

APLICAÇÃO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PERGAMINHO DO
CAFÉ COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA
A PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2

JULIANA ABREU REZENDE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2022

APLICAÇÃO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PERGAMINHO DO
CAFÉ COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA
A PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2

JULIANA ABREU REZENDE

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientadora: Prof^a. Ph.D. Luana Pereira de Moraes
Coorientadora: Prof^a. DSc. Erica Cruz

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R467 Rezende, Juliana Abreu.

APLICAÇÃO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PERGAMINHO DO CAFÉ COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2 / Juliana Abreu Rezende. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

92 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.
Orientadora: Luana Pereira de Moraes.

1. Termofílico. 2. Enzimas. 3. Biotecnológico. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

APLICAÇÃO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PERGAMINHO DO CAFÉ
COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO
DE PROTEASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2

JULIANA ABREU REZENDE

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Erica Cruz (DSc., Produção Vegetal) – UENF

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology) -
UENF

Prof. João Batista Barbosa (DSc., Produção Vegetal) – IFS Campus Glória

Prof^a. Luana Pereira de Moraes (Ph.D., Ciência e Tecnologia de Alimentos) –
UENF (orientadora)

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado inclui uma trajetória carregada de incertezas, alegrias e surpresas. Ser uma aluna da “pandemia” me mostrou a importância da disciplina e dedicação em buscar o conhecimento em meio a tantas adversidades. Percebi que sou capaz de trabalhar bem sozinha, mas que sou muito melhor quando estou ao lado de pessoas que impulsionam, das quais tive o prazer de conviver ao longo desses anos.

Agradeço a Deus, pelos direcionamentos e por abençoar a minha vida;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e pela concessão da bolsa de estudo – FAPERJ/UENF;

À prof^a. Ph.D. Luana Pereira de Moraes pela orientação, profissionalismo, incentivo, apoio e compreensão durante o curso. Admiro sua força.

Aos professores integrantes da banca examinadora Erica Cruz, Meire Lelis Leal Martins e João Batista Barbosa por aceitarem contribuir com esse trabalho.

Ao meu pai Eraldo e minha mãe Maria Regina, por me apoiarem em cada decisão e serem meu porto seguro, amo vocês infinitamente!

Aos meus irmãos Otilio e Thiago, pela amizade e companheirismo.

À minha amiga Ramille, por me compreender, incentivar e ser meu braço-direito em mais de 20 anos de amizade.

Aos meus amigos de Bom Jesus - RJ, Carlos, Laís, Larissa e Vinicius, que se fizeram presentes em muitos momentos de alegria.

Às minhas primas Rayane e Sabrina por serem as irmãs que nunca tive e à minha Tia Emília, obrigada por me acolherem e serem tão especiais na minha vida.

Ao meu tio Romildo, aos meus avôs e minha avó Lourdes (*in memoriam*), que apesar de não estarem presentes fisicamente, viverão eternamente em meu coração.

À toda minha família, minha avó Edena, tios e primos por serem grandes incentivadores.

Às minhas amigas de faculdade, do IFES Santa Teresa, sou imensamente grata pela amizade e apoio que temos umas com as outras.

Às minhas amigas Géssica, Dandara, Amanda e Lorena, que conviveram comigo por esses dois anos de mestrado, obrigada por cada momento que passamos juntas, nós sabemos que o caminho é árduo, mas também se torna prazeroso quando compartilhado com pessoas especiais.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Larissa, Aninha, Silvia, Lorena, Valdinéia e Daniela pela colaboração, troca de experiência e amizade.

Em especial agradeço à amiga Erica que esteve comigo desde o início ensinando com muito carinho, sem você eu não teria desenvolvido esse trabalho de forma tão prazerosa e com excelência. Acredito que todo mundo deveria ter uma Erica na vida! Amo você, obrigada por tanto.

Ao Thiago Rebel, pelo incentivo, paciência e pela troca maravilhosa que tivemos durante minha escrita. Suas palavras me enriqueceram muito e iluminaram meu caminho.

A todos os amigos, companheiros de curso e laboratório, que mesmo não sendo citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 <i>Bacillus</i>	6
3.1.1 <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	7
3.2 Produção de enzimas por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	8
3.2.1 Proteases	10
3.3 Processos fermentativos.....	11
3.4 Cultura do café e processamento.....	13
3.5 Resíduos agroindustriais gerados pela cultura do café.....	18
3.6 Planejamento Experimental.	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Obtenção do resíduo.....	24
4.2 Tratamento hidrotérmico em meio básico do pergaminho do café.....	25
4.3 Caracterização físico-química do pergaminho do café.....	25
4.3.1 Umidade	25
4.3.2 Proteína	26

4.3.3 Lipídios totais.....	26
4.3.4 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)	26
4.3.5 Carboidratos	26
4.4 Microrganismo.....	26
4.4.1 Preparo do inóculo.....	27
4.4.2 Meio de cultura	28
4.5 Estudo da produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e pergaminho de café <i>in natura</i> a 0,3%.....	28
4.6 Estudo da produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e <i>in natura</i> a 0,3% - 0,5% e 10%.....	29
4.7 Estudo da produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho de café <i>in natura</i> e diferentes fontes de nitrogênio.....	30
4.8 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental.....	31
4.9 Estudo das condições do meio de cultivo e atividade enzimática em fermentação submersa por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 utilizando pontos centrais e pontos críticos do planejamento experimental.....	32
4.10 Determinação da Biomassa Seca.....	33
4.11 Determinação de açúcares redutores totais.....	33
4.12 Ensaio enzimáticos.....	34
4.12.1 Obtenção das enzimas	34
4.12.2 Atividade enzimática da carboximetilcelulase.....	34
4.12.3. Atividade enzimática da Avicelase.....	35
4.12.4 Atividade enzimática da Xilanase	35
4.12.5 Atividade enzimática da α -amilase	36
4.12.6Atividade enzimática da Poligalacturonase	36
4.12.7 Atividade enzimática da protease	37
4.12.8 Determinação da proteína	37
4.13 Efeito do pH na atividade da protease.....	38
4.14 Efeito da temperatura na atividade da protease.....	38

4.15 Atividade e estabilidade da protease em estocagem sob congelamento.....	38
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Caracterização físico-química do pergaminho do café.....	40
5.2 Estudo da produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado e <i>in natura</i> a 0,3%.....	41
5.3 Estudo da produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado e <i>in natura</i> a 0,3% - 0,5% e 10%.....	44
5.4 Estudo da produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho de café <i>in natura</i> e diferentes fontes de nitrogênio.....	45
5.5 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental.....	46
5.5.1 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental em 36 horas de fermentação.....	46
5.5.2 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental em 48 horas de fermentação.....	55
5.6 Estudo das condições do meio de cultivo e atividade enzimática em fermentação submersa por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 utilizando pontos centrais e pontos críticos do planejamento experimental.....	64
5.7 Efeito do pH na atividade da protease.....	65
5.8 Efeito da temperatura na atividade da protease.....	66
5.9 Atividade da protease em estocagem sob congelamento.....	66
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura mostrando células de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 (Cruz, 2017).	8
Figura 2. Produção global de café de 2003 a 2021 (CONAB, 2021).....	14
Figura 3. (A) Fruto de café e suas partes. Fotos dos frutos de cafés 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 (Durán <i>et al.</i> , 2016).	15
Figura 4. Fluxograma do processamento pós-colheita de café (Durán <i>et al.</i> , 2016).	17
Figura 5. Subprodutos: a (casca); b (polpa); c (película prateada) e d (pó de café usado) (Blinová <i>et al.</i> , 2017).	18
Figura 6. Café da fazenda Santo Antônio secando em terreiro após beneficiamento via úmida.	24
Figura 7. Crescimento do microrganismo e preparo do inóculo.	28
Figura 8. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na secreção de protease por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em 36 horas de fermentação.	49

Figura 9. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na produção de biomassa por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em 36 horas de fermentação.	52
Figura 10. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na concentração de açúcares redutores totais (ART) em 36 horas de fermentação.	54
Figura 11. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na secreção de protease por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em 48 horas de fermentação.	58
Figura 12. Valores preditos e observados para a variável biomassa em função de diferentes concentrações de pergaminho e AMM, conforme DCCR 2 ²	60
Figura 13. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 5% de significância.	61
Figura 14. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na concentração de açúcares redutores totais (ART) em 48 horas de fermentação.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores médios dos constituintes do pergaminho em (%) e em ppm (mg/kg).....	20
Tabela 2. Porcentagens de Carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio para materiais celulósicos.....	21
Tabela 3. Tratamentos relacionados à produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e <i>in natura</i> a 0,3%.....	29
Tabela 4. Tratamentos relacionados à produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e <i>in natura</i> a 0,3%, 0,5% e 10%.....	30
Tabela 5. Tratamentos relacionados à produção enzimática por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho de café <i>in natura</i> e diferentes fontes de nitrogênio.	31
Tabela 6. Planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: concentração do pergaminho de café <i>in natura</i> e da água de maceração de milho.	32
Tabela 7. Tratamentos relacionados aos pontos centrais e pontos críticos.....	33

Tabela 8. Caracterização química do pergaminho tratado com NaOH 4% e do pergaminho <i>in natura</i>	40
Tabela 9. Produção de enzimas em meio contendo pergaminho do café <i>in natura</i>	42
Tabela 10. Produção de enzimas em meio contendo pergaminho do café tratado com hidróxido de sódio a 4%.	43
Tabela 11. Produção de proteases em meio contendo pergaminho do café <i>in natura</i> e pergaminho de café tratado com NaOH 4%.	45
Tabela 12. Análise enzimática em amostras de fermentação com variação da fonte de nitrogênio.	46
Tabela 13. Matriz do DCCR 2 ² para a atividade da protease, biomassa e ART com os valores reais e codificados das variáveis independentes.....	47
Tabela 14. ANOVA para a resposta da atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	48
Tabela 15. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para atividade da protease, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 36 horas de fermentação, conforme DCCR.....	48
Tabela 16. ANOVA para a resposta da biomassa de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em 36 horas de fermentação.	50
Tabela 17. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para biomassa, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 36 horas de fermentação, conforme DCCR.	51
Tabela 18. ANOVA para a resposta da concentração de açúcares redutores em 36 horas de fermentação.	53
Tabela 19. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para concentração de açúcares redutores totais, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 36 horas de fermentação, conforme DCCR.....	53

Tabela 20. Matriz do DCCR 2 ² para a atividade da protease, biomassa e ART com os valores reais e codificados das variáveis independentes.....	56
Tabela 21. ANOVA para a resposta da atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em 48 horas de fermentação.	56
Tabela 22. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para atividade da protease, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 48 horas de fermentação, conforme DCCR.....	57
Tabela 23. ANOVA para a resposta da biomassa de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em 48 horas de fermentação.	59
Tabela 24. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para biomassa, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 48 horas de fermentação, conforme DCCR.	59
Tabela 25. ANOVA para a resposta da concentração de açúcares redutores em 48 horas de fermentação.	62
Tabela 26. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para concentração de açúcares redutores totais, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 48 horas de fermentação, conforme DCCR.....	62
Tabela 27. Produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	64
Tabela 28. Atividade da protease secretada por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo 2,7% de PCN e 2,5% de AMM por 36 horas a 50°C, em diferentes pHs.	65
Tabela 29. Atividade da protease secretada por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo 2,7% de PCN e 2,5% de AMM por 36 horas a 50°C, em diferentes temperaturas.	66
Tabela 30. Atividade relativa da protease presente no extrato bruto de culturas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em função do tempo de estocagem a 3°C por 60 dias. (100% de atividade da protease = 10,49 U/mL).	67

RESUMO

REZENDE, Juliana Abreu; M.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2022. APLICAÇÃO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PERGAMINHO DO CAFÉ COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2. Orientadora: Prof^a. Ph.D. Luana Pereira de Moraes. Coorientadora: Prof^a. DSc. Erica Cruz.

