicos (PANESAR et al., 2016).

De modo que a sua estrutura abundante em açúcares fermentáveis e nutrientes vindo de resíduos industriais agrícolas, estes microrganismos têm a habilidade de utilizar esses substratos e convertê-los em diversos produtos industrialmente importantes, como as enzimas (RAFATULLAH et al. 2010; MOREIRA et al., 2012; PANDA et al., 2016). Nesse sentido, novas rotas técnicas têm sido desenvolvidas para utilizar biomassa de resíduos agrícolas industriais em substituição a substratos convencionais e não renováveis utilizados em processos biológicos (TAMANINI e HAULY, 2004).

A matéria-prima derivada da lignocelulose contém de 20% a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida em glicose por ação enzimática. Na próxima etapa, esse monossacarídeo pode ser utilizado como matéria-prima para a obtenção de diversos produtos, desde biocombustíveis a polímeros, sendo o etanol uma das moléculas mais interessantes recentemente (CASTRO e PERREIRA JR., 2010).

Embora haja uma grande diversidade metabólica em vários microrganismos existentes, esses resíduos nem sempre são fáceis de usar. Essas matérias-primas são altamente resistentes em grande parte e não são tão sensíveis à ação das enzimas. Portanto, geralmente é necessário pré-tratar esses resíduos, incluindo propriedades físicas (trituração, térmica), químicas (tratamento alcalino) ou enzimáticas. Esses tratamentos podem ser necessários para aumentar a utilização desses nutrientes, que serão aproveitados pelos microrganismos presentes nos resíduos a serem utilizados (DE ARAÚJO et al., 2019).

3.3.1 Café

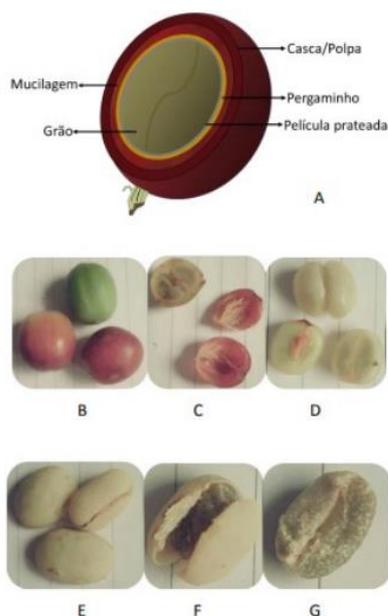
Segundo dados da CONAB (2022) a produção cafeeira do Brasil encerra a sua safra de 2022 com um volume de 50,92 milhões de sacas de café beneficiado, sendo assim 6,7% acima da safra 2021.

No Brasil, as duas espécies de café cultivadas são: café arábica (*Coffea arabica* L.) e café robusta (*Coffea canéfora*). Do primeiro, são feitas misturas de alta qualidade e o segundo, também conhecido como conilon, é utilizado na indústria de café solúvel (CECAFE, 2019).

O café (*Coffea sp.*) é originário do continente africano e no Brasil tem-se os cafés arábica e conilon as espécies mais cultivadas. São mais de 124 espécies listadas tornando-os também as mais consumidas em todo o mundo (FERRÃO et al., 2022).

Os frutos do café são formados pelo exocarpo (pele/casca), mesocarpo (polpa/mucilagem), endocarpo (pergaminho) e endosperma (grão), após o beneficiamento do grão cru pode ser visualizada uma película prateada (perisperma), como exposto na Figura 2 (DURÁN et al., 2016).

Figura 2: (A) Fruto de café com partes. Café em: (B) diferentes estágios de maturação, (C) corte transversal do fruto com a casca removida, (D) grão com mucilagem, (E, F) grãos após secagem com o pergaminho e (G) grão cru com a película prateada



Fonte: (Durán et al., 2016)

A casca de café é um dos resíduos que apresentam altos teores de matéria orgânica e uma boa quantidade de açúcares fermentáveis. A composição química da casca de café irá variar de acordo com alguns fatores, entre eles está a variedade de café, o tipo de solo, o plantio, as condições climáticas, o tipo de processamento, entre alguns outros (SOCOOL, 2002; ADAMS; GHALY, 2007; CLEVES, 2009; PANDEY, et al., 2017).

A casca de café se torna um resíduo de grande potencial para ser utilizado como subproduto na obtenção de produtos com valor agregado tanto na indústria farmacêutica, como de cosméticos, de alimentos ou na agricultura (DIAS, 2016).

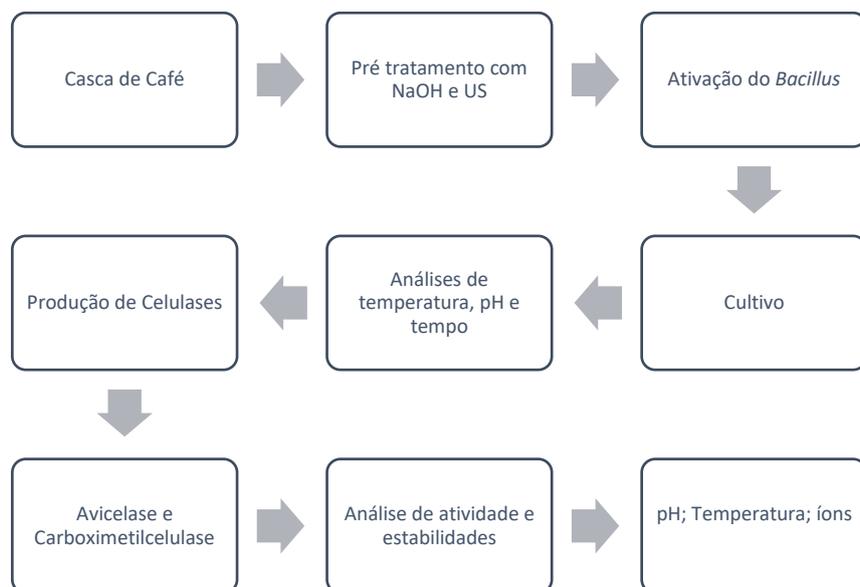
4. MATERIAL DE MÉTODOS

4.1 Microrganismo e meio de manutenção

Para o estudo foi utilizada uma cultura bacteriana de *Bacillus licheniformis* CCMA-1674, isolada por Pereira (2018) durante a secagem via natural de frutos de café Conilon do sul do Estado do Espírito Santo, identificada pelo Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. A cultura encontra-se armazenada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CCAE/UFES, Alegre, ES, em ultrafreezer a - 80 °C.

Para o preparo do inóculo, o microrganismo foi ativado por meio de estrias em placas de Petri contendo meio TSY, composto por (g.L⁻¹ de água destilada): triptona, 20; NaCl, 10; extrato de levedura, 10 e ágar, 20, incubado em BOD a 37 °C por 24 horas. Após este tempo, as placas foram levadas para refrigeração em BOD a 4 °C, até os experimentos iniciarem, e então novas ativações do microrganismo.

Figura 3 – Fluxograma da condução dos experimentos



4.2. Obtenção e conservação da casca de café conilon

A casca de café conilon variedade Vitória, 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, triturado em moinho de facas da marca SOLAB tipo Willy e peneiradas para obtenção de partículas com 0,42 mm (40 *mesh*) de espessura. As amostras foram esterilizadas em autoclave (121 °C) por 1 hora e 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 armazenadas sob refrigeração (6 – 10 °C) em embalagens hermeticamente fechadas, até realização das análises e preparos necessários, seguindo a metodologia proposta por Shajahan et al. (2017).

O tratamento simultâneo com NaOH e US utilizado, foi realizado utilizando 30 g de amostra de casca seca em 1% (m/v) de NaOH relação 1:10 (m/v) (casca/solvente) em banho ultrassônico de 40 KHz (lavadora ultrassônica Soniclean 2PS, Sanders) por 20 minutos e temperatura de 30 °C. Em seguida, os sólidos foram lavados com 3 volumes de água, filtrados a vácuo, em funil de Buchner, utilizando papel de filtro qualitativo, secos em estufa a 105 °C até peso constante e armazenado a 4 °C para posterior utilização nos meios de cultivo.

4.2.1 Caracterização química e física da casca de café Conilon

A caracterização da casca de café moída foi realizada em amostras sem tratamento e submetidas aos tratamentos com NaOH e US. Foram realizadas as análises de umidade, teor de cinzas, lipídios totais e determinação de proteínas, as quais foram realizadas pelo laboratório Agrolab Análise e controle de qualidade, segundo Métodos Físico-Químicos do Instituto Adolfo Luz (IAL, 2008). As análises de celulose, hemicelulose, lignina foram realizadas segundo as normas do Laboratório de Ciências Florestais localizado no departamento de Ciências Florestais de da Madeira/ CCAE/ UFES no município de Jerônimo Monteiro.

4.2.1.1. Umidade

Pesou-se 10 g de cada amostra (com e sem tratamento) em triplicata em cápsulas de porcelana, previamente limpas secas e pesadas. Aqueceu-se a 105 °C em estufa, durante 3 horas. Resfriou-se em dessecador até que chegasse à temperatura ambiente. Logo após, foram pesados e repetiu-se o aquecimento e resfriamento até atingirem peso constante (IAL, 2008).

4.2.1.2 Teor de cinzas (resíduo mineral fixo)

Pesou-se 10 g da amostra em uma cápsula, previamente aquecida em mufla a 550 °C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Foi seca em chapa elétrica, carbonizada em temperatura baixa e incinerada em mufla a 550 °C, até eliminação completa do carvão. Logo após foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Foi repetida as operações de aquecimento e resfriamento até que fosse obtido o peso constante (IAL, 2008).