O resíduo agroindustrial, pergaminho do café, pode ser utilizado por microrganismos em processos fermentativos, para produção de diferentes produtos de interesse industrial, como as enzimas. Neste trabalho, estudos sobre a utilização do pergaminho do café como substrato biotecnológico para a produção de proteases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 foram realizados. O estudo iniciou-se com a escolha do meio de cultivo e aplicação de substratos alternativos e de baixo custo. O pergaminho do café *in natura* (PCN), pergaminho do café tratado (PCT) e água de maceração de milho (AMM) foram estudados a fim de determinar as melhores concentrações desses resíduos para formação do meio de cultura. Foi utilizado um planejamento experimental e aplicou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) (2²) para otimização das condições de cultivo. Por fim, avaliou-se a atividade da protease em diferentes pHs, temperaturas e sua estabilidade em estocagem sob congelamento. Os resultados do DCCR mostraram que as atividades das proteases foram melhores quando o *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em culturas submersas contendo 2,7% de pergaminho e 2,5% de AMM, por 36 horas, à

temperatura de 50 °C. A produção da enzima atingiu o máximo de 11,40 U/mL. Estudos sobre a caracterização da protease demonstraram que a temperatura ótima foi de 70°C e pH ótimo foi de 8,5. A estabilidade das proteases presentes nos extratos brutos da cultura permaneceram estáveis por 45 dias, à temperatura de 3°C. Os resultados demonstraram que o pergaminho do café é um resíduo promissor a ser utilizado como substrato de baixo custo, por *Bacillus* sp. SMIA-2, para a produção de proteases.

Palavras-chaves: termofílico; enzimas; biotecnológico.

ABSTRACT

REZENDE, Juliana Abreu; M.Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2022. APPLICATION OF PARCHMENT COFFEE, AN AGROINDUSTRIAL RESIDUE, AS A SUBSTRATE IN SUBMERGED FERMENTATION FOR PROTEASES PRODUCTION BY *Bacillus* sp. SMIA-2. Advisor: Ph.D. Luana Pereira de Moraes. Co-Advisor: DSc. Erica Cruz.

The agro-industrial residue, coffee parchment, can be used by microorganisms in fermentation processes, for the production of different products of industrial interest, such as enzymes. In this work, studies about the use of coffee parchment as a biotechnological substrate for the production of proteases by the thermophilic microorganism *Bacillus* sp. SMIA-2 were performed. Firstly, culture media application of alternative and low-cost substrates. The parchment coffee *in natura* (PCN), treated parchment (TPC) and corn steep water (CSW) were studied in order to determine the best concentrations of these residues to prepare the culture medium. An experimental design was used and a central rotational composite design (CCRD) (2²) was applied to optimize the cultivation conditions. Finally, the protease activity was evaluated at different pHs, temperatures and its stability in storage under freezing. The DCCR results showed that the protease activities were better when *Bacillus* sp. SMIA-2 was grown in submerged cultures containing 2.7% parchment and 2.5% AMM for 36 hours at 50 °C. Enzyme production reached a maximum of 11.40 U/mL. Studies on the characterization of

the protease showed that the optimum temperature was 70°C and the optimum pH was 8.5. The stability of the proteases present in the crude extracts of the culture remained stable for 45 days at a temperature of 3°C. The results showed that coffee parchment is a promising residue to be used as a low-cost substrate by *Bacillus* sp. SMIA-2, for the production of proteases.

Keywords: thermophilic; enzymes; biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes do mundo (Blinováet *al.*, 2017). Segundo dados da CONAB (2021), o volume total produzido de arábica e conilon no país foram de 47, 716 milhões de sacas de café beneficiado. A área destinada à cafeicultura no quarto levantamento de 2021 totaliza 2,2 milhões de hectares, sendo 1, 74 milhões de hectares de café arábica, o que corresponde a 81,3% da área total. Minas Gerais concentra a maior área com a espécie, 1,287 milhões de hectares, equivalendo a 71,9 % da área ocupada com café arábica em âmbito nacional.

O café conilon consegue produzir uma bebida com sabor mais amargo, de baixa acidez e coloração mais acentuada, enquanto o café arábica é mais aromático, mais ácido e menos encorpado. As espécies também variam quanto às condições climáticas de cultivo, tempo de florada e formação do fruto (Agnoletti, 2015).

O fruto de café contém dois grãos encapsulados por uma camada bem fina, chamada película prateada, que por sua vez, é envolvida por outra camada chamada pergaminho. O pergaminho está em contato direto com a polpa da fruta, que é recoberta pela casca. O principal produto de interesse comercial são os grãos ou sementes do café, o que representa de 50-55% da matéria seca da fruta, ou seja, o material restante constituirá como resíduo ou possível subproduto do processamento (Massey, 2016).

O Brasil desempenha um papel relevante na produção agrícola mundial e devido a isso, possui alta capacidade de geração de resíduos agroindustriais (Ladeira, 2013). Como exposto por Santos (2017), o pergaminho representa entre 28,7 a 38,8% da casca do café, contabilizando uma média de 31 milhões de sacas de pergaminho geradas no ano de 2021. Os resíduos agroindustriais, como o pergaminho do café, podem ser aproveitados como fonte de carbono pelos microrganismos, em técnicas fermentativas, para obtenção de energia na produção de diferentes produtos de interesse industrial, como as enzimas.

As enzimas constituem um grupo de proteínas que desempenham funções importantes no metabolismo, atuam como catalisadoras de processos bioquímicos, decompondo moléculas complexas em unidades menores (Queiroz e Sousa, 2020). A produção de enzimas por microrganismos é um método pertinente do ponto de vista econômico, devido ao crescimento rápido das culturas e pelo alto rendimento que proporcionam (Carvalho, 2019).

Nesse sentido, as proteases formam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e possuem uma ampla aplicabilidade industrial, seja na produção de medicamentos, de alimentos, na fabricação de detergentes e cosméticos. A termoestabilidade é uma característica muito desejada, além da crescente demanda do mercado por proteases com ação específica, estabilidade em diferentes condições de pH e que incentiva a busca por novas fontes de enzimas proteolíticas (Rigo *et al.* 2021).

Levando em consideração a demanda por fontes tecnológicas de enzimas, o *Bacillus* sp. é um microrganismo anaeróbico facultativo, amplamente distribuído no meio ambiente e que produz enzimas extracelulares capazes de digerirem polissacarídeos complexos (Almeida *et al.*, 2018). O *Bacillus* sp. SMIA-2 é uma bactéria termofílica, aeróbica e formadora de esporos, isolada de amostras de solo coletadas no município de Campos dos Goytacazes – RJ e se encontra no grupo de organismos reconhecidos como seguros no *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (Cruz, 2021). É capaz de produzir níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas, como as proteases, que podem ser produzidas quando o microrganismo é cultivado em meios de cultura contendo resíduos agroindustriais (Andrade, 2009; Ladeira *et al.*, 2015; Delatorre, 2010).

O aproveitamento do pergaminho do café tem sido pouco explorado, suas aplicações são limitadas devido à sua composição química complexa, fazendo com que seja necessário realizar novas pesquisas visando sua utilização (Brum, 2007). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2, utilizando o pergaminho de café como substrato, através de fermentação submersa, método que facilita o controle do processo e a recuperação das enzimas. Também foi realizada a caracterização química do resíduo, o estudo da influência do tempo e da temperatura de congelamento e do pH na atividade e estabilidade da protease.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a utilização do pergaminho do café como substrato biotecnológico para a produção de proteases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2

2.2 Objetivos específicos

Realizar o tratamento hidrotérmico do pergaminho do café com NaOH;

Caracterizar através de análises físico-químicas o pergaminho do café tratado e *in natura*;

Verificar o potencial enzimático do pergaminho do café tratado e *in natura* como substrato em diferentes concentrações;

Determinar a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada na fermentação submersa;

Investigar enzimas produzidas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 dentro das condições fermentativas propostas para o pergaminho de café tratado e *in natura*;

Otimizar a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 a partir das concentrações do pergaminho do café e água de maceração de milho avaliadas;

Relacionar diferentes tempos de fermentação e as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizando o planejamento experimental;

Estudar a influência dos diferentes tempos de estocagem sob congelamento, da temperatura e do pH na atividade da protease produzida através das análises de atividade enzimática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Bacillus*

O gênero *Bacillus* (família Bacillaceae), constitui as bactérias mais abundantes da rizosfera, estes são extremamente heterogêneos e fazem parte de um grupo muito diverso. Apresenta-se em forma de bastonete com extremidades retas ou arredondadas, tamanhos variáveis, gram-positivos, esporulados e aeróbios ou anaeróbios facultativos. Muitos *Bacillus* utilizam uma considerável escala de compostos orgânicos simples (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos), como substratos. Grande parte dos microrganismos desse gênero são mesófilos, com temperatura ótima entre 30 e 45°C, porém contém um número significativo de termofílicos que crescem a temperaturas de 65°C ou mais (Costa, 2017).

Dentre os microrganismos envolvidos na degradação de materiais celulósicos, as bactérias do gênero *Bacillus* têm merecido destaque em muitos estudos. Características como tolerância a altas temperaturas, crescimento rápido e ótima atividade enzimática fazem com que espécies deste gênero tenham alcançado espaço no mercado. Entre algumas das espécies com potencial celulolítico estão *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus licheniformis* (Fernandes, 2016).

Ratnadewi e colaboradores (2019) conseguiram produzir xilana, o principal componente da hemicelulose, a partir do resíduo de casca do café

usando solução de NaOH 12% m/v, para exposição da fibra, facilitando a degradação. A Xilana obtida da extração foi hidrolisada utilizando endo- β -1,4-xilanase de *Bacillus sp.*, com atividade enzimática de 23,6 U/mL para produzir XOS (Xilo-oligossacarídeos).

Aygan e Arikan (2011) conseguiram obter a enzima endoglucanase através do *Bacillus licheniformis* C108, tendo como pH ideal e a temperatura do processo fermentativo os valores 10,0 e 30°C, respectivamente. A enzima foi altamente estável até 100°C no pH 10,0 e manteve sua atividade completa durante 6h em concentrações que variavam de 7 a 10% de NaCl.

3.1.1 *Bacillus sp.* SMIA-2

Compreende bactérias que produzem enzimas extracelulares variadas, sendo proteases, amilases e celulases de grande importância industrial. As enzimas produzidas pelas diferentes espécies de *Bacillus* variam em tipo, em pH e temperatura, além de serem capazes de funcionar a altas temperaturas (Corrêa *et al.*, 2011).

Souza e Martins (2001) isolaram a bactéria c de amostras de solo coletadas no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. As colônias do microrganismo apresentaram bordas regulares e formas circulares, lisas, brilhantes e com elevação convexa e consistência cremosa após 24 horas de crescimento em ágar nutriente a 50°C. Os autores ainda analisaram os resultados da comparação de sequências de 16SrRNA, indicando que o isolado apresentou similaridade com as sequências de *Bacillus caldoolyolyticus* e *Bacillus sp.* AK1 e estes três organismos exibiram níveis de homologia de 94% nas sequências de DNA ribossomal.

Bernardo *et al.* (2020), revelaram que o SMIA-2 se agrupou com a cepa do tipo *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (u) com 100% de similaridade. Segundo esses autores, a análise do genoma do SMIA-2 mostrou que ele codifica inventários de genes que suportam a produção de enzimas, incluindo cinco genes para amilase, treze locais para o metabolismo da xilose, cinquenta e cinco locais associados à degradação de proteínas.

As células do microrganismo isolado apresentaram-se como bastonetes regulares, isolados em cadeias e foram identificadas como Gram-positivas,

apresentando 1,2 μm de largura e 5,3 μm de comprimento de dimensão na forma vegetativa. O crescimento ocorre em ampla faixa de pH variando de 6,5 a 9,0 e o crescimento ótimo em torno de pH 6,8. A temperatura ótima de crescimento foi em torno de 55°C e a máxima de 70°C (Cruz, 2017). Na Figura 1 podemos observar culturas do microrganismo contendo farinha da casca de maracujá.

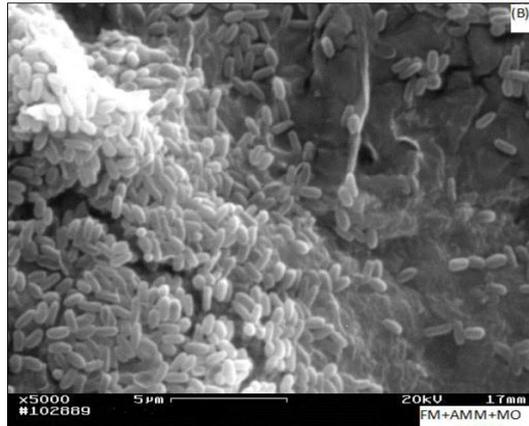


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura mostrando células de *Bacillus* sp. SMIA-2 (Cruz, 2017).

3.2 Produção de enzimas por *Bacillus* sp. MIA-2

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas, aceleram a velocidade das reações e atuam diminuindo a energia de ativação dessas nas células, sem alterar o equilíbrio químico. Podem ter sua atividade influenciada por alguns fatores como a temperatura, o pH e as enzimas reguladoras (Carvalho, 2019).

Segundo a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas são classificadas em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reação em que catalisam, sendo elas: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Cruz, 2017). A maior parte das enzimas utilizadas na indústria está dentro do grupo das

hidrolases, sendo que as proteases são as enzimas mais estudadas (Barbosa, 2015).

A unidade de uma enzima - Unidade Internacional (U) - é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato por minuto. É entendida como atividade por unidade de peso da proteína, onde:

$$1 \text{ Unidade Internacional (U)} = 1 \text{ micromol/minuto/litro} = \mu\text{mol/min/L}$$

Os processos biotecnológicos industriais têm obtido um grande progresso ao longo dos anos, devido principalmente à grande quantidade de produtos de interesse que podem ser gerados, como as enzimas. A partir desses processos, a produção de enzimas ganha foco, principalmente quando são produzidas por microrganismos (Silva, 2019).

Muito tem se pesquisado sobre a produção de enzimas microbianas, uma vez que possuem muitas vantagens como ampla diversidade bioquímica, menor custo de produção e por principalmente serem produtos naturais, o que não contribui para geração de subprodutos tóxicos ao meio ambiente (Cruz, 2017).

As enzimas podem ser secretadas por reações intra ou extracelulares, sendo que esta última ocorre com maior frequência. Por este motivo, as enzimas extracelulares são mais utilizadas pela indústria, elas são sintetizadas pela célula e secretadas pelo ribossomo próximo à membrana celular e transferidas para fora da célula (Fernandes, 2016).

A seleção de novos microrganismos produtores de enzimas é um grande obstáculo para comercialização desse produto. Dessa forma, escolher linhagens de microrganismos adequados, a partir de fontes diversificadas e de baixo valor agregado, como os resíduos agroindustriais, pode levar a uma maior produção enzimática, além de reduzir os custos de produção (Delatorre *et al.*, 2018).

O *Bacillus* sp. SMIA-2 consegue usar substâncias orgânicas de misturas complexas, geralmente encontradas em resíduos, e produzir simultaneamente uma variedade de enzimas hidrolíticas em um único processo fermentativo, como proteases, amilases, pectinases, xilanases e celulases, quando cultivado em culturas submersas (Costa, 2017).

Ladeira (2015) e colaboradores conseguiram produzir celulases por *Bacillus* sp. SMIA-2, cultivado a 50°C, em fermentação submersa contendo

bagaço de cana-de-açúcar. A máxima atividade da avicelase (0,83 U/mL) e da carboximetilcelulase (0,29 U/mL) foi alcançada após 120 h e 168 h de incubação.

Cruz (2017) conseguiu manter a estabilidade da avicelase e Carboximetilcelulase (CMCase) secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo 0,8% (m/V) de água de maceração de milho, 0,8% (m/V) de bagaço de cana-de-açúcar e 0,8% (m/V) de farinha da casca de maracujá, em função do tempo de estocagem a 3 °C por 154 dias, sendo: 100% de atividade da avicelase = 1,20 U/mL e 100% de atividade da CMCase = 0,50 U/mL.

Barbosa (2011) obteve resultados onde o *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu protease quando cultivado em solução (0,5% p/v) de soro de queijo em pó (SQP) suplementado com farinha da casca de maracujá (0,25% p/v) e atingiu níveis de 11,40 U/mL em 72 horas de fermentação.

Corrêa (2009), utilizando o *Bacillus* sp. SMIA-2 conseguiu com que o microrganismo crescesse e secretasse α -amilase e proteases quando cultivado em meio contendo amido solúvel como fonte de carbono, onde a atividade da α -amilase atingiu 325 U/mg de proteína em 36 horas de fermentação e a das proteases, 47 U/mg de proteína em 18 horas.

Costa (2017), utilizando um delineamento composto central rotacional (2^3), mostrou que as atividades de avicelases foram melhores quando *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em culturas submersas contendo bagaço de cana-de-açúcar 1,00% m/v, água de maceração de milho 1,00% m/v e farinha da casca de maracujá 0,322% por 168 horas, à temperatura de 50 °C, com atividade da avicelase variando de 0,820 a 1,974 U/mL.

Mansur (2011) produziu avicelase pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 quando cultivado em um meio de cultura constituído de celulose microcristalina (0,5%, p/v) como principal fonte de carbono, suplementado com água de maceração de milho (0,5% p/v), obtendo atividade máxima da enzima com 120 horas após a inoculação do microrganismo com níveis de 85,64 U/mL.

3.2.1 Proteases

As proteases são definidas pela capacidade de degradar ligações peptídicas e formam o grupo mais importante de enzimas, além de exercer um papel importante em diversos processos metabólicos nos organismos vivos (Duarte Neto, 2018).

Segundo Barbosa (2015), as proteases são classificadas em dois grupos principais: as exopeptidases, que iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou aminoácidos. E as endopeptidases, que têm preferência pela quebra de ligações internas à cadeia polipeptídica, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, formando peptídeos maiores.

Quando se trata do tipo de grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as exopeptidases são classificadas em três grupos: como serino proteases, cisteíno proteases e metalo proteases. As endopeptidases possuem um grupo além, incluindo as aspártico proteases (Corrêa, 2009).

Muitos pesquisadores obtêm sucesso ao produzir proteases através de diferentes fontes microbianas, que representam uma parcela de dois terços das proteases comercializadas em todo o mundo. Grande parte das proteases encontradas no mercado é de origem microbiana, devido ao seu alto rendimento, custo-benefício, espaço reduzido para cultivo e crescimento rápido, o que as tornaram adequadas para aplicação biotecnológica. Entre os diferentes produtores de proteases, *Bacillus* sp. são os principais microrganismos explorados comercialmente para produção de proteases (Razzaq *et al.*, 2019).

As proteases também podem ser classificadas quanto ao pH: ácidas (pH de 2,0 a 6,0), alcalinas (pH de 8,0 a 13,0) e neutras (pH 6,0 a 8,0). As proteases alcalinas (tipo serina) são amplamente estudadas, devido principalmente a sua ampla capacidade de ser aplicada na indústria farmacêutica, de alimentos, detergentes e tratamento de resíduos (Barbosa, 2015).

3.3 Processos fermentativos

Quando se trata da produção de enzimas microbianas, são utilizados basicamente dois tipos de processos, sendo eles: fermentação em estado sólido (FES) ou semi-sólido (FMSS) e fermentação submersa (FSM). As FES aplicam-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos com pouca atividade de água e a umidade desses meios geralmente não ultrapassa 70%, o que limita consideravelmente o número de microrganismos que são capazes de adaptar-se a este processo (Santos *et al.*, 2018).

Já na fermentação submersa, a biomassa microbiana é envolvida pelo meio de cultivo líquido. Geralmente, as enzimas e outros metabólitos microbianos

são produzidos por fermentação submersa devido à facilidade no controle do processo e na recuperação das enzimas (Fernandes, 2016).

Silva (2019) estudou a produção de enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e xilanolítica (Xilanase) a partir da fermentação semissólida (FSS) e submersa (FSM) utilizando como substrato o bagaço do sorgo sacarino e como fonte indutora o farelo de trigo, através do microrganismo metabolizador *Trichoderma reesei* LCB 48. O ensaio realizado com 60% de umidade e 50% de farelo de trigo na composição do substrato apresentou as maiores atividades enzimáticas para todas as enzimas estudadas. A atividade de Xilanase teve um pico de 548,7 U/mL em 48 horas, de CMCase um pico de atividade de 19,6 U/mL em 72 horas, e de FPase um pico de atividade de 2,1 U/mL em 96 horas do processo.

Carvalho e colaboradores (2018) utilizaram fungos filamentosos, tendo como substrato uma mistura composta por casca de café conilon *in natura* e bagaço de cana-de-açúcar. A composição de substrato de 50:50 apresentou as maiores atividades enzimáticas, sendo a máxima obtida no quarto dia de cultivo com 12,92 U/mL.

Magalhães *et al.* (2019), utilizando *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 para produção de proteases por fermentação submersa, obtiveram a maior atividade (190 U/mL \pm 1,33) em um meio contendo glicose 2% (p/v) + gelatina 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v).

Alguns fatores são determinantes para a produção enzimática, como: a temperatura, o pH, a composição do meio, o preparo do inóculo, a aeração, a agitação, as fontes de carbono e nitrogênio e a concentração de oxigênio dissolvido. Diante desses fatores, a FSM é preferencialmente utilizada para produção de enzimas a partir de bactérias, pois há melhor controle desses parâmetros importantes citados. Além desses fatores, a escolha do microrganismo adequado para o processo é essencial, pois uma mesma espécie microbiana pode secretar enzimas com características diferentes, além de produzir diversas enzimas simultaneamente (como celulases, amilases poligalacturonases, xilanases e proteases) em um mesmo meio de cultura (Carvalho, 2019).

3.4 Cultura do café e processamento

O café (*Coffea sp.*) é originário do continente africano e no Brasil temos café arábica (*Coffea arábica*) e café conilon (*Coffea canephora*) como as espécies mais cultivadas. Das mais de 124 espécies listadas, essas também são as mais consumidas em todo o mundo (Ferrão *et al.*, 2017).

A cultura possui grande importância no Brasil, posicionando o país como o maior produtor e exportador do mundo, devido a sua ampla capacidade produtiva, o que consequentemente gerou a queda da produção a nível mundial em 2021, já que o país possuiu uma participação 34,2% no atual ciclo. Há Cerca de 300 mil fazendas de café espalhadas por todo Brasil, além de contar com a maior variedade de marcas em todo o mundo (CONAB, 2021).

Segundo os dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Vietnã é o segundo principal produtor, com uma participação de 18,7%, apresentando um crescimento de 6,3% na produção do ciclo 2021/22. A Colômbia aparece na terceira posição, com uma participação de 8,6% e um leve declínio de 1,4% na produção da safra atual (USDA, 2021).

O (*Coffea arabica*) é uma planta adaptada a clima úmido com temperaturas amenas, originária da Etiópia. Nesta região, as plantas de café se encontram na faixa de altitude entre 1000 e 2000 metros onde as temperaturas médias variam entre 22,5° e 16,5° e as precipitações entre 1200 a 2000 mm (Mores, 2017).

Segundo dados da CONAB (2021), O volume total de café produzido de arábica e conilon no país foram de 47, 716 milhões de sacas de café beneficiado, sendo 31, 423 milhões de arábica e 16, 292 milhões de conilon, demonstrando uma diminuição total de 24,4% em comparação ao resultado do ano anterior (bienalidade positiva), onde o país obteve uma safra recorde, com 63, 077 milhões de sacas beneficiadas.