4.2.1.3 Lipídios Totais

Pesou-se 2 a 5 g da amostra em cartucho de Soxhlet e amarrou com fio de lã previamente desengordurado. Transferiu-se o cartucho amarrado para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acoplou-se o extrator ao balão de fundo chato previamente limpo, seco e pesado, a 105 °C.

Adicionou éter em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Manteve-se, sob aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por quatro a cinco gotas por segundo. Retirou-se o cartucho, destilou o éter e transferiu o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105 °C, manteve por cerca de uma hora.

Resfriou em um dessecador até a temperatura ambiente. Pesou e repetiu as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriou até peso constante (no máximo 2 h) (IAL, 2008).

4.2.1.4 Determinação de proteínas

Pesou-se 1 g das amostras em papel de seda e foi transferido para o balão de Kjeldahl (papel + amostra). Adicionou 25 mL de ácido sulfúrico e 6 g da mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6).

Levou-se ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido. Aqueceu por mais uma hora e deixou esfriar. Conectou imediatamente o balão ao conjunto de destilação e mergulhou a extremidade afilada do refrigerante em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, contido em frasco erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila.

Adicionou ao frasco que continha a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, a solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. Aqueceu até ebulição e destilou até obter cerca de 250 a 300 mL do destilado. Titulou o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila (IAL, 2008).

4.2.1.5. Determinação de lignina

As amostras (300 mg) foram transferidas quantitativamente para um tubo de ensaio de cerca de 60 mm de comprimento e 15 mm de diâmetro. Em seguida, foi adicionado ácido sulfúrico 72 % (3 mL; resfriado a 10-15 °C), e o conjunto foi mantido em banho-maria a $30 \pm 0,2$ °C por 1 hora, mantendo-se frequentemente a agitação com bastão de vidro.

Após esse tempo, transferiu-se quantitativamente a mistura para um frasco de vidro e esse foi fechado hermeticamente, com tampa de borracha e lacre de alumínio. Colocou-se o frasco numa autoclave calibrada para 118 °C e 27 psi, mantida a temperatura máxima por 1 hora.

A mistura foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado, previamente preparado com uma camada de óxido de alumínio (2-3 mm) e pesado. A lignina retida no cadinho foi lavada com água destilada quente até a completa remoção do ácido. O cadinho foi acondicionado em estufa a 105 ± 3 °C para a remoção da água residual até peso constante, sendo em seguida determinado o peso da lignina e, finalmente, o teor de lignina do material.

4.2.1.6. Determinação de celulose

Para determinação da celulose foi inicialmente pesado 3 g da matéria prima em um erlenmeyer (500 mL) onde foram adicionados 120 mL de água destilada. O erlenmeyer permaneceu em banho-maria, a 70 °C e adicionou-se

1,5 mL de ácido acético e 3 g de hipoclorito de sódio. Após 1 hora, adicionou-se mais 1,5 mL de ácido acético e 3 g de hipoclorito de sódio.

Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Logo após, o erlenmeyer foi levado ao resfriamento e em seguida pesado em um funil de placa porosa número 1. Ao ser resfriada, a amostra foi filtrada a vácuo, lavada com água destilada gelada e colocada na estufa para secar por aproximadamente 6 horas.

Após esse tempo, por diferença entre a massa do funil e a massa do funil mais a amostra, o resultado obtido foi da holocelulose (celulose + hemicelulose) para posterior extração alcalina da celulose por hidróxido de sódio 4% por mais 1 hora. O procedimento foi realizado segundo metodologia com modificações de BROWNING, (1963).

Da holocelulose seca obtida, foi pesada cerca de 1 g e colocada em um almofariz, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5%, e então, macerou-se o material até apresentar aspecto homogêneo e em seguida foi lavado com 4 mL de água destilada e transferido quantitativamente para um funil para filtragem a vácuo.

O precipitado recolhido no funil foi lavado até pH próximo ao da água utilizada e seco em estufa em temperatura acima de 100 °C e depois pesado para verificação final da quantidade de holocelulose presente (EMBRAPA, 2010).

4.3 Meio de crescimento do microrganismo e atividade da celulase

Foi preparado o seguinte meio de cultivo (Tabela 1) para avaliar o crescimento do microrganismo e a produção de celulases.

O pH do meio de cultivo foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$ com NaOH (1,0 M), e o mesmo foi distribuído em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do respectivo meio, e em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Tabela 1: Meios de crescimento

Composição	Meio 1 (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29
K ₂ HPO ₄	0,87
KH ₂ PO ₄	1,36
Extrato de Levedura	1,00
NaCl	1,00
KCl	0,29
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
FeSO ₄	0,01
Solução traços metais*	1,00 mL
Casca de café tratada com NaOH e US	5,00

Solução traços de metais (g.L⁻¹): ZnO – $2,5 \times 10^{-3}$; FeCl₃.6H₂O – $2,7 \times 10^{-2}$; MnCl₂.4H₂O – $1,0 \times 10^{-2}$; CuCl₂.2H₂O – $8,5 \times 10^{-4}$; CoCl₂.6H₂O – $2,4 \times 10^{-3}$; NiCl₃.6H₂O – $2,5 \times 10^{-4}$; H₃BO₃ – $3,0 \times 10^{-4}$; Na₂MoO₄ – $1,0 \times 10^{-3}$.

4.3.1 Preparo do pré-inóculo

O meio para o pré-inóculo foi preparado em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de crescimento, conforme apresentado na Tabela 1, seguido de esterilização a 121 °C por 15 min em autoclave. Após este período, 10 mL desse meio foi transferido para as placas de Petri contendo o microrganismo ativo (em meio TSY em estufa a 37 °C, conforme descrito no item 4.1) com a finalidade de ressuspender as células que foram transferidas com auxílio de uma pipeta estéril para o cultivo do pré-inóculo. Os frascos foram então incubados por 18 horas em *shaker* rotatório, marca CIENLAB (modelo CE – 720) a 37 °C sob agitação de 150 rpm, e posteriormente utilizadas para inocular os meios de cultivo.

4.3.2. Meios de cultivo e medidas do crescimento

Os meios de cultivo preparados conforme a Tabela 1, foram inoculados com 10% do pré-inóculo e incubados a 37 °C em *shaker* rotatório a 150 rpm. Em

intervalos de tempo de 0, 72, 120, 144 e 168 horas, foram retiradas amostras para determinação do crescimento do microrganismo e medida da atividade de celulases.

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio, medindo-se a densidade ótica (D.O.) a 600 nm com utilização de um espectrofotômetro (THERMO FISHER SCIENTIFIC, modelo: EVO300 PC, Estados Unidos). Foi medido o pH do meio, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers em duplicata sendo realizadas três medidas de cada frasco.

4.3.3. Ensaio enzimáticos

Nos tempos determinados (0, 72, 120, 144 e 168 horas) as amostras dos meios de cultivo foram centrifugadas (centrífuga HERMLEZ 382K, Wehingen, Alemanha), a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células que foi então utilizado para a medida da atividade enzimática, baseado nos trabalhos de Janssen et al., (1994), com modificações.

4.3.3.1. Atividade enzimática da avicelase (EC 3.2.1.74 ou exo β -1,4 glicanase)

A atividade da avicelase foi determinada por meio de uma mistura contendo 0,5 mL do extrato bruto enzimático e 0,5 mL de uma solução de celulose microcristalina (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 pela 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 e após esse período foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos e completada o volume até 7 mL com água destilada (GHOSE, 1987). A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959). O mesmo procedimento foi realizado com o controle, diferindo apenas na ordem do reagente de Miller (DNS) que foi adicionado juntamente com a solução de celulose microcristalina e após o tempo de 10 min, adicionado o sobrenadante livre de células. Uma unidade de avicelase foi definida como a quantidade de

enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto por mL da enzima.

4.2.3.2 Atividade enzimática da carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4 endoglicanase ou β -1,4-endoglicanase

Para medir a atividade de carboximetilcelulase foi utilizada uma mistura de 1,0 mL do extrato bruto enzimático (sobrenadante livre de células) e 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose 1,0% (m/v) em tampão de fosfato de sódio (0,05 M) e pH 7,0. Em seguida essa mistura foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 60 °C (GHOSE, 1987). Após esse período de tempo, 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado à mistura para interromper a reação. Em seguida, a mistura foi colocada em água fervente por 10 minutos e após este tempo foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos e completada o volume até 7 mL com água destilada, após este procedimento foi realizada a medida dos açúcares redutores (MILLER, 1959) utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm para a medida da absorvância.

O controle foi realizado com modificação. O reagente de Miller (DNS) foi adicionado juntamente com a solução de carboximetilcelulose, e após o tempo de incubação, adicionado o extrato bruto (sobrenadante). Os demais passos seguiram a análise conforme descrita anteriormente. Uma unidade de carboximetilcelulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto.

4.3.3.3 Curva de açúcares redutores

Para a construção da curva de calibração de açúcares redutores, foi utilizada solução de glicose em concentrações variando de (0 a 90 $\mu\text{mol. mL}^{-1}$) seguindo a metodologia de Miller (1959).