Os números recém-divulgados para a produção mundial de café para 2021/22 demonstraram uma queda de 8,5 milhões de sacas em relação ao ano anterior, para 167,5 milhões, devido principalmente ao efeito combinado do café arábica ter entrado em ano de bienalidade negativa (a produção apresenta queda devido a necessidade de recomposição vegetal), juntamente com fatores

climáticos que prejudicaram a safra. (USDA, 2021). A Figura 2 ilustra a produção total de café arábica e conilon, em anos de bienalidade positiva e negativa.

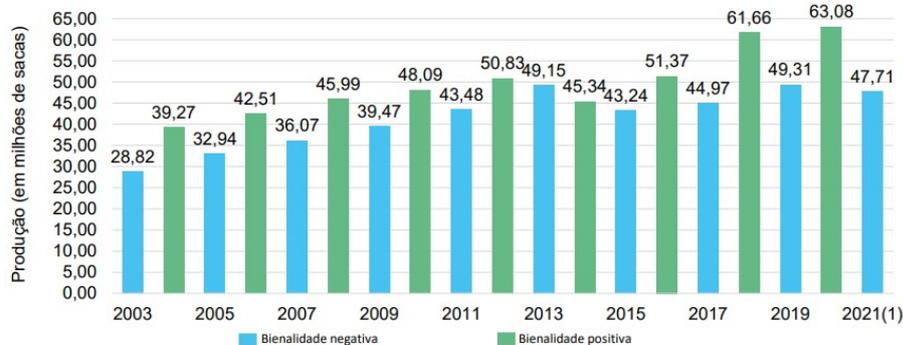


Figura 2. Produção global de café de 2003 a 2021 (CONAB, 2021).

O estado de Minas Gerais se destaca como o maior estado produtor de café do Brasil. Em 2021, a produção foi de 22,14 milhões de sacas de café beneficiado, sendo 36,1% menor que o volume obtido em 2020. O Espírito Santo, que possui produção predominantemente do tipo conilon, obteve um volume recorde na série histórica, alcançando cerca de 14,166 milhões sacas de café beneficiado, representando aumento de 1,5% em comparação à safra de 2020. O terceiro estado que mais produz é São Paulo, com um total de 4 milhões de sacas, seguido da Bahia com 3,4 milhões e Rondônia com 2,26 milhões, totalizando os cinco maiores estados produtores (CONAB, 2021).

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 3 (Durán *et al.*, 2016).

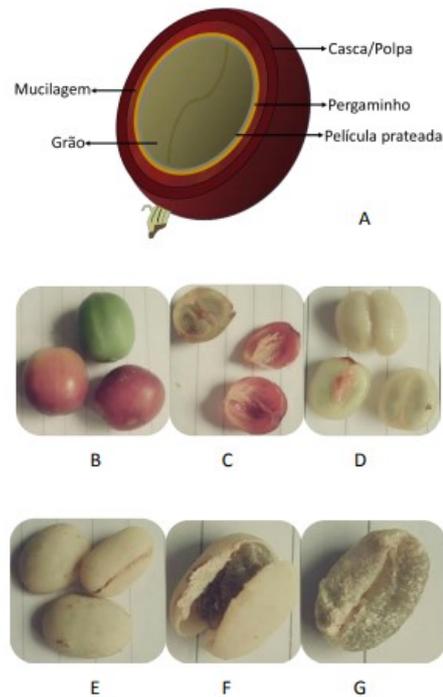


Figura 3. (A) Fruto de café e suas partes. Fotos dos frutos de cafés em: (B) diferentes estágios de maturação, (C) corte transversal do fruto com a casca removida, (D) grão com mucilagem, (E, F) grãos após secagem com o pergaminho e (G) grão cru com a película prateada (Durán *et al.*, 2016).

O processamento do café pode ser realizado por três métodos: o processo em via úmida e semi-úmida, que produzem o café descascado, despulpado e desmucilado; e por via seca, que produz o café natural (Dias, 2016).

Em via úmida, com colheita mecânica, os frutos do café são colhidos em diversos estágios de maturação, como observado na figura 2, desde verdes até maduros (cereja). Como os grãos verdes não atingiram o ponto de maturação fisiológica, estes se encontram menores que os frutos maduros. Durante a lavagem, os grãos são separados de acordo com os estágios de maturação, separando os cafés verdes, maduros e muito maduros (Durán *et al.*, 2016).

Durán (2016) e colaboradores ainda dizem que após esta separação, os frutos de café cereja passam pela remoção mecânica da casca, ainda em contato direto com a água e através de equipamentos de desintegração. Até esta etapa tem-se o processo conhecido como semi-úmido. Este método de processamento é basicamente uma variação do processamento via úmida. Nesse caso, os frutos

são descascados, despulpados ou desmucilados e o processo de fermentação ocorrem diretamente no terreiro (Dias, 2016).

Na via úmida, ocorrerá em seguida a remoção da casca e da polpa, seja de forma mecânica ou por fermentação controlada empregando a biota natural, produzindo o café denominado pergaminho. Esse método necessita de um grande volume de água para as etapas de despulpamento e remoção da mucilagem, despendendo cerca de 6.000 L/h para os equipamentos (Durán *et al.*, 2016).

O estado de Minas Gerais processa cerca de 85% do seu café por via seca. Essa metodologia dá origem a um café com uma composição e características sensoriais diferentes do café processado pelos métodos semi-seco ou úmido, com qualidade inferior. Na última década, os produtores de café das regiões sul e central passaram a processar o café via fermentação úmida para alcançar mercados mais exigentes e agregar valor ao produto (Freitas, 2018).

No método por via seca, os frutos são secos na sua forma íntegra, logo após a colheita, em terreiro aberto ou em secador mecânico, gerando o café em coco. Esta via de processamento é conhecida por produzir cafés pouco exigentes quanto a qualidade do fruto/bebida, pois inclui grãos em diferentes estágios de maturação, ou seja, não há preocupação de seleção na colheita. Os diferentes tipos de processos influenciam o teor dos constituintes químicos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e metabólitos secundários presentes nos grãos crus (Durán *et al.*, 2016).

A Figura 4 ilustra os diferentes processos pós-colheita dos frutos: via seca, úmida e semi-úmida.

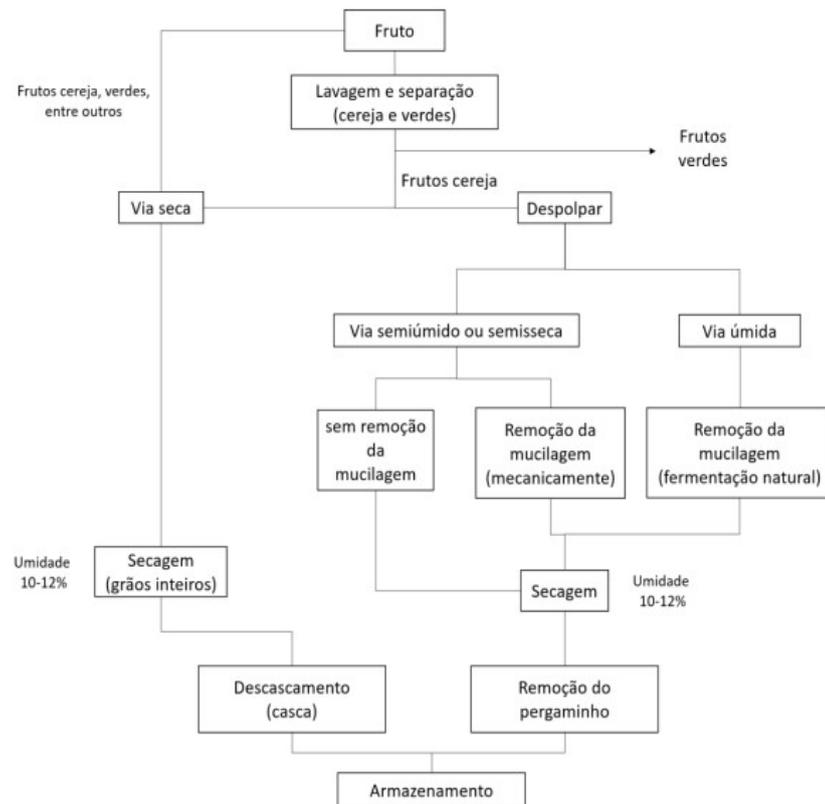


Figura 4. Fluxograma do processamento pós-colheita de café (Durán *et al.*, 2016).

No beneficiamento, a quantidade de casca que é produzida, constitui aproximadamente 50% da massa, ou seja, para adquirir um quilo de grãos de café beneficiados, necessita-se de cerca de dois quilos de café em coco para a via seca. Quando a despolpa é realizada por via úmida, o resíduo inicial é composto por polpa e casca, e após a secagem dos grãos, são retirados os pergaminhos, que representam 12% da massa dos frutos secos colhidos, fazendo com que sejam gerados ainda mais resíduos (Baqueta *et al.*, 2017). Cerca de 180 kg de cascas são liberados de uma tonelada de frutos frescos de café (Blinová *et al.*, 2017). A Figura 5 ilustra os diferentes resíduos gerados dentro dos tipos de processamentos do café.



Figura 5. Subprodutos: a (casca); b (polpa); c (película prateada) e d (pó de café usado) (Blinová *et al.*, 2017).

3.5 Resíduos agroindustriais gerados pela cultura do café

O acentuado crescimento das atividades agroindustriais e agropecuárias no Brasil contribuiu efetivamente para o desenvolvimento do país. Em contrapartida, essas atividades também são geradoras de uma grande quantidade de resíduos e estes têm se acumulado no meio ambiente, possuindo um elevado potencial poluidor (Moura, 2016). Em razão disso, o aproveitamento de resíduos é de extrema importância, necessitando que sejam realizadas pesquisas que visem alternativas adequadas para seus destinos (Meneghelli *et al.*, 2016).

Com a inovação biotecnológica na área de tecnologia de fermentações e produção de enzimas, novas concepções estão sendo desenvolvidas, como a possível aplicação desses resíduos como fonte de nutrientes em bioprocessos para a obtenção de produtos com valor associado (Dias, 2016).

Dentro das atividades agroindustriais, destaca-se a cafeicultura, que movimenta de forma representativa a economia do país. A atividade de lavagem e despulpa de frutos do cafeeiro, necessária para a redução do custo de secagem e a melhoria da qualidade de bebida, é geradora de grandes volumes de resíduos líquidos e sólidos (como a casca e o pergaminho). Esses resíduos são ricos em material orgânico e inorgânico, que se dispostos no meio ambiente sem tratamento correto, podem causar a destruição da flora e da fauna, além de comprometer a qualidade da água e do solo (Moura, 2016). Na safra de 2018/2019, o Brasil produziu cerca de 61,6 milhões de sacas de café, gerando mais de 673 mil toneladas de resíduos sólidos (Holzmann e Dallamuta, 2020).

A casca de café é um resíduo potencial para ser utilizado como subproduto na obtenção de produtos com valor agregado, seja na indústria farmacêutica, de cosméticos, de alimentos ou na agricultura (Dias, 2016). O pergaminho representa entre 28,7 a 38,8% da casca do café, são gerados no mínimo 8,7 milhões de sacas de pergaminho (Santos, 2017).

Baqueta (2016) diz que a composição das cascas de café é constituída pelo teor de umidade e quantidade de fibras, açúcares totais, lipídeos, cinzas, proteína, taninos e de cafeína. Em base seca, a composição química da casca de café apresenta 57,8% de carboidratos, 9,2% de proteínas, 2% de lipídeos, 1,3% de cafeína, 4,5% de taninos e 12,4% de pectina.

Há uma grande variação nas análises da casca de café de modo geral, estas podem estar relacionadas à ausência de fracionamento destas cascas, sendo que quanto maior a presença de pergaminho, maior a queda de qualidade nutricional da casca de café (Moura, 2016). Outro fator que pode interferir na composição química da casca de café encontra-sena variedade da planta, tipo de solo, manejo da cultura, o processamento e sua eficiência, apesar dessa variação não ser tão significativa (Baqueta, 2016).

Dentre as aplicações que podem ser utilizadas, podemos citar a casca de café na indústria de alimentos, como matéria-prima para produção de Xilo-oligossacarídeos que tem potencial de agir como um prebiótico (Ratnadewi *et al.*, 2019); na produção de cogumelo sou compostagem e como um ingrediente funcional, usando a casca de café moída como alimento suplementar para uso em smoothies, granolas e sucos (Blinová *et al.*, 2017).

Na agricultura, possui aplicabilidade como fonte de matéria orgânica, na produção de frangos como cama de aviário e alimentação de animais (Baqueta *et al.*, 2017). A casca de café também é um substrato útil para a produção de fungos, leveduras e enzimas, devido à sua alta quantidade de açúcares fermentescíveis (Blinová *et al.*, 2017). A Tabela 1 mostra as informações sobre os constituintes presentes no resíduo pergaminho.

Tabela 1. Teores médios dos constituintes do pergaminho em (%) e em ppm (mg/kg)

Composição	Pergaminho
Holocelulose (%)	75,97
Celulose (%)	41,20
Lignina insolúvel (%)	20,49
Lignina solúvel (%)	1,50
Hemiceluloses (%)	34,77
Extrativos (%)	7,00
Cinza (%)	1,37
Matéria seca (MS) (%)	93,00
Tanino condensado (%)	0,70
Nitrogênio (%)	0,59
P (%)	0,020
K (%)	0,38
Ca (%)	0,14
Mg (%)	0,03
S (%)	0,06
B (ppm)	3,90
Cu (ppm)	7,00
Mn (ppm)	17,50
Zn (ppm)	7,10
Fe (ppm)	137,60

Fonte: Brum (2007).

Como observado na tabela 1, o pergaminho possui um percentual elevado de lignina, fazendo com que seja interessante aplicar algum tratamento que possibilite melhorar a suscetibilidade da celulose e lignina à ação das enzimas.

Devido à estrutura insolúvel da lignina, alguns processos podem ser aplicados em substratos de materiais lignocelulósicos, como o tratamento alcalino. O uso de hidróxido de sódio tem sido aplicado em algumas pesquisas, a fim de se obter um aumento da produção de enzimas através da hidrólise enzimática dos substratos tratados (Aguiar, 2010).

Esses tratamentos tendem a remover a lignina e hemicelulose da biomassa e promover maior reatividade da fibra, diminui o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, o que acarreta em aumento na digestibilidade do complexo enzimático e conversão em açúcares fermentescíveis.

Uma prática relatada para o reaproveitamento da grande quantidade de pergaminho gerada no processamento do café seria a adubação de lavouras. Porém, o resíduo possui uma relação C/N alta, acima de 65 e valores dessa relação acima de 30 fazem com que os microrganismos optem por mobilizar o nitrogênio disponível no solo. Por conter altos teores de lignina, celulose e hemicelulose, suas características se assemelham a madeira, podendo então ser utilizado para produção de carvão ativado (Brum, 2007).

As porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênios encontrados na composição do pergaminho é muito similar a encontrada em outros materiais celulósicos, como observado na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagens de Carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio para materiais celulósicos

	C	H	N	O
Polpa do café	38,7%	5,4%	1,6%	54,3%
Pergaminho do café	44,0%	5,4%	0,7%	49,9%
Bagaço de cana	46,7%	5,9%	0,9%	46,5%
Palha de cana	43,4%	5,7%	1,2%	49,6%
Madeira	48,1%	6,0%	0,7%	51,8%
Palha de milho	45,8	4,5%	0,8%	48,9%

Fonte: Brum (2007).

Como o pergaminho é um resíduo gerado após a despulpa do café, através da via úmida de beneficiamento, ele acaba por não ter um destino correto, já que não é separado juntamente com a casca, como é feito no processamento por via seca. Dessa maneira, o resíduo não é devolvido para a lavoura como um adubo orgânico e torna-se muito importante o desenvolvimento de pesquisas que visem sua utilização, já que possui poucas aplicabilidades.

Os resíduos podem conter substâncias reutilizáveis de alto valor agregado, possíveis de serem convertidas em produtos comerciais, através de tecnologias adequadas. Devido a isso, saber quais compostos estão presentes e suas respectivas concentrações, permitem agregar valor comercial a estes resíduos (Baqueta *et al.*, 2017).

3.6 Planejamento experimental

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística adequada ao planejamento experimental. É considerada bastante satisfatória em relação aos métodos convencionais existentes, quando se trata de um número reduzido de experimentos e a busca da interação entre os fatores que possibilitam a construção de novos modelos (Carvalho, 2019).

Partindo do princípio de delineamentos experimentais mais complexos é que surgiu o DCCR. Este método foi desenvolvido por Box e Wilson (1951) para estudo de funções polinomiais de resposta na indústria, onde o erro experimental é bem pequeno, e as condições do experimento são controláveis. Nesse caso, geralmente se repete apenas um tratamento, relacionado ao ponto central. Posteriormente, ele foi adaptado a outros ramos da Ciência. Dentre os delineamentos padrões, o Delineamento Composto Central (DCC) é considerado um delineamento muito eficiente, pois possui características interessantes para quando se procura respostas com um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e pode ser realizado sequencialmente (Mateus *et al.*, 2001).

A busca por produtos e processos otimizados, que reduzem custos e tempos operacionais, têm levado a uma enorme procura por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia DCCR consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas com diversas variáveis independentes. É uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, que tem sido usada com grande êxito na modelagem de diversos processos industriais (Mattietto e Matta, 2012).

Jung (2015) e colaboradores avaliaram a produção de celulases por *Penicillium brasilianum* KUEB15 utilizando palha de milho como substrato. Utilizando a técnica do DCCR, os pesquisadores conseguiram obter uma atividade de celulase de 1,18 U/mL.

Costa (2017) realizou a aplicação de diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar tratado (BCT), água de maceração de milho (AMM) e farinha da casca de maracujá (FCM), usando um delineamento composto central rotacional (2^3) para produção de avicelases e encontrou maiores atividades da

enzima quando o *Bacillus sp.* SMIA-2 foi cultivado a BCT 1,00% m/v, AMM 1,00% m/v e FCM 0,322% por 168 horas, à temperatura de 50 °C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do resíduo

O pergaminho de café utilizado como substrato neste trabalho foi coletado na Fazenda Santo Antônio, que possui 1.000 hectares, localizada na latitude: 20°39'51.4"S e longitude: 42°31'11.2"W. É referência na produção de grãos especiais de café arábica despulpado, cultivado a 1170 metros de altitude, nascida de Araponga, na Região das Matas de Minas Gerais.



Figura 6. Café da fazenda Santo Antônio secando em terreiro após beneficiamento via úmida.

O pergaminho foi obtido após o beneficiamento dos grãos por via úmida, secos em terreiros suspensos. Após a coleta, o resíduo foi transportado para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e armazenado sob temperatura de refrigeração à 8°C.

4.2 Tratamento hidrotérmico em meio básico do pergaminho do café

O tratamento hidrotérmico juntamente com a aplicação do hidróxido de sódio (NaOH) foi realizado em parte do material coletado (cerca de 150 g). Esse tratamento tem o intuito de expor as fibras do pergaminho, aumentando a superfície de contato e o acesso do microrganismo a essa fonte de carboidrato, possibilitando um aumento na produção enzimática.

A metodologia consistiu em pré-tratar o pergaminho de café, utilizando uma solução de NaOH 4%, de acordo com o descrito por Pena (2011).

Pesou-se 12,5 gramas de pergaminho, introduzindo em um frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL da solução de NaOH, que foi levado para a autoclave a uma pressão de 1,2 Kgf/cm² durante 30 minutos.

Após o tratamento, o pergaminho foi filtrado e lavado com água destilada, verificando o pH da água de lavagem e quando necessário, neutralizado com uma solução de HCl 0,1%.

Após atingir um valor de pH próximo ao neutro (7), a mistura foi filtrada novamente e o material retido foi levado à estufa de secagem (TECNAL® TE-393), a 70°C até obter massa constante.

4.3 Caracterização físico-química do pergaminho do café

A caracterização química foi realizada tanto para o pergaminho tratado NaOH a 4%, quanto para o pergaminho sem tratamento.

4.3.1 Umidade

O teor de umidade foi realizado pelo método gravimétrico, em triplicata, submetendo-se as amostras ao aquecimento em estufa de secagem (TECNAL® TE-393), a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em g/ 100g de amostra (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

4.3.2 Proteína

Determinou-se através do método de Kjeldahl, em triplicata. A metodologia é dividida em três etapas: digestão, destilação e titulação. O resultado foi expresso em g/ 100g da amostra integral. (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

4.3.3 Lipídios totais

A análise de lipídios foi realizada em triplicata, pela técnica de Bligh e Dyer (1959). A metodologia consistiu em pesar aproximadamente 2g da amostra em tubos de ensaio, adicionar 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e água destilada. Em seguida agitou-se e adicionou-se 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio a 1,5%. Após a decantação, retirou-se da camada inferior aproximadamente 15 mL e adicionou-se 1g de sulfato de sódio. O material foi filtrado e transferido para outro tubo de ensaio, em seguida adicionou-se 5,0 ml da fração clorofórmica em placas de petri para serem secas em estufa à aproximadamente 105°C por quatro horas.

4.3.4 Resíduo mineral fixo (Cinzas)

A perda de peso do material foi determinada através da submissão à incineração em forno mufla microprocessado QUIMIS ® a 550°C. As medidas foram feitas em triplicata, e as pesagens até peso constante. A perda de peso fornece o teor de matéria orgânica, e a quantidade de cinzas foi determinada em g/ 100g. (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

4.3.5 Carboidratos

A determinação de carboidratos na amostra foi efetuada por diferença entre 100 (percentual total) e o somatório dos percentuais encontrados para umidade, cinzas, fração protéica e lipídios (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

4.4 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi uma bactéria termofílica, *Bacillus sp.* SMIA-2, isolada por Souza e Martins (2001) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos,

do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a partir de amostras coletadas do solo da região de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

O microrganismo foi mantido em placas de Petri em um meio contendo: (peptona 20 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 10 g.L⁻¹; ágar bacteriológico 20 g.L⁻¹ e 1 L de água destilada) previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C, mantido sob temperatura de refrigeração (7 °C).

4.4.1 Preparo do inóculo

O microrganismo foi inoculado em placas de Petri contendo meio TSY previamente esterilizado (triptona, 20 g.L⁻¹; NaCl, 10 g.L⁻¹; extrato de levedura, 10 g.L⁻¹; ágar, 20 g.L⁻¹ e água destilada, 1 L). As placas foram incubadas em estufa QUIMIS (modelo Q 315 D26) a 50°C por 18 horas. Após este período, 5 mL do meio descrito acima foram transferidos das placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril .

Estas células foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de crescimento (meio de cultura específico de cada fermentação descritos nos itens 4.5, 4.6 e 4.7) e incubadas por 18 horas a 50 °C em incubadora “shaker” rotatório (*Thermo Forma Orbital Shaker*, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Este meio foi denominado inóculo.

O esquema geral para o crescimento do microrganismo, preparo do inóculo e processo fermentativo está representado na Figura 7.