4.4. Avaliação da concentração da casca de café Conilon tratada com NaOH e ultrassom e suplementação com *whey protein* (Vitafor®)

No intuito de aumentar a produção das celulases pelo microrganismo, foram preparados meios de cultivo contendo diferentes concentrações da casca de café tratada e a suplementação com 3 g.L^{-1} de *whey protein* ISOFORT®

Vitafor, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Composição dos meios de cultivo contendo casca de café Conilon e *whey protein*

Composição	Meio 1 (g/L ⁻¹)	Meio 2 (g/L ⁻¹)	Meio 3 (g/L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29 g	0,29 g	0,29 g
K ₂ HPO ₄	0,87 g	0,87 g	0,87 g
KH ₂ PO ₄	1,36 g	1,36 g	1,36 g
Extrato de Levedura	1,00 g	1,00 g	1,00 g
NaCl	1,00 g	1,00 g	1,00 g
KCl	0,29 g	0,29 g	0,29 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g	0,20 g	0,20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g	1,00 g	1,00 g
FeSO ₄	0,01 g	0,01 g	0,01 g
Solução traços metais*	1,00 mL	1,00 mL	1,00 mL
Casca de café tratada	5,00 g	10,00 g	5,00 g
<i>Whey protein</i>	-	-	3,00 g

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

O pH dos meios de cultivo foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$ com NaOH (1,0 M) e os mesmos foram distribuídos (50 mL) em frascos erlenmeyers de 250 mL, e em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Foram preparados os pré-inóculos dos respectivos meios, e as avaliações, seguiram aos procedimentos descritos no item 4.3.

4.5. Caracterização parcial da enzima

Para a caracterização parcial da enzima, foi utilizado o meio de cultivo contendo casca de café tratada com NaOH e US e suplementado com *whey protein*. O meio foi então preparado, inoculando o microrganismo e incubando a

37 °C, a 150 rpm durante o período de 120 h conforme os resultados dos experimentos anteriores. Após este tempo, foram realizadas as medidas de densidade ótica para avaliar o crescimento do microrganismo, pH e atividade de celulasas conforme os itens 4.3.3., 4.3.3.1. e 4.3.3.2.

4.5.1. Avaliação do efeito do pH na atividade e estabilidade das enzimas

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado na faixa de 5,0 a 9,5 com intervalo de 0,5 unidades. O pH ótimo das enzimas foi determinado preparando-se cada substrato (avicel e carboximetilcelulose) nas soluções tampão com diferentes valores de pH e incubando os mesmos em banho-maria a 60 °C, de acordo com as metodologias descritas anteriormente 4.3.3.1 e 4.3.3.2. Foram utilizadas as soluções tampão de diferentes valores de pH (citrato de sódio pH 5,0-5,5; fosfato de sódio pH 6,0-7,0; tris/HCl pH 7,5-8,5 e glicina-NaOH pH 9,0-9,5), todos na concentração final de 50 mM.

A estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato bruto enzimático, nos tampões anteriormente descritos, por 3 horas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após este tempo, a atividade das enzimas foi determinada, utilizando o tampão no qual foi encontrado o pH ótimo. A atividade relativa das enzimas foi determinada conforme descrito nos itens 4.3.3., 4.3.3.2., 4.3.3.2.

4.5.2. Avaliação do efeito da temperatura na atividade estabilidade das enzimas

A temperatura ótima das enzimas foi determinada incubando o extrato enzimático no pH ótimo (encontrado no item 4.5.1), variando de 30 a 100 °C em intervalos de 10 °C. A atividade da enzima foi determinada conforme os itens 4.3.2., 4.3.3.1. e 4.3.3.2.

A estabilidade térmica das enzimas foi avaliada incubando-se o extrato bruto enzimático em temperaturas variando de 40 a 90 °C, com intervalos de 10 °C por 2 horas. A cada 30 minutos de intervalo foi dosada a atividade relativa das enzimas na temperatura ótima determinada anteriormente.

A termoestabilidade das enzimas foi medida a 90 °C, durante 1 hora a

cada 10 minutos conforme os itens 4.2.2., 4.2.3.1. e 4.2.3.2.

4.5.3. Efeito dos íons metálicos na atividade das enzimas

Para avaliar o efeito dos íons metálicos na atividade das enzimas, incubou-se o extrato bruto enzimático com os íons correspondentes e as atividades foram medidas nos pHs e temperaturas ótimos encontrados nos itens 4.5.1. e 4.5.2. Foram utilizados íons cloretos: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Ba^{2+} e sulfatos: Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} a uma concentração de 5 mM por 2 horas de incubação. O controle foi realizado, incubando-se o extrato bruto enzimático na ausência de íons, e sua atividade que foi considerada como 100% de atividade relativa e foi determinada nas condições conforme descritas nos itens 4.3.3., 4.3.3.1. e 4.3.3.2.

4.6. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Em cada repetição, foram realizadas em triplicatas das medidas de cada frasco cultivado. Os resultados foram avaliados pela análise média, desvio padrão e construção de gráficos utilizando Microsoft Excel® 2016.

$$\text{Equação 1: } M = \frac{\sum_{i=1}^n t x_i}{n}$$

$$\text{Equação 2: } D_p = \frac{\sum_{i=1}^n t (x_i - M)^2}{n-1}$$

M= média;

Xi= valor individual;

n= número de amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química e física da casca de café Conilon com e sem tratamento com NaOH e US

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a caracterização química e física das amostras de casca de café Conilon com tratamento (CT), utilizando NaOH e US e sem tratamento (ST).

Tabela 3: Composição centesimal das amostras de casca de café com tratamento com NaOH e sem tratamento

Análise	ST (g/100 g)	CT (g/100 g)	LQ
Proteína	7,79	2,35	-
Lipídios Totais	0,84	1,21	0,50
Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)	7,61	45,99	0,50
Umidade	7,90	< 0,50	0,50

LQ: Limite de Quantificação; ST: Sem Tratamento; CT: Com Tratamento

Observou-se uma perda significativa de proteínas para a amostra que passou pelo tratamento com NaOH e US e um aumento no teor de lipídios e cinzas. No entanto, houve uma diminuição no valor de umidade.

Analisando a composição química da casca de café com tratamento de US, Brand et al. (2000) obtiveram os seguintes percentuais mássicos: 11,98% de umidade, 1,5% de lipídeos, 6,03% de cinzas, 11,7% de proteína. Em outro estudo, segundo Soccol (2002), a casca de café em base seca, é composta pelos percentuais de 9,2% de proteínas, 2% de lipídeos.

A casca sem tratamento analisada no presente estudo passou por um processo de secagem o que levou a diminuição de lipídios totais, proteínas e umidade em relação aos autores citados anteriormente.

Na Tabela 4 a aplicação do tratamento aumentou a quantidade de extrativos totais em 7,4% e celulose em 12,7%, com valores pouco variáveis apenas para a hemicelulose com 0,54% e lignina com 9%.

Tabela 4: Análises de extrativos totais, celulose, hemicelulose e lignina nas amostras de casca de café tratadas com NaOH e US (CT) e sem tratamento (ST)

COMPONENTE	Teor (%)	
	ST	CT
Extrativos Totais	35,00	42,46
Celulose	17,31	29,03
Hemicelulose	13,54	13,10
Lignina	23,47	14,46

Observa-se um aumento na quantidade de celulose o que pode ser explicado pelo fato de o pré-tratamento alterar ou remover os componentes estruturais existentes na biomassa vegetal e isso levar a um aumento na sua área de superfície, tornando acessível para a hidrólise enzimática, aumentando desta forma o rendimento de açúcares fermentáveis presentes na celulose (MOSIER et al., 2005).

De acordo com o trabalho de Freitas (2016), foram obtidos valores de 24,53%, 19,86% e 13,68% referentes a composição da casca de café tratada com NaOH, considerando as frações constituídas por celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Canilha et al. (2011), relataram cerca de 45% de celulose, 25,8% de hemicelulose e 19,1% de lignina em bagaço de cana de açúcar tratado com água e etanol. Da mesma forma, Gouveia et al. (2009), obtiveram valores de 42,8% de celulose; 25,8% de hemicelulose e 22,1% de lignina para o bagaço de cana de açúcar. O aumento de teor de celulose se torna favorável, pois a partir disso ocorre uma liberação maior de açúcares no meio de cultivo favorecendo assim a ação das enzimas.

Perrone (2015) verificou em seu trabalho que ao utilizar ultrassom como pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar, aumentou os rendimentos em açúcares durante a hidrólise enzimática e diminuindo a quantidade de compostos inibidores, como a hemicelulose. Soares (2020) constatou em sua pesquisa que a utilização do ultrassom como pré-tratamento é um método considerado positivo, de modo que apresentou bons resultados em relação à melhoria de desempenho de enzimas comerciais quando comparado com métodos convencionais.

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).

5.2. Crescimento do microrganismo e produção de celulases em meios contendo casca de café tratada com NaOH e US

Após experimentos realizados, observou-se que as enzimas avicelase (AVCase) e carboximetilcelulase (CMCase) foram secretadas a partir de 72 horas de cultivo utilizando fontes de carbono. Assim, os experimentos foram conduzidos durante 168 h, e avaliados após 72 horas de fermentação. O meio de cultivo continha 0,5% de casca de café Conilon tratada com NaOH e US (conforme item 4.3.2) e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Avaliação do crescimento, pH e atividade de celulases secretadas pelo microrganismo *Bacillus licheniformis* CCMA 1674 em meio contendo casca de café tratada com NaOH 1% e Ultrassom.

Tempo (h)	D.O. (600nm)	pH	Atividade de Avicelase (U/mL)	Atividade de Carboximetilcelulase (U/mL)
0	0,270 ± 0,170	7,850 ± 0,022	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	0,929 ± 0,054	7,620 ± 0,045	9,307 ± 1,318	2,707 ± 0,085
120	1,035 ± 0,105	7,830 ± 0,028	6,307 ± 2,087	2,907 ± 0,170
144	0,963 ± 0,056	8,370 ± 0,095	4,773 ± 1,965	2,573 ± 0,245
168	1,021 ± 0,079	8,405 ± 0,030	7,040 ± 1,413	2,573 ± 0,389

Os resultados encontrados mostraram que o microrganismo foi capaz de crescer em meio contendo 0,5% de casca de café tratada com NaOH e US e secretar celulases (AVCase e CMCase) durante as 168 h de cultivo, com uma produção superior de AVCase em comparação com a CMCase. Observa-se que os valores de pH do meio ficaram acima de 7,5 durante toda a produção das

enzimas, onde a maior produção de avicelase encontrada nos experimentos, no tempo de 72 horas, alcançou um valor máximo de 9,307 U/mL e de 2,907 U/mL para CMCase em 120 horas. Isso indica que os métodos de pré-tratamento aumentam a disponibilidade da celulase e como consequência, melhoram a atividade das enzimas.

Fernandes (2016), ao utilizar *Bacillus* sp. SMIA-2 em meios de cultivo contendo resíduos agroindustriais tratados com hidróxido de potássio, como farinha de casca de maracujá, bagaço de cana e água de maceração de milho, encontrou um valor máximo de produção de 3,931 U/mL para avicelase e de 1,032 U/mL para carboximetilcelulase.

5.3. Efeito da concentração de casca de café Conilon tratadas com NaOH e US e suplementação do meio de cultivo com *whey protein* no crescimento do microrganismo e atividade de celulases

Nas tabelas de 6 a 8, a seguir, mostram os resultados encontrados para o crescimento do microrganismo, pH e atividades enzimáticas das celulases, durante as fermentações em diferentes meios de cultivos.

Observou-se em todos os meios testados uma tendência ao aumento de pH durante todos os experimentos e um valor constante de densidade ótica, indicando que o microrganismo estaria na sua fase estacionária a partir de 72 horas.

Tabela 6: Resultados obtidos para o crescimento celular (D.O), pH e atividade das enzimas durante 168 h de cultivo a 37 °C e 150 rpm de agitação em meio de cultivo contendo 0,5% de casca de café tratada com NaOH e US (Meio 1).

Tempo (h)	DO	pH	AVCase (U/mL)	CMCase (U/mL)
0	0,205 ± 0,031	7,005 ± 0,025	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	0,910 ± 0,025	7,830 ± 0,335	3,707 ± 0,743	2,373 ± 0,817
120	0,831 ± 0,09	8,425 ± 0,048	4,840 ± 3,312	9,107 ± 0,225
144	1,002 ± 0,016	8,275 ± 0,301	6,031 ± 1,494	0,000 ± 0,696
168	0,999 ± 0,028	8,390 ± 0,086	5,507 ± 1,111	2,440 ± 0,298

Verificou-se no meio 1, Tabela 6, que ao utilizar 0,5% de casca de café tratada com NaOH e US, um crescimento maior no tempo de 144 horas e com pH de 8,275, indicando assim que compostos de nitrogênio orgânico presentes são assimilados, tornando assim o pH do meio mais alcalino. Ao mesmo tempo que esses compostos são assimilados pode-se observar uma maior produção de avicelase no meio, atingindo 5,507 U/mL no tempo de 168 horas e nenhuma produção para carboximetilcelulase no tempo de 144 horas. Entretanto, verifica-se sua maior produção em 120 horas, atingindo valores de 9,107 U/mL.

Tabela 7: Resultados obtidos para o crescimento celular (D.O), pH e atividade das enzimas durante 168 h de cultivo a 37 °C e 150 rpm de agitação em meio de cultivo contendo 1,0% de casca de café tratada com NaOH e US (Meio 2)

Tempo (h)	DO	pH	AVCase (U/mL)	CMCase (U/mL)
0	0,074 ± 0,079	7,01 ± 0,024	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	1,516 ± 0,085	7,620 ± 0,158	9,240 ± 1,446	3,707 ± 0,428
120	1,582 ± 0,032	8,405 ± 0,137	8,907 ± 0,895	8,907 ± 0,895
144	1,504 ± 0,059	8,065 ± 0,217	3,240 ± 1,521	2,907 ± 0,696
168	1,714 ± 0,046	8,505 ± 0,066	0,000 ± 0,000	2,640 ± 0,808

Quando a concentração do resíduo foi aumentada em 50% (Tabela 7), (concentração de 1% de casca de café tratada com NaOH e US) verifica-se que o microrganismo permanece por mais tempo na fase estacionária pois tem mais fonte de carbono disponível. A maior produção de avicelase foi verificada no tempo de 72 horas com 14,640 U/mL, onde ocorreu um aumento gradativo do pH mostrando assim sua influência na produção da enzima. Já a carboximetilcelulase apresentou maior produção em 120 horas com um pH de 7,740.

Pode-se perceber que a suplementação do meio 3 com o *whey protein*, favoreceu o crescimento do microrganismo, mostrando maiores valores de D.O. durante os tempos de fermentação (Tabela 8). Observou-se que a atividade da avicelase foi maior que nos meios anteriores, atingindo o maior valor de 14,640 U/mL, ao ser utilizado 0,5% da casca de café e 0,3% de *whey protein*. Para a

produção de carboximetilcelulase também se observou um aumento, atingindo valor de 12,640 U/mL, em 120 h de cultivo e faixas de pH acima de 7,5.

Tabela 8: Resultados obtidos para o crescimento celular (D.O), pH e atividade das enzimas durante 168 h de cultivo a 37 °C e 150 rpm de agitação em meio de cultivo contendo 0,5% de casca de café tratada com NaOH e US e 0,3% de *whey protein* (Meio 3)

Tempo (h)	DO	pH	AVCase (U/mL)	CMCase (U/mL)
0	0,102 ± 0,016	7,065 ± 0,045	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
72	1,854 ± 0,015	7,620 ± 0,045	14,640 ± 2,161	2,573 ± 0,345
120	2,296 ± 0,603	7,740 ± 0,400	8,840 ± 0,049	12,640 ± 2,340
144	2,210 ± 0,020	8,160 ± 0,378	6,840 ± 1,979	5,907 ± 0,419
168	1,687 ± 0,659	8,265 ± 0,924	0,040 ± 4,531	2,640 ± 0,177

Freitas (2020) observou em seu trabalho, maior atividade de celulases em 144 horas de fermentação (12,93 U/mL) em meio contendo resíduo de casca de café Conilon, tratada com NaOH.

A composição do meio de cultivo pode influenciar na produção das enzimas. Segundo Abdel-Fattah (2007), as concentrações maiores existentes de avicel, extrato de levedura e o sulfato de amônio foram os fatores que mais influenciaram na produção da enzima avicelase, com dados que corroboram com o presente estudo que apresentou maior atividade durante o tempo de 72 h em meio contendo 0,5% de resíduo e 0,3% de *whey protein*.

Oliveira et al., (2014) encontraram valor de atividade máxima da avicelase (1,5 U/mL) no tempo de 120 horas. Shajahan et al., (2017), encontraram valores máximos de atividade de celulases de 42,99 UI/mL após 72 horas de incubação em condições otimizadas de processo.

5.4. Caracterização parcial das celulases

A partir dos resultados encontrados anteriormente, foi preparado o meio de cultivo 3 contendo 0,5% de casca de café Conilon tratada com NaOH e US durante 120 horas de fermentação a 37 °C e 150 rpm de agitação. Após o tempo de incubação as amostras foram retiradas e avaliada as características de cada enzima.

5.4.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da Avicelase (AVCase) e Carboximetilcelulase (CMCase)

A avicelase produzida pelo *Bacillus licheniformis* CCMA-1674 foi avaliada na faixa de pH entre 5 e 9,5 (Figura 4). A atividade ótima para a avicelase foi encontrada em pH 5,0. Observando-se que no intervalo de pH entre 7,0 e 8,5 a enzima manteve cerca de 65% de sua atividade relativa.

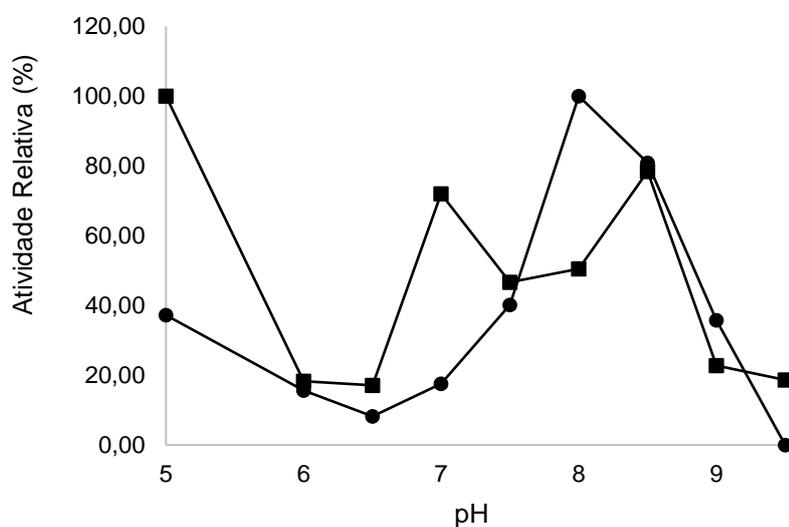


Figura 4: Efeito do pH (■) e estabilidade (●) ao pH da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 33,573 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo).