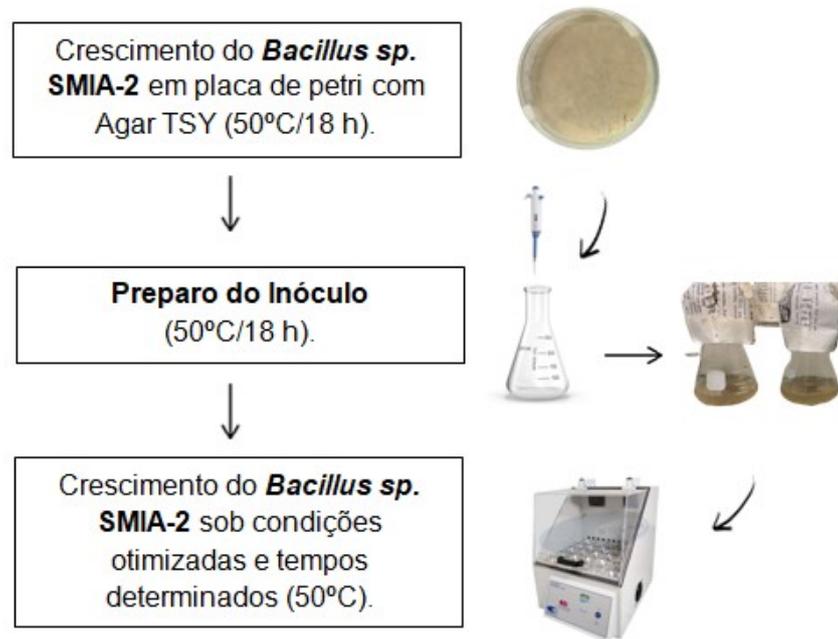


Figura 7. Crescimento do microrganismo e preparo do inóculo.

4.4.2 Meio de cultura

O meio de cultura basal utilizado para a produção de enzimas foi composto (g.L⁻¹ de água destilada) por: 0,3% de amido; (peptona, 1,0 g.L⁻¹); (KCl, 0,3 g.L⁻¹); (K₂HPO₄, 0,87 g.L⁻¹); (MgSO₄, 0,5 g.L⁻¹); (NaCl, 10,0 g.L⁻¹); e traços de metais (CaCl₂, 2,2x10⁻³ ; ZnO, 2,5x10⁻³ ; FeCl₃.6H₂O, 18 2,7x10⁻² ; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻² ; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴ ; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴ , H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴ ; Na₂MoO₄, 1,0x10⁻³ g.L⁻¹).

4.5 Estudo da produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e pergaminho de café *in natura* a 0,3%.

O processo fermentativo em estudo foi dividido em dois tratamentos, realizados em duplicata. Os tratamentos descritos na tabela 3 foram adicionados ao meio basal descrito no item 4.4.2.

Tabela 3. Tratamentos relacionados à produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e *in natura* a 0,3%

Tratamentos	Meio de cultivo
1	0,3% PCN; 0,3% AMM e 0,3% WP.
2	0,3 PCT; 0,3% de AMM e 0,3% de WP.

PCN: Pergaminho do café *in natura*; PCT: Pergaminho do café tratado; WP: Whey Protein; AMM: Água de maceração de milho.

O pH final do meio foi ajustado com NaOH 1,0M para próximo de 7,5. Posteriormente o meio de cultivo foi esterilizado por autoclave a vapor a 121°C, 1 atm durante 15 minutos.

Os meios de cultura contendo 50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, foram inoculados assepticamente com 5mL de inóculo descrito no item 4.4.1. Esse volume foi suficiente para que a absorbância do branco e do tempo zero obtivesse uma diferença entre 0,2 a 0,3 nm, assegurando o crescimento do microrganismo no meio. Em seguida, os frascos foram novamente incubados em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm, à temperatura de 50 °C, por 168 horas.

Após o fim do processo fermentativo foram realizadas as análises de atividade para as seguintes enzimas: protease, CMCase, avicelase, xilanase e amilase.

4.6 Estudo da produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e *in natura* a 0,3% - 0,5% e 10%.

O processo fermentativo em estudo foi dividido em seis tratamentos, realizados em duplicata. Os tratamentos descritos na tabela 4 foram adicionados ao meio basal descrito no item 4.4.2.

Tabela 4. Tratamentos relacionados à produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado com NaOH 4% e *in natura* a 0,3%, 0,5% e 10%

Tratamentos	Meio de cultivo
1	0,3% PCN; 0,3% AMM e 0,3% WP.
2	0,5% PCN; 0,3% AMM e 0,3% WP.
3	10% PCN; 0,3% AMM e 0,3% WP.
4	0,3% PCT; 0,3% AMM e 0,3% de WP.
5	0,5% PCT; 0,3% AMM e 0,3% WP.
6	10% PCT; 0,3% AMM e 0,3% WP.

PCN: Pergaminho do café *in natura*; PCT: Pergaminho do café tratado; WP: Whey Protein; AMM: Água de maceração de milho.

Os pHs finais do meio foram ajustados com NaOH 1,0M para 7,5. Posteriormente o meio de cultivo foi esterilizado por autoclave a vapor a 121°C, 1 atm durante 15 minutos.

Os meios de cultura contendo 50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, foram inoculados assepticamente com 5mL de inóculo descrito no item 4.4.1. Esse volume foi suficiente para que a absorbância do branco e do tempo zero obtivesse uma diferença entre 0,2 a 0,3 nm, assegurando o crescimento do microrganismo no meio. Em seguida, os frascos foram novamente incubados em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm, à temperatura de 50 °C, por 48 horas.

Após o fim do processo fermentativo foi realizada a análise de atividade enzimática para a protease.

4.7 Estudo da produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho de café *in natura* e diferentes fontes de nitrogênio.

O processo fermentativo em estudo foi dividido em quatro tratamentos, realizados em duplicata. Os tratamentos descritos na tabela 5 foram adicionados ao meio basal descrito no item 4.4.2.

Tabela 5. Tratamentos relacionados à produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho de café *in natura* e diferentes fontes de nitrogênio

Tratamentos	Meio de cultivo
1	0,5% de WP + 0,5% AMM
2	2,0% AMM
3	4,0% Sulfato de amônio
4	2,0% Uréia

WP: Whey Protein; AMM: Água de maceração de milho.

Os pHs finais dos meios foram ajustados com NaOH 1,0M para 7,5. Posteriormente o meio de cultivo foi esterilizado por autoclave a vapor a 121°C, 1 atm durante 15 minutos.

Os meios de cultura contendo 50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, foram inoculados assepticamente com 5mL de inóculo descrito no item 4.4.1. Esse volume foi suficiente para que a absorbância do branco e do tempo zero obtivesse uma diferença entre 0,2 a 0,3 nm, assegurando o crescimento do microrganismo no meio. Em seguida, os frascos foram novamente incubados em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm, à temperatura de 50 °C, por 168 horas.

Após o fim do processo fermentativo foram realizadas as análises de atividade para a protease, CMCase, avicelase, xilanase, amilase e poligaracturonase. Optou-se por utilizar o pergaminho do café *in natura*, juntamente com a água de maceração para dar seguimento ao planejamento experimental.

4.8 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental.

A otimização das condições do meio de cultivo foi elaborada seguindo delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo (2²), com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios, durante 48 horas de fermentação, à temperatura de 50° C, operando a 150 rpm. As variáveis

independentes estudadas foram selecionadas, com base nos experimentos compreendidos entre os itens 4.5 a 4.7, descritos na tabela 6.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA $p < 0,05$), para análise estatística e após a análise do F calculado foi possível gerar um modelo e uma superfície de resposta, utilizando o programa Statistica, versão 5.0.

As respostas avaliadas após 36 e 48 horas de fermentação foram: atividade enzimática da protease (U/mL), biomassa (g/L) e açúcares redutores totais (g/L).

Tabela 6. Planejamento experimental com os níveis das variáveis independentes: concentração do pergaminho de café *in natura* e da água de maceração de milho

Ensaio	Variáveis independentes			
	Valores codificados		Valores reais	
	Concentração do pergaminho	Concentração da água de maceração de milho	Concentração do pergaminho (%)	Concentração da água de maceração de milho (%)
1	-1	-1	0,93	0,73
2	1	-1	4,47	0,73
3	-1	1	0,93	4,27
4	1	1	4,47	4,27
5	-1,41	0	0,20	2,5
6	1,41	0	5,2	2,5
7	0	-1,41	2,7	0
8	0	1,41	2,7	5
9	0	0	2,7	2,5
10	0	0	2,7	2,5
11	0	0	2,7	2,5

4.9 Estudo das condições do meio de cultivo e atividade enzimática em fermentação submersa por *Bacillus sp.* SMIA-2 utilizando pontos centrais e pontos críticos do planejamento experimental.

Com os resultados obtidos no DCCR apresentados no item 4.8, uma nova fermentação foi realizada, seguindo a mesma metodologia de planejamento experimental apresentada neste item e mesmas variáveis independentes, porém

adicionando-se dois novos tratamentos (pontos críticos gerados pelo programa), que seguem na tabela 7.

Tabela 7. Tratamentos relacionados aos pontos centrais e pontos críticos

Tratamentos	Concentração (%)
1 (ponto central 36 h):	2,7% PCN e 2,5% de AMM;
2 (ponto central 48 h):	2,7% PCN e 2,5% de AMM
3 (ponto crítico 36):	1,56% PCN e 3,15% de AMM;
4 (ponto crítico 48h):	1,56% PCN e 3,15% de AMM;
5 (ponto crítico 36h):	3,08% PCN e 2,28% de AMM .
6 (ponto crítico 48h):	3,08% PCN e 2,28% de AMM .

PCN: Pergaminho de café in natura; AMM: Água de maceração de milho.

A fermentação ocorreu no tempo de 48 horas, à temperatura de 50° C e 150 rpm, totalizando 13 ensaios. Os resultados da análise de atividade enzimática da protease foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

4.10 Determinação da Biomassa Seca

A biomassa microbiana foi estimada através da determinação do peso seco da massa de células. Uma amostra de 10 ml dos meios fermentados foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min. A massa de células decantada foi lavada com água destilada e novamente centrifugada por 2 vezes. A secagem foi realizada em estufa da marca TECNAL®TE-393, a 60°C até peso constante. O primeiro sobrenadante foi reservado para as demais análises.

4.11 Determinação de açúcares redutores totais

Uma alíquota do sobrenadante obtido pela centrifugação das amostras foi utilizada para determinação de açúcares redutores totais (ART) através da metodologia Somogy-Nelson (Somogy, 1945). O processo consiste em pipetar 1,0 mL da amostra em um tubo de ensaio e adicionar 2,0 mL do reagente SN-I. Agitar

e aquecer em banho maria (em ebulição) por 6 minutos. Resfriar o tubo em banho de gelo por 5 minutos e em seguida adicionar 2,0 mL de SN-II, agitar e deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Por fim, adicionar 25 mL de água destilada e fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste em substituir 1,0 mL da amostra ou padrão por água destilada e realizar o teste.

4.12 Ensaio enzimáticos

4.12.1 Obtenção das enzimas

As amostras contendo as enzimas foram centrifugadas, após o cultivo, em uma centrífuga (HERMLEZ 382K, Wehingen, Alemanha), a 4500 rpm por 30 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células que foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

4.12.2 Atividade enzimática da carboximetilcelulase

A atividade da enzima CMCase foi determinada por meio da quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma Aldrich) (GHOSE, 1987). Uma mistura que contém 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 1% (m/V) em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubada a 70 °C durante 10 minutos. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta foi mantida em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorbância medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm (MILLER, 1959).

Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de CMCase foi definida como 1 µmol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio, usando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

4.12.3. Atividade enzimática da Avicelase

A atividade da enzima Avicelase foi determinada pela quantificação da liberação de açúcares redutores da hidrólise de avicel (Sigma Aldrich) (GHOSE, 1987). Uma mistura contendo 0,5 mL de solução de avicel 1% (m/V) em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foram incubadas a 70 °C durante 10 minutos. Transcorrido este período, 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi adicionado à mistura e esta mantida em ebulição em banho-maria durante 10 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e a absorbância medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm (MILLER, 1959).

Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a avicel em suspensão. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, no entanto sem o extrato livre de células. Uma unidade (U) de atividade de Avicelase foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor equivalente liberado por minuto sob as condições de ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

4.12.4 Atividade enzimática da Xilanase

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo Miller (1959). Uma mistura contendo 0,5 mL de solução do extrato enzimático, 1 mL de solução de xilana 0,5% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,5) e 0,5 mL do mesmo tampão foram incubados em banho-maria a 70°C durante 30 minutos. Após este período, a reação foi paralisada adicionando-se à mistura 1,0mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Em seguida, o material foi fervido por 10 minutos e logo resfriado em banho de gelo por 5 minutos. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda a 540 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém a adição de 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,5) no lugar do extrato enzimático. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de xilose por minuto por mL da enzima, sob as condições de

ensaio acima descritas, usando uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,05 a 0,17 mg/mL.

4.12.5 Atividade enzimática da α -amilase

A atividade amilolítica foi determinada segundo Miller (1959) através da quantificação de açúcares redutores (glicose). Uma mistura, contendo 0,5 ml do extrato enzimático, 1,0 ml de solução de amido em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) e mais 0,5 ml do mesmo tampão, foi incubada a 90 °C por 10 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada com 1 mL da solução de DNS (Miller, 1959). Em seguida, a mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e logo após resfriada em banho de gelo por 5 minutos. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda de 540 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém com a adição de 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do extrato enzimático. Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto a partir do amido solúvel, nas condições do ensaio, utilizando uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,014 a 0,3 mg/mL.

4.12.6 Atividade enzimática da Poligalacturonase

A atividade da poligalacturonase foi determinada de acordo com o descrito por Soares et al., (1999). Uma mistura, contendo 0,5 mL do extrato enzimático com 1,0 mL de solução de pectina cítrica 0,5%, dissolvida em tampão Glicina-NaOH (0,5 M e pH 8,5), juntamente com mais 0,5 mL desse mesmo tampão foi incubada a 70°C por 10 minutos. Decorrido esse tempo, a reação foi paralisada com 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e em seguida mantida em ebulição em banho-maria por 10 minutos. Por fim, foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos e a coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda de 540 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém com a adição de 1,0 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,5) no lugar do extrato enzimático. Uma unidade (U) de atividade da poligalacturonase foi definida como a

quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina cítrica, nas condições do ensaio, usando uma curva padrão de ácido galacturônico nas concentrações de 0,10 a 1,0 mg/mL.

4.12.7 Atividade enzimática da protease

A atividade da protease foi verificada através da quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (Johnvesly e Naik, 2001). Para tanto, utilizou-se como substrato uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão Tris HCl (0,05 M, pH 8,5). A reação enzimática foi realizada adicionando o extrato enzimático ao substrato sob incubação em banho-maria a 70°C por 10 minutos. Paralisou-se a reação pela adição de TCA e centrifugou-se (15.000g, 5 minutos, 4°C) em centrífuga Hermele Z 382K. O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio contendo uma solução de NaOH (1 N). O branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento para as amostras, porém o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos. A atividade da protease foi calculada conforme a Equação 1.

$$Protease(U.mL)=(AbsA - AbsB)*60*(tti)*(VtVe) \quad (1)$$

Onde:

AbsA– AbsB= diferença entre absorbância da amostra e a absorbância do branco;

60= tempo em minutos para uma hora de reação;

t= tempo da reação por minuto;

ti= tempo de incubação;

Vt= volume total da reação;

Ve= volume do extrato enzimático.

4.12.8 Determinação da proteína

A dosagem de proteína no sobrenadante foi realizada em triplicata e determinada pelo método de Lowry modificado por Peterson (1977), utilizando-se solução de albumina de soro bovino (BSA) como um padrão.

Os reagentes utilizados na análise foram os seguintes: seguintes: Reagente A (carbonato de sódio, 20 g/L; NaOH 2 M, 50 mL/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2 g/L), B ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g/L) e C (50 partes do Reagente A e 1 parte do Reagente B).

A mistura de reação foi constituída de 40 μL da amostra, 360 μL de água destilada e 2000 μL da solução C. Essa mistura ficou em repouso por 15 minutos, e em seguida adicionou-se 200 μL do reagente de Folin. A mistura foi agitada e em seguida deixada em repouso por mais 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém a amostra foi substituída por água destilada. A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 750 nm.

4.13 Efeito do pH na atividade da protease

A atividade da protease foi determinada conforme procedimento de ensaio padrão descrito no item 4.12.7, porém variando o pH do tampão utilizado para o preparo da solução de azocaseína 0,2% (p/v).

Os valores de pH variaram entre (6,5 - 7,5 - 8,5 - 9,5), utilizando os tampões respectivos de Tris-HCl 0,2 M e para o pH 10,5 foi utilizado dois tampões diferentes, Glicina-NaOH 0,2 M e Tris-HCl 0,2 M.

4.14 Efeito da temperatura na atividade da protease

O efeito da temperatura sobre atividade da protease foi analisado realizando o procedimento de ensaio padrão descrito no item 4.12.7, porém, variando as temperaturas de incubação do banho-maria. Estes valores foram de 25 - 47,5 - 70 e 92,5°C. A atividade da protease foi determinada utilizando solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão com pH encontrado no item 4.12 que permitiu a maior atividade da enzima.

4.15 Atividade e estabilidade da protease em estocagem sob congelamento

Foi analisada a atividade e estabilidade da enzima em condições de congelamento em tempos determinados. Para isso, o material foi acondicionado em congelador, em temperatura de 3°C e retirada amostras do extrato bruto nos tempos (0, 15, 30, 45 e 60 dias), totalizando um período de dois meses.

Para determinar a atividade da protease, o frasco contendo o extrato foi descongelado à temperatura ambiente de acordo com cada tempo estipulado, e a atividade da protease foi determinada conforme o procedimento descrito no item 4.12.7., utilizando as condições ótimas de pH e temperatura, encontrados nos testes anteriores nos itens 4.13 e 4.14.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do pergaminho do café

A caracterização do pergaminho envolveu a determinação dos seus teores de umidade, cinzas, proteína, nitrogênio, lipídios, carboidratos totais e matéria seca. Na tabela 8 apresentam-se os resultados obtidos (média \pm desvio padrão) para os componentes determinados para as amostras, expressos em %.

Tabela 8. Caracterização química do pergaminho tratado com NaOH 4% e do pergaminho *in natura*

Componente (%)	Pergaminho tratado	Pergaminho <i>in natura</i>
Umidade	7,07 \pm 0,22	10,34 \pm 0,52
Proteína	0,52 \pm 0,08	4,37 \pm 0,34
Nitrogênio	0,08 \pm 0,44	0,68 \pm 0,05
Cinzas	2,51 \pm 0,26	1,64 \pm 0,23
Lipídios	0,79 \pm 0,68	1,69 \pm 0,9
Carboidratos	89,08 \pm 0,26	81,94 \pm 0,61
Matéria seca	92,92 \pm 0,22	89,08 \pm 0,52

Os resultados de composição do pergaminho *in natura* corroboram com os valores obtidos por Brum (2007) para matéria seca (93%), nitrogênio (0,59%) e cinzas (1,37%). Quando comparado ao nível da casca como um todo, Pandey e

colaboradores (2000) obtiveram em suas pesquisas de composição valores em torno de 11,98% de umidade, 31,86% de fibras, 26,50% de açúcares totais, 1,50% de lipídeos, 6,03% de cinzas, 11,70% de proteína. Como o pergaminho ainda é um resíduo pouco estudado e aplicado, diferente da casca, alguns materiais são escassos.

Observou-se pelos valores de proteína e carboidratos, antes e depois do tratamento com hidróxido de sódio, que foi possível alterar a composição química do material. Antes do tratamento, o pergaminho possuía em torno de 4,37% de proteína, e após o tratamento, apenas 0,52%. Conseqüentemente os valores de carboidratos totais foram alterados, mais elevados para o pergaminho tratado, confirmando a efetividade do tratamento com hidróxido de sódio 4% nessa mudança.

Vale ressaltar que os carboidratos não foram analisados de forma individual, como celulose, lignina e hemicelulose. No tratamento com hidróxido de sódio, esses três constituintes da biomassa são fracionados, podendo haver maior disponibilidade e suscetibilidade da celulose ao ataque de enzimas (Pena, 2011).

5.2 Estudo da produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado e *in natura* a 0,3%.

Levando em consideração a utilização de resíduos agroindustriais como substrato em processos fermentativos, principalmente com o objetivo de redução de custos, essa fermentação foi realizada com o intuito de observar o comportamento do pergaminho do café como fonte de carbono no processo de produção de enzimas, a fim de se determinar as condições ótimas para se obter a máxima secreção por *Bacillus sp.* SMIA-2.

Além do pergaminho *in natura*, também foi utilizado o pergaminho tratado com hidróxido de sódio, caracterizados no item 5.1. O pergaminho é um resíduo constituído de celulose, hemicelulose e lignina. A organização e interação entre essas três estruturas na parede celular da planta promovem uma propriedade natural de recalcitrância à degradação biológica.

O pré-tratamento utilizado em materiais lignocelulósicos é necessário devido às características morfológicas que apresentam em sua estrutura, o que dificulta o acesso dos agentes enzimáticos e impede a ação eficiente das

celulases. O pré-tratamento promove o rompimento da parede celular, bem como diminui a cristalinidade da celulose e a associação com a lignina, resultando em uma conversão mais eficiente da celulose em glicose, um monossacarídeo que é utilizado pelos microrganismos durante o processo fermentativo (Pena, 2011).

A fermentação ocorreu de acordo com a metodologia descrita no item 4.5 e os resultados da produção enzimática utilizando o pergaminho *in natura* e o pergaminho tratado podem ser observados nas tabelas 9 e 10, respectivamente. Foram retiradas amostras nos tempos de: 12 – 24 – 36 – 48 – 72 – 96 – 120-144 e 168 horas, para análise de atividade enzimática após o fim da fermentação. De acordo com os dados, a única enzima produzida em níveis satisfatórios foi a protease.

Tabela 9. Produção de enzimas em meio contendo pergaminho do café *in natura*

Tempo de fermentação	Enzimas (U/mL)				
	Avicelase	CMCase	Amilase	Xilanase	Protease
12	0,0838	n.d	0,0242	n.d	4,052
24	0,0483	0,0062	0,0188	n.d	8,500
36	0,0251	0,0005	0,0179	n.d	9,976
48	0,0408	n.d	0,0051	n.d	9,012
72	0,0966	0,0092	n.d	n.d	7,580
96	0,0423	n.d	n.d	n.d	7,532
120	0,0229	0,0039	n.d	n.d	6,816
144	0,0348	0,0008	n.d	n.d	6,616
168	0,0501	0,0003	n.d	n.d	6,104

N.d: Não detectável.

Tabela 10. Produção de enzimas em meio contendo pergaminho do café tratado com hidróxido de sódio a 4%

Tempo de fermentação	Enzimas (U/mL)				
	Avicelase	CMCase	Amilase	Xilanase	Protease
12	n.d	n.d	0,0351	n.d	3,260
24	n.d	n.d	0,0561	n.d	3,588
36	n.d	n.d	0,0483	n.d	7,392
48	n.d	n.d	0,0612	n.d	8,492
72	n.d	n.d	0,0616	n.d	7,056
96	n.d	n.d	0,0560	n.d	7,032
120	n.d	n.d	0,0517	n.d	6,660
144	0,0112	n.d	0,0431	n.d	5,584
168	0,0108	0,0013	0,0475	n.d	6,156

N.d: Não detectável.