Em relação à estabilidade da enzima, a avicelase manteve 100% de atividade relativa, quando incubada em pH 8,0. Porém, entre os valores de pH 6,0; 6,5; 9,0 e 9,5 foram mantidos apenas 20% de sua atividade relativa.

No estudo da Ladeira et al. (2015) pôde-se verificar o mesmo efeito, onde mesmo a AVCase e a CMCcase apresentaram atividade ótima quando o pH se encontrava em torno de 7,5 e 8,0 utilizando *Bacillus* sp. SMIA-2 suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.

Freitas (2020) caracterizou a avicelase produzida pelo *B. licheniformis* N378 (identificado e classificado como *B. licheniformis* CCMA 1673) em meio contendo casca de café Conilon tratada com NaOH e encontrou pH ótimo de 7,0. E observou que no intervalo de pH 6,5 a 7,5 a enzima manteve cerca de 80 % da sua atividade relativa.

A carboximetilcelulase foi avaliada quanto ao pH no intervalo de 5,0 à 9,5 encontrando pH ótimo em 7,0 (Figura 5). Em intervalo de pH de 5,0 a 6,5 a enzima mantém atividade enzimática acima de 80% e entre 7,5 a 9,0 acima de 67% de atividade. Em pH 9,5 a atividade mantém acima de 90%.

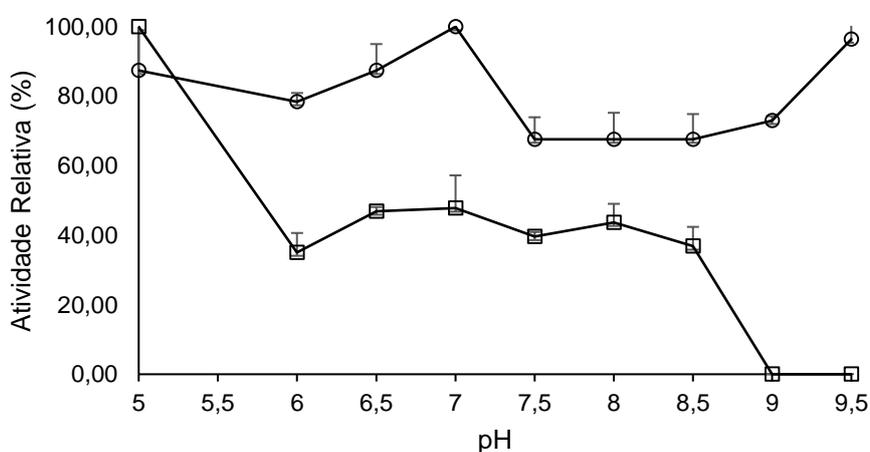


Figura 5: Efeito do pH (○) e estabilidade ao pH (◻) da carboximetilcelulase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 0,618 U/mL). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

Segundo os dados obtidos, a carboximetilcelulase foi estável durante 3 horas em pH 5,0, mantendo 100% de atividade.

5.4.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de AVCase e CMCCase

As enzimas foram produzidas em cultivo de 120 horas de fermentação a 37 °C e 150 rpm de agitação. Os experimentos do efeito de temperatura tiveram abrangência de 30 °C a 100 °C em pH 7,0.

Observa-se na Figura 6 que a maior atividade de avicelase foi obtida na temperatura de 40 °C. Em temperaturas de 70, 80 e 90 °C a enzima mantém cerca de 80% de atividade enzimática.

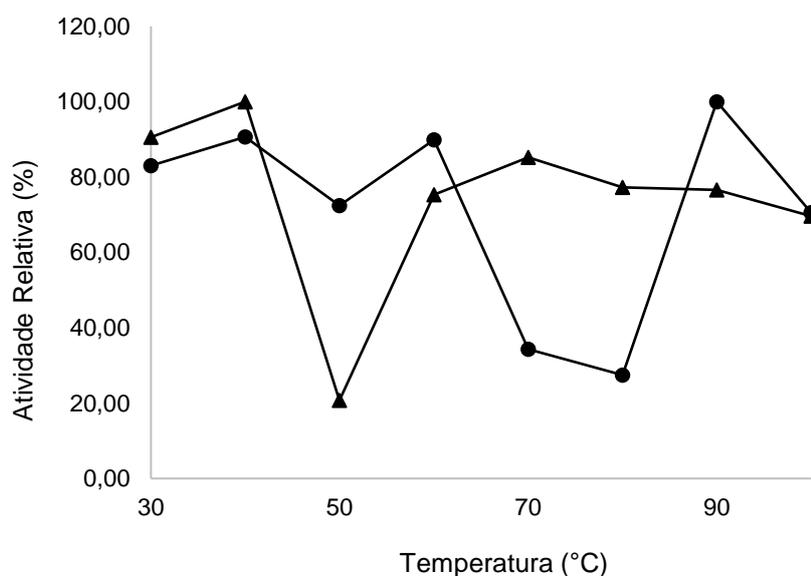


Figura 6: Efeito da temperatura (\blacktriangle) e estabilidade à temperatura durante 60 minutos (\bullet), da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 5,240 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo).

Makky (2009) e Oliveira et al., (2014), encontraram valores de temperatura ótima para avicelase de 50 °C e 70 °C, respectivamente, os dois autores utilizaram nos seus trabalhos o gênero *Bacillus* que foram caracterizados

como termófilos. Em comparação com o presente trabalho, verificou-se que a enzima manteve cerca de 80% de atividade a partir de 60 °C. Acharya e Chaudhary (2012) encontraram valores de temperatura ótima para a atividade da carboximetilcelulase de 50 °C.

A temperatura ótima encontrada para a atividade de carboximetilcelulase foi de 90 °C. A enzima ainda manteve atividade enzimática acima de 60% em temperaturas acima de 50 °C.

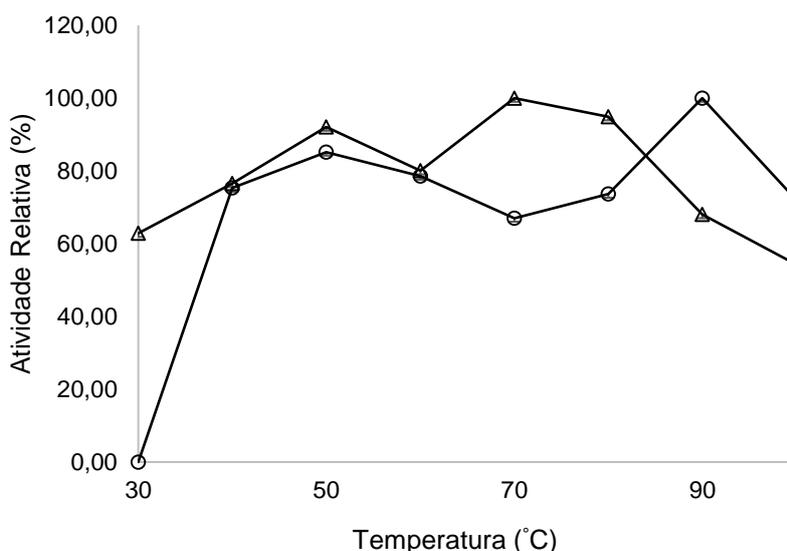


Figura 7: Efeito da temperatura (—○—) e estabilidade à temperatura durante 60 min (—△—) da CMCCase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 0,673 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo).

Verificou-se no presente estudo que a carboximetilcelulase foi estável em temperaturas altas, mantendo praticamente 100% de atividade em temperaturas de 70 e 80 °C durante 60 minutos de incubação. Huang e Monk, (2004) relataram em seus trabalhos que a termoestabilidade de uma determinada enzima está ligada a complexas interações de fatores extrínsecos, isso evidencia a necessidade de estudos para confirmar que fatores influenciam a termoestabilidade das enzimas, como as do presente estudo.

No trabalho de Ladeira et al. (2015), foi encontrado valor de temperatura ótima para atividade da AVCCase e da CMCCase de 70 °C, secretadas por *Bacillus*

sp. SMIA-2 em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar. Também pôde ser observado no estudo de Kazeem (2016), que a temperatura ótima para atividade da CMCase foi de 65 °C utilizando *Bacillus licheniformis* 2D55 em meio também contendo bagaço de cana-de-açúcar.

As celulases produzidas pela bactéria termofílica e celulolítica *Anoxybacillus* sp. 527 apresentaram uma elevada atividade entre temperaturas de 50 a 70 °C e com máxima atividade em 70 °C. Mesmo que essas atividades tenham sido drasticamente reduzidas a 80 °C, 25% do potencial máximo celulolítico foi mantido até 100 °C, tornando assim essas enzimas promissoras para a engenharia genética de proteínas, com intuito de melhoramento de sua tolerância para a degradação de celulose em altas temperaturas (LIANG et al., 2010).

5.4.3. Efeito dos íons metálicos na atividade e estabilidade da AVCCase e CMCase

Pode-se observar na Figura 8, os resultados encontrados quando foi estudado o efeito dos íons metálicos na atividade e estabilidade de avicelases secretadas por *Bacillus licheniformis* CCMA-1674.

Verifica-se que os íons Zn^{2+} Mn^{2+} aumentaram a atividade da avicelase em 51,40 %, 150% respectivamente.

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 da avicelase, ao passo que o Cu^{+2} e Hg^{+2} diminuíram a atividade.

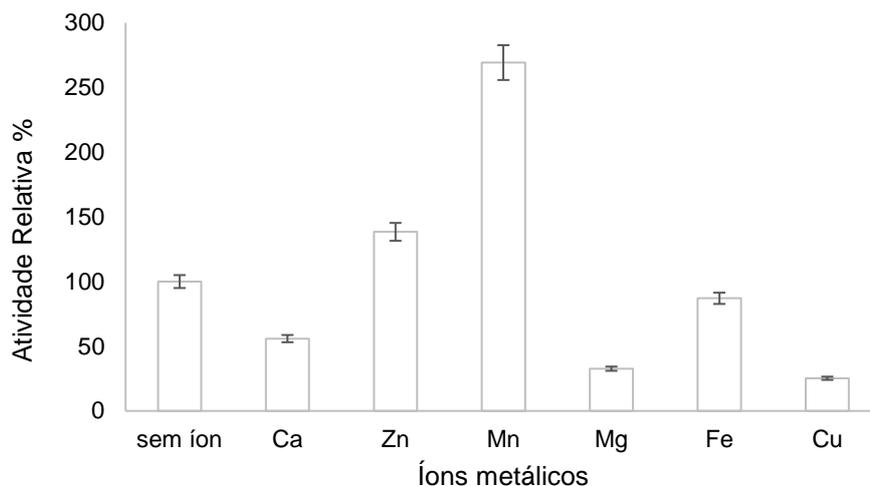


Figura 8: Efeito dos íons metálicos na atividade da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima na ausência de íon metálico = 9,373 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo).

As enzimas microbianas extracelulares são geralmente reconhecidas por exigir cátions divalentes para a sua atividade e estabilização, e, a enzima avicelase do presente estudo apresentou resultados semelhantes a vários outros autores (MAKKY, 2009; MUKHERJEE et al., 2011; LIN, 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

Ao avaliar o íon Mn^{2+} na estabilidade de avicelase secretada pelo microrganismo durante 120 minutos em temperaturas de 50, 70 e 90 °C (Figura 9), observou-se que em menores temperaturas, a avicelase na ausência do íon manteve 100% de atividade durante 30 min de incubação a 50 °C e diminuiu a atividade com o passar do tempo. E na presença do íon, a atividade da avicelase praticamente dobrou durante 30 min a 50 °C.

De acordo com Aygan e Arikan (2008), alguns íons metálicos na sua forma de sal, interagem com a enzima evitando a desnaturação térmica, desempenhando assim, um importante papel na estabilidade de enzimas a altas temperaturas.

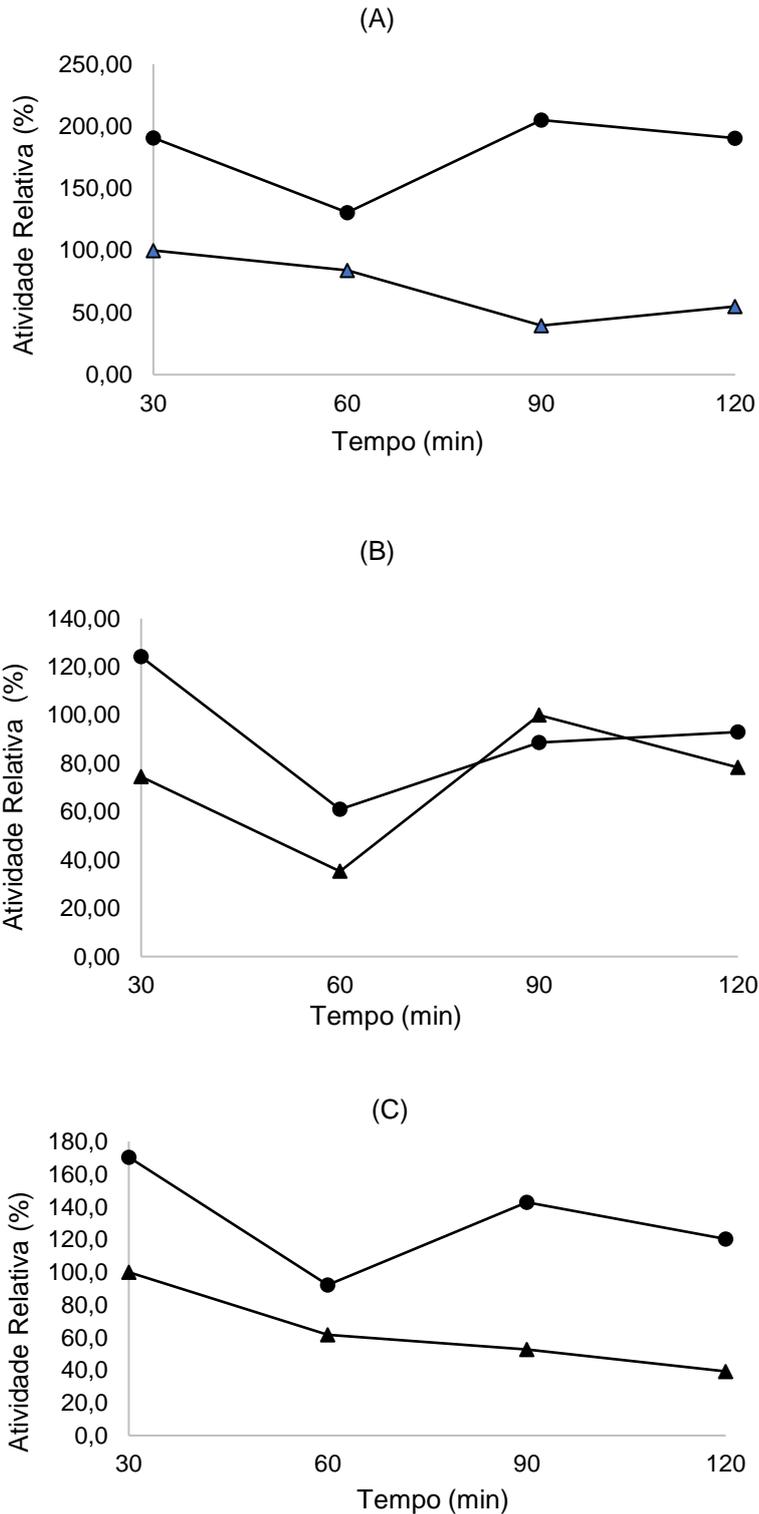


Figura 9: Estabilidade da avicelase na ausência do íon (▲), e presença de Mn^{2+} (●), da avicelase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 9,373 U/mL). (A) incubação a 50 °C, (B) incubação a 70 °C e (C) incubação a 90 °C.

Nota-se o mesmo efeito no que diz respeito ao aumento da atividade da avicelase, na presença do íon Mn^{2+} nas temperaturas de 70 e 90 °C durante 120 min (Figura 9).

Na Figura 10, pode-se observar que os íons Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} contribuíram para aumentar atividade da carboximetilcelulase produzida. A presença do íon Fe^{2+} foi marcante no aumento da atividade da enzima, chegando a valores quase 5 vezes maiores do que na ausência de íons. Por outro lado, os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , diminuíram a atividade enzimática.

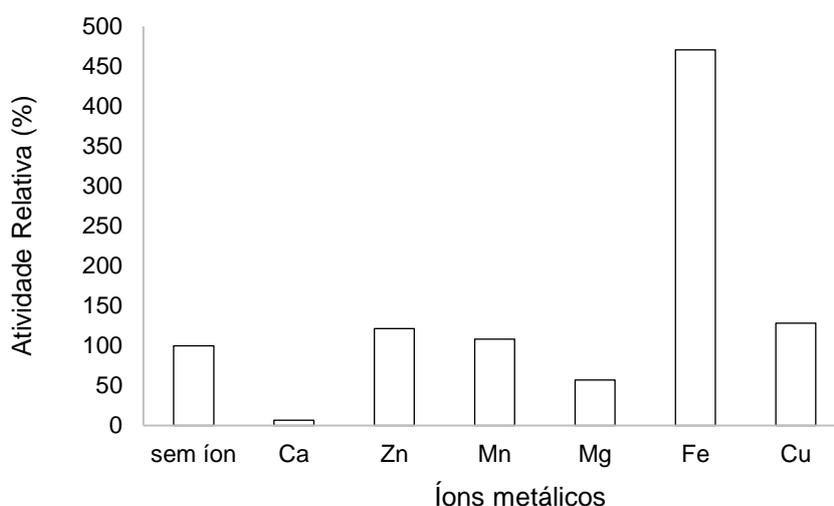


Figura 10: Efeito dos íons metálicos na atividade da carboximetilcelulase produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima na ausência de íon metálico = 0,484 U/mL). (As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo).

A partir dos resultados encontrados, a carboximetilcelulase foi incubada durante 120 minutos em temperaturas de 50, 70 e 90 °C, na ausência e presença do íon Fe^{2+} . Verificou-se que a enzima, incubada à temperatura de 50 °C (Figura 11) foi estável na presença do íon durante todo o tempo investigado (120 min) atingindo valores de atividade relativa cerca de 25 vezes maior que na ausência do íon.

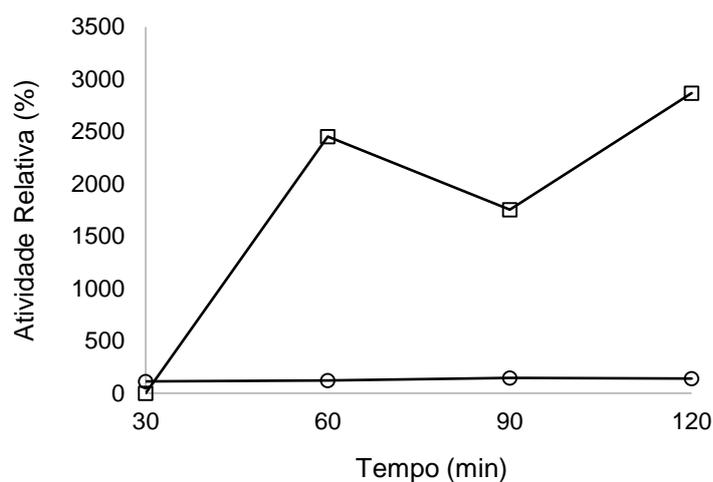


Figura 11: Estabilidade da carboximetilcelulase na ausência de íon (—○—) e na presença de Fe²⁺ (—□—), produzida por *Bacillus licheniformis* CCMA1674 cultivado à 37 °C e 150 rpm por 120 horas em meio líquido contendo casca de café Conilon tratado com NaOH e US e *whey protein*. A atividade relativa foi expressa em porcentagem (100% da atividade da enzima = 0,484 U/mL).

Foi investigado o efeito das temperaturas de 70 °C e 90 °C na estabilidade da carboximetilcelulase, entretanto, não foi observada atividade enzimática durante os tempos estudados, verificando-se assim a inativação dessa enzima, na ausência e presença de Fe²⁺ nas temperaturas citadas.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que quando aplicado um pré-tratamento na casca de café, como NaOH e US, ocorreu uma influência positiva na produção enzimática, tornando o resíduo estudado uma fonte alternativa nos cultivos submersos, de forma a aumentar a produção de celulases, além de diminuir o impacto ambiental oriundo da geração do respectivo resíduo. Além disso, o efeito de uma fonte proteica como o *whey protein* no meio de cultivo possibilitou um aumento na secreção das enzimas estudadas.

Foi demonstrado que a bactéria *Bacillus licheniformis* CCMA 1674, foi capaz de produzir avicelase e carboximetilcelulase com valores de pH ótimos de 5,0 e 7,0 e temperaturas ótimas de 40 °C e 90 °C respectivamente. As enzimas foram estáveis em temperaturas altas durante 60 min, mantendo cerca de 100% de atividade a 90 °C (avicelase) e 70 e 80 °C (carboximetilcelulase). As enzimas secretadas pelo microrganismo demonstraram aumentar a estabilidade térmica na presença de íons metálicos, Mn^{2+} e Fe^{2+} (avicelase e carboximetilcelulase, respectivamente).

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 S. A. Chaudhary Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (2012) 497–503, doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000400003>.
- ACHARYA S., CHAUDHARY A.; Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;43(3):8844-856. 10.1016/j.jenvman.2022.114431.
- ALBERNAS-CARVAJAI, Y., CORSANO, G., MORALES-ZAMORA, M., GONZÁLEZ-CORTÉS, M., SANTOS-HERRERO, R., GONZÁLEZ-SUÁREZ, E. (2014). Optimal Design or an etanol plant combining first and second generation technologies. *CT&F- Ciencia, Tecnología y Futuro*, 5(5), 113-136.
- ALCARAZ, L. D., MORENO-HAGELSIEB, G., EGUIARTE, L. E., SOUZA, V., HERRERA-ESTRELLA, L., & OLMEDO, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, 11(1), 332. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>.
- AL-DHABI, N.A.; PONMURUGAN, K.; MARAN, P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 206-213, 2017.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process

based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851–4861, 2010.

ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, v. 88, p. 544-552, 2012.

ARBIGE, M.V., SHETTY, J.K., CHOTANI, G.K., 2019. Industrial enzymology: the next chapter. *Trends Biotechnol.* 37, 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>.

Associação Brasileira de Celulose e Papel – ABTCP. Normas Técnicas. São Paulo. 1968.

AYGAN, A.; KARCIOGLU, L.; ARIKAN, B. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 789-796, 2011.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BARBOSA F. C., KENDRICK E., BRENELLI L. B., ARRUDA H. S., PASTORE G. M., Rabelo S. C., Damasio A., FRANCO T. T., LEAK D., GOLDBECK R. Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes, *Biomass and Bioenergy*, Volume 141, 2020, 105697, ISSN 0961-9534, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105697>.

BARROS, H.D.F.Q.; BASEGGIO, A.M.; CÉLIO F.F. ANGOLINI, C.F.F.; PASTORE, G.M.; CAZARIN, C.B.B.; MAROSTICA-JUNIOR, M.R. Influence of

- different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). Food Research International, v. 124, p. 16-26, 2019.
- BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; ARCHANA, M.; USHA, J. K.; SINDHU, R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. High temperature pré-treatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production, Fuel, v. 92, p. 340-345, 2012.
- BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system, Enzyme and Microbial Tecnology, v. 27, n. 2000, p. 127-133
- BROWNING, B.L. Methods on Wood chemistry. New York: Iterscience, 1967. V.2
Campanha Nacional de Abastecimento – CONAB. Produção de café está estimada em 50,38 milhões de sacas na safra 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>> Acesso em: 02 de novembro de 2022.
- CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.38, p.1467-1475, 2011.
- CARVALHO, R., V., CORRÊA, T., L., R., SILVA, J., C., M., VIANA, A., P., LEAL, M., L., Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. Food Science And Technology, Campo dos Goytacazes, v. 2, n. 28, p. 380-386, jun. 2008.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, São Paulo, v. 33, n. 1, 2010.

CASTRO, A.M., PEREIRA JR., N. (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova.*, 33:181-188.

CHANDEL A.K., ALBARELLI J.Q., SANTOS D.T., CHUNDAWAT S.P., PURI M., MEIRELES M.A. A., Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale, *Biofuel Bioprod. Biorefin.* 13 (4) (2019) 994–1014, <https://doi.org/10.1002/bbb.1990>.

CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: Advancing the generation of “Biofuel”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 5, p. 1289–1303, 2011.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHU Q., LI X., XU Y., WANG Z., HUANG J., YU S., YONG Q., Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture, *Process Biochem.* 49 (2014) 1217–1222, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.007>.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Análise Mensal do café – Dezembro 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4857-safra-de-cafe-deve-encerrar-o-ciclo-de-2022-com-uma-producao-de-50-92-milhoes-de-sacas>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2023.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ - CECAFE. Produção de café. Disponível em: <https://www.cacafe.com.br/sobre-o-cafe/produção/> Acesso em: 02 de novembro de 2022.

- DADWAL, A., SHARMA, S., & SATYANARAYANA, T. (2019). Diversity in cellulose-degrading microbes and their cellulases: role in ecosystem sustainability and potential applications. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 2. Soil & Agroecosystems*, 375-402.
- DE ARAÚJO, M. A. et al. Sustentabilidade empresarial em agroindústrias pernambucanas. *Revista Livre de Sustentabilidade e Empreendedorismo*, v. 4, n. 1, p. 200-218, 2019.
- DELATORRE, A. B. Produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2. 2010. 72 f. 2º Congresso Sul-Americano de Resíduos Sólidos e Sustentabilidade- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 2010.
- DIAS, M. (2016) Aproveitamento de resíduos do processamento do café para produção de carotenoides por leveduras e bactérias. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) -Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras. 122p.
- DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, p. 52–64, 2018.
- DURÁN, C. A. A. et al. (2016) Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da bebida. *Revista virtual de química*, Rio de Janeiro, 9:107-134.
- EC 3.2.1.176 IUBMB enzyme nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/176.html>. (Acesso em 20 Março 2023).
- EC 3.2.1.91 IUBMB Enzyme Nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/91.html>. (Acesso em 20 Março 2023).
- EJAZ U., MOIN S. F., SOHAIL M., MERSAL G. A. M., IBRAHIM M. M., EL-BAHY S. M., Characterization of a novel end product tolerant and thermostable cellulase from *Neobacillus sedimentimangrovi* UE25, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume

162, 2023, 110133, ISSN 0141-0229,
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110133>.

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics* 2021, 6, 44.
<https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

EJAZ, U.; SOHAIL, M. Ionic Liquids: green solvente for biomass pretreatmet. In Nanotechnology-based Industrial Applications of Ionic Liquids (pp.27-36).
https://doi.org/10.1007/978-3-030-44995-7_2

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Documentos 236. Procedimentos para Análise Lignocelulósica. 58 p. Campina Grande - PB, 2010.

ENTEZARI, M. H.; NAZARY, S. H.; KHODAPARAST, M. H. H. The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 379-384, Sept. 2004.

FARIQ A., 2016. Microbial cellulases: production and applications. *J. Biotechnol. Sci. Res.* 3, 122–127.

FERRÃO, R. G. et al .(2017) *Café Conilon*. 2. ed. Vitória - ES, 786p.

FLORENCIO, CAMILA. Micro-organismo produtos de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma* spp. 2011. Dissertação, Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

FLOROS, J. D.; LIANG, H. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology*, Chicago, v. 48, n. 12, p. 79-84, Dec. 1994.

FREITAS, W., L., C., Estudos da casca de café com matéria prima em processos fermentativos. *Biociencia Industrial*. Lorena, 2016. 118 p.

- GAL, L.; PAGES, S.; GAUDIN, C.; BELAICH, A.; REVERBEL-LEROY, C.; TARDIF, C.; BELAICH, J. Characterization of the Cellulolytic Complex (Cellulosome) Produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.63, p. 903-909, 1997.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina na madeira: método Klason modificado. *O papel*, v.47, n.1, p.36-38,1986.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-deaçúcar. *Química Nova*, v.32, n.6, p.1500-1503, 2009.
- GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrase, Proteases), By Source (Microorganisms, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 20 mar. 2023.
- GRIEBELER, N. E.; de BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, p. 13-22, 2015.
- GURUNG N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, v. 2013, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121>
- GUSAKOV A. V., Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production, *Trends in Biotechnology*, Volume 29, Issue 9, 2011, Pages 419-425, ISSN 0167-7799, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>.

- HASUNUMA T., OKAZAKI F., OKAI N., HARA K.Y., ISHII J., KONDO A., A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 513–522.
- HUANG, L.; FORSBERG, C. W.; (1987) Isolation of a Cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes* *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1034.
- 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.
- JUTURU, V., WU, J.C., 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>.
- JYOTI, K. K.; PANDIT, A. B. Effect of cavitation on chemical disinfection efficiency. *Water Research, Oxford*, v. 38, n. 9, p. 2249-2258, May 2004.
- KARNAOURIA., MATSAKASL., KRIKIGIANNIE., ROVAU., CHRISTAKOPOULOS P., Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails, *Biotechnol. Biofuels* 12 (2019) 1–19, <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1628-z>.
- 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.
- KOUPAIE, E.H., DAHADHA, S., LAKEH, A.B., AZIZI, A., ELBESHISHY, E., 2019. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced

biomethane production-A review. *J. Environ. Manag.* 233, 774–784.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.106>.

KUHAD, R.C., DESWAL, D., SHARMA, S., BHATTACHARYA, A., JAIN, K.K., KAUR, A., PLETSCHKE, B. I., SINGH, A., KARP, M., 2016. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 55, 249–272.

LADEIRA, S. A.; CRUZ, E.; DELATORRE, A. B.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 110-115, 2015.

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

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamental and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 506-577, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.66.3.506.577.2002>

MAEDA R.N., BARCELOS C.A., ANNA L.M.M.S., PEREIRA N., Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation, *J. Biotechnol.* 163 (2013) 38–44. ISSN 0168-1656, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.014>.

MAEDA, R. N. et al. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; DHYANI, A.; PATHAK, B.; JANG, H.; PARK, S.; PASHIKANTI, S.; CHO, S. Biotransformation of Citrus Waste-I: Production of Biofuel

and Valuable Compounds by Fermentation. *Processes* 2021, 9, 220.
<https://doi.org/10.3390/pr9020220>

MAHMOOD, A.U.; GREENMAN, J.; SCRAGG, A.H. (1998). Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial and Technology*, New York, vol. 22, n.1, p. 130-137.

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.

MARAN, J.P.; MANIKANDAN, S.; NIVETHA, C. V.; DINESH, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.007>

MEHTA, A.; GULERIA, S.; SHARMA, R.; GUPTA, R. The lipases and their applications with emphasis on food industry. *Microbial Biotechnology in Food and Health*, p. 143-164, 2021.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p. 440-443, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200033>>.

MEREGALLI, M.M.; PUTON, B.M.S.; CAMERA, F.D.; AMARAL, A.U.; ZENI, J.; CANSIAN, R.L.; MIGNONI, M.L.; BACKES, G.T. Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, p. 5800-5809, 2020.

- MESA, L., SALVADOR-PINOS, C., HERRERA, M., CARRAZANA, D., GONZALEZ, E., 2016. Cellulases by *Penicillium* sp. in different culture conditions. *Bioethanol*, v.2., n.1, 2016
- MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M. B.; MORY, E. E. M. Determinação de minerais em café cru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n.1, p.19-23, 2002.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96 (6), 673–686.
- 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.
- MURUGAN, T.; DEEPIKA, P; KOWSALYA, A.; SIVASUBRAMANIAN, K.; REJISHA, R. P.; M. MURUGAN, M.; WINS, J. A. Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil. *Materials Today: Proceedings*, v. 45, p. 2087-2090, 2021.
- NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulases: from production to biotechnological applications. In: GOLAN, A. E. (Ed.). *Cellulase: types and action, mechanism, and uses*. New York: Nova Science, 2011. p. 306.
- NZEKOU, F.K.; ANGELONI, S. NAVARINI, L.; ANGELONI, C.; FRESCHI, M.; HRELIA, S.; VITALI, L.A.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S.; CAPRIOLI, G. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Research International*, v. 133, p. e109128, 2020.
- 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.

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 Food Technology*. 2015;18(3):231-8.

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

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. (2020). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid enzymes production process. *Bioresource Technology*, v. 309, 123317, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>

PATEL S., GOYAL A., Functional oligosaccharides: production, properties and applications, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2011) 1119–1128, <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0558-5>

PATEL, A., SINGHANIA, R., SIM, S., PANDEY, A. (2019). Thermostable cellulases: current status and perspectives. *Bioresource technology*, 279, 385–392. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.049

PERIMENIS, A. et al. Comparison of the acidogenic and methanogenic potential of agroindustrial residues. *Waste Management*, v. 72, p. 178-185, 2018.

- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B. Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. *Biochemistry*, London, v. 26, p. 65-74, 1991. Practice. 1st ed. Springer, New York.
- RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado). Disponível em: Acessado em 18 ago. 2009.
- RATHINAM, N., SAMANTA, D., KUMAR, A., SANI, R., 2017. Bioprospecting of thermostable cellulolytic enzymes through modeling and virtual screening method. *Can. J. Biotechnol.* 1.
- REHMAN, S., ASLAM, H., AHMAD, A., KHAN, S. A., & SOHAIL, M. (2014). Production of plant cell wall degrading enzymes by monoculture and co-culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* under SSF of banana peels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1485–1492. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400045>
- RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.
- ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology* 11: p. 626-644, 1989.
- 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.
- SANTOS G., FILHO Á., RODRIGUES J., SOUZA R. (2022). Cellulase production by *Aspergillus niger* using urban lignocellulosic waste as substrate: Evaluation

of different cultivation strategies. *Journal of Environmental Management*. 305. 114431.

SANTOS, L. C. Tratamento oxidativo de cascas de café com ozônio com vistas à produção de biogás e etanol 2G. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases pós fermentação em estados sólidos utilizado pedúnculo de caju como substrato 2007.148p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 2007.

SETHI, B., DASH, A., SATAPATHY, A., TRIPATHY, S.K., PARIDA, S., BEHERA, B., 2016. Production of cellulase by *Aspergillus niger* NCFT 4263.10 using agro waste as a substrate. *Int. J. Biol. Res.* 1, 2455–6548.

SEYMOUR, I. J.; BURFOOT, D.; SMITH, R. L.; COX, L. A.; LOCKWOOD, A. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 37, n. 5, p. 547-557, June 2002.

SHABEB, M. S. A.; YOUNIS, M. A. M.; HEZAYEN, F. F.; ELDEIN, M. A. N. Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. *World applied sciences journal*, Aswan, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2010.

SHAH F., RANAWAT B., DUBEY S., MISHRA S., Optimization of fermentation conditions for higher cellulase production using marine *Bacillus licheniformis* KY962963: An epiphyte of *Chlorococcum* sp., *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 35, 2021, 102047, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102047>.

SHAH, F., RANAWAT, B., MISHRA, S., 2019. An Approach toward Cellulase Production, Bioconversion, and Utilization, *Advanced Bioprocessing for*

Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts. Elsevier, pp. 207–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817941-3.00011-5>.

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, Tamil Nadu, v. 29, n. 3, p. 302-310, 2017.

SHEWALE, J.G.; SADANA, J.C. Cellulase and -glucosidase production by a basidiomycetes species. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, v. 24, p. 1204- 1216, 1978.

SILVA R. N. da, MELO L. F. de A., FINKLER C. L. L., Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production, Biotechnology Reports, Volume 29, 2021, e00599, ISSN 2215-017X, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00599>.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 31, n. 2, 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.

SINGH, V. K.; KUMAR, A. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* vs-1. IUBMB Life, Indore, v. 45, n. 3, p. 443-452, 1998.

SINGHANIA R.R., RUIZ H.A., AWASTHI M.K., DONG C.-D., CHEN C.-W., PATEL A.K., Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications, Renew. Sustain. Energy Rev. 151 (2021), 111622, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111622>.

- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SIQUEIRA J.G.W., RODRIGUES C., VANDENBERGHE L.P.d.S., WOICIECHOWSKI A.L., SOCCOL C. R., Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review, *Biomass Bioenergy* 132 (2020), 105419, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>.
- SREENATH, H. K.; KOEGEL, R. G.; MOLDES, A. B.; JEFFRIES, T. W.; STRAUB, R. J. (2001) *Proc. Biochem.*, 36, 1199.
- SURIYA, J.; BHARATHIRAJA, S.; KRISHNAN, M.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 79, 2016.
- 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.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresource*, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.
- TAMANINI, C.; HAULY, M.C. DE O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, v.25, n.4, p.315-330, 2004. <https://doi.org/10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188>
- Technical Divisions and Committees (TAPPI). T 204 cm-97. Solvent extractives of wood and Pulp. 12 p. Atlanta: Tappi Press, 2007.

VAN TILBEURGH, H., LOONTIENS, F. G., DEBRUYNE, C. K. & CLAEYSSCNS, M. (1988). Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Meth. Lnzymol.*, 160, 45-59.

ZHANG Y.H.P., LYND L.R., Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems, *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004) 797–824.

ZHOU H.Y., ZHOU J.B., YI X.N., WANG Y.M., XUE Y.P., CHEN D.S., Cheng X.P., LI M., WANG H.Y., CHEN K.Q., LIU Z.Q., ZHENG Y.G., Heterologous expression and biochemical characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from *Colletotrichum orchidophilum*, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44 (1) (2021) 67–79.