Diante do exposto, o pergaminho tratado não possibilitou um aumento na produção de enzimas, principalmente de celulasas (avicelase e CMCase), motivo pelo qual optou-se por pré-tratar o resíduo. Porém, a protease foi a enzima produzida em quantidades satisfatórias em ambas as fermentações, mais especificamente nos tempos de 36 e 48 horas.

Barbosa (2015) realizou uma fermentação com meio contendo 0,5% de farinha da casca de maracujá e 0,5% de água de maceração de milho e obteve resultados de atividade máxima de avicelase de *Bacillus sp.* SMIA-2 em torno de 1,6 U/mL com 72 horas de fermentação e de CMCase de 0,9 U/mL em 24 horas de fermentação.

Barbosa (2011) produziu protease em meio contendo solução com 0,5% de soro de queijo em pó, suplementado com farinha da casca de maracujá a 0,25% e atingiu níveis de 11,40 U/mL com máximo em 72 horas. Outras enzimas como celulasas, poligalacturonases, xilanases e amilases produzidas por *Bacillus sp.* SMIA-2 são proteínas, que podem ser inibidas pelas proteases. Esse fato pode explicar a ausência de produção dessas outras enzimas no meio, visto que o resíduo pergaminho do café *in natura* possui uma concentração de proteína em torno de 4,3%.

Cruz (2017) obteve uma produção de 1,20 U/mL de avicelase e 0,50 U/mL de CMCase em meio de fermentação contendo bagaço de cana-de-açúcar

como fonte de celulose, farinha da casca de maracujá como cosubstrato e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio.

As mais altas atividades obtidas para protease sugerem que a composição do meio de cultivo utilizado e as condições da fermentação favorecer uma maior secreção dessa enzima pelo microrganismo, visto que o resíduo possui quantidades significativas de proteína. Desse modo, a segunda fermentação avaliou apenas a produção de protease pelo *Bacillus* sp. SMIA-2.

5.3 Estudo da produção enzimática por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho tratado e *in natura* a 0,3% - 0,5% e 10%.

Após os resultados obtidos no item 5.2, optou-se por utilizar nessa fermentação o pergaminho tratado e não tratado, variando suas concentrações, de acordo com a metodologia descrita no item 4.6. O objetivo foi verificar se o aumento da quantidade de resíduo no meio acarretaria em uma maior produção enzimática. Os resultados da fermentação se encontram na tabela 11.

Observou-se que o meio contendo 0,5% de pergaminho *in natura* permitiu maior produção de protease, em ambos os tempos. Os resultados variaram de 11,54 U/mL em 36 horas a 14,11 U/mL em 48 horas.

Estes resultados são ainda superiores aos encontrados por Barbosa e colaboradores (2014), que utilizaram o *Bacillus* sp. SMIA-2 em um meio contendo 0,25% de farinha da casca de maracujá e 0,5% de soro de leite, onde o microrganismo produziu 11,6 U/mL na máxima atividade da protease.

Tabela 11. Produção de proteases em meio contendo pergaminho do café *in natura* e pergaminho de café tratado com NaOH 4%

Tempo (horas)	Protease (U/mL)					
	Concentração (PCN)			Concentração (PCT)		
	0,3%	0,5%	10%	0,3%	0,5%	10%
36	10,092	11,544	11,428	7,872	8,46	8,796
	10,536	11,988	12,328	5,868	7,728	7,932
	10,692	11,832	11,284	8,448	8,748	8,172
48	11,508	13,728	12,068	7,704	12,62	10,624
	12,252	13,932	12,164	6,540	12,012	11,416
	12,18	14,112	13,128	7,86	13,452	11,656

PCN: Pergaminho do café *in natura*; PCT: Pergaminho do café tratado;

Não há um meio definido para a produção de proteases para diferentes estirpes microbianas, considerando o fato de que cada microrganismo possui um requerimento físico e nutricional individual para a produção dessa enzima. Por esse motivo, a elaboração de um meio específico, utilizando nutrientes de baixo custo é de suma importância, sendo necessária a realização de testes preliminares para atingir concentrações ideais do substrato selecionado (Barbosa 2011; Ladeira *et al.*, 2010).

Como o meio de crescimento que promoveu a maior secreção de protease pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 foi aquele contendo o pergaminho não tratado a 0,5%, a fermentação seguinte utilizou esse tratamento como fonte carbono.

5.4 Estudo da produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio de cultura contendo pergaminho de café *in natura* e diferentes fontes de nitrogênio.

Após os resultados obtidos no item 5.3, optou-se nessa fermentação por fixar a fonte de carbono (pergaminho não tratado a 0,5%) e variar a fonte de nitrogênio, de acordo com a metodologia descrita no item 4.7. Retiraram-se amostras nos tempos de 36, 48 e 168 horas para as análises enzimáticas de Protease, CMCcase, avicelase, xilanase, amilase e poligalacturonase. Os resultados podem ser observados na tabela 12.

Tabela 12. Análise enzimática em amostras de fermentação com variação da fonte de nitrogênio

Enzimas (U/mL)	Tempo (horas)	0,5% WP + 0,5% AMM	2,0% AMM	4,0% Sulfato de amônio	2,0% Uréia
Protease	36	8,168	10,056	1,256	0,268
Protease	48	11,9440	13,7640	1,488	1,18
Protease	168	11,4240	13	0,8240	0,1440
Avicelase	168	n.d	n.d	n.d	n.d
CMCase	168	n.d	n.d	n.d	n.d
Amilase	168	n.d	n.d	n.d	n.d
Xilanase	168	0,0058	n.d	n.d	n.d
Poligalacturonase	168	0,1475	0,0117	n.d	n.d

N.d: Não detectável; WP: Whey Protein; AMM: Água de maceração de Milho.

Diante do exposto, os tratamentos que possibilitaram a maior atividade de proteases foram aqueles contendo 0,5% whey + 0,5% AMM, com produção compreendida entre 8,16 a 11,94 U/mL; e 2,0% de AMM, com produção de 10,05 a 13,76 U/mL.

Em comparação aos dois tratamentos que promoveram a maior produção de protease, aquele contendo apenas o pergaminho e 2,0% AMM produziu quantidades mais satisfatórias da enzima. Este meio foi selecionado pelo fato de permitir a maior produção de protease, porém, por também utilizar dois resíduos, podendo diminuir o custo referente ao substrato. Em consequência disso, a fermentação seguinte utilizou o pergaminho como fonte de carbono e a água de maceração de milho como fonte de nitrogênio.

5.5 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por *Bacillus* sp. SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental.

5.5.1 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por *Bacillus* sp. SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental em 36 horas de fermentação.

Observou-se nas fermentações preliminares, que a concentração de 0,5% de pergaminho do café juntamente com 2% de água de maceração de milho foram as melhores fontes encontradas para a produção de proteases nesse experimento. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2² e

posterior construção das superfícies de resposta foram utilizados para avaliar os efeitos das concentrações de pergaminho do café *in natura* (PCN) e água de maceração de milho (AMM) sobre a biomassa, açúcares redutores totais (ART) e atividade da protease, a fim de determinar as condições ótimas para se obter a máxima secreção dessa enzima por *Bacillus* sp. SMIA-2.

A Tabela 13 apresenta a Matriz do DCCR para a atividade da protease (U/mL), biomassa (g/L) e ART (g/L) no tempo de fermentação estudado.

Tabela 13. Matriz do DCCR 2² para a atividade da protease, biomassa e ART com os valores reais e codificados das variáveis independentes

Ensaio	PCN (%m/V)	AMM (%m/v)	Protease (U/mL)	Biomassa (g/L)	ART (g/L)
1	0,93 (-1)	0,73 (-1)	6,26	0,857	0,013
2	4,47 (1)	0,73 (-1)	9,73	1,571	0,029
3	0,93 (-1)	4,27 (1)	6,14	4,000	0,087
4	4,47 (1)	4,27 (1)	8,75	12,714	0,107
5	0,20 (-1,41)	2,5 (0)	9,38	1,143	0,040
6	5,2 (1,41)	2,5 (0)	8,55	11,429	0,082
7	2,7 (-1,41)	0 (-1,41)	8,52	4,143	0,022
8	2,7 (0)	5 (1,41)	6,30	4,286	0,118
9	2,7 (0)	2,5 (0)	12,16	4,429	0,044
10	2,7 (0)	2,5 (0)	11,95	4,571	0,037
11	2,7 (0)	2,5 (0)	11,05	4,000	0,036

PCN: Pergaminho do café *in natura*; AMM: Água de maceração de milho; ART: Açúcares redutores totais. Condição de Fermentação: Temperatura – 50° C; Agitação – 150 rpm; Tempo de fermentação de 36 horas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, a atividade da protease variou de 6,26 U/mL a 12,16 U/mL, concentrando as maiores produções dentro dos pontos centrais, na concentração de 2,7 % de PCN e 2,5% de AMM.

A significância estatística dos resultados relacionados à produção de protease foi verificada pela ANOVA através do F calculado para a produção da protease (Tabela 14). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para a produção da enzima foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$), e a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de (83, %), concluindo que houve um bom ajuste aos dados experimentais.

Tabela 14. ANOVA para a resposta da atividade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	47,23169	5	9,446338	5,751048071
Resíduo	8,21271	5	1,642542	
Total	55,4444	10		

% variação explicada (R^2) = 0,83; F_{tab} (5%) = 5,05

A Tabela 15 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do modelo de atividade da protease. Os parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração de pergaminho e de água de maceração de milho em 5% de significância ($p < 0,05$), demonstrando que a concentração das fontes afetou a atividade da enzima.

Tabela 15. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para atividade da protease, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 36 horas de fermentação, conforme DCCR

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite inferior	Limite superior
Média	11,72667	0,00018	9,82458	13,62875
X₁	0,61313	0,233976	-0,55165	1,77791
X₁²	-1,49658	0,039136	-2,88295	-0,11021
X₂	-0,52753	0,296862	-1,69231	0,63725
X₂²	-2,27258	0,008378	-3,65895	-0,88621
X₁*X₂	-0,21500	0,750858	-1,43225	1,43225

X₁: Pergaminho do café; X₂: AMM.

Observa-se que o modelo ajustado fica caracterizado pela equação (Equação 2).

$$Y \text{ (U/mL)} = 11,723 + 0,613 x_1 - 1,497 x_1^2 - 0,528 x_2 - 2,273 x_2^2 - 0,215 x_1 \cdot x_2$$

(2)

Onde X_1 é a concentração de pergaminho do café e X_2 a concentração de AMM. Após a análise dos resultados, a superfície de resposta para a variável atividade da protease no tempo de 36 horas foi construída e os resultados ilustrados na figura 8 em função da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho.

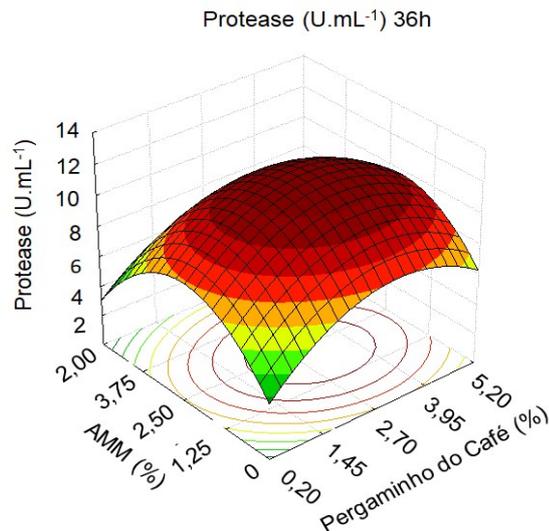


Figura 8. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na secreção de protease por *Bacillus* sp. SMIA-2 em 36 horas de fermentação.

Na Figura 6 pode-se observar que com o aumento simultâneo da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho até os pontos centrais, temos uma maior atividade da protease. Conseqüentemente, diminuindo ou aumentando as concentrações de pergaminho e água de maceração de milho fora dos pontos centrais, há menor produção de proteases.

Com base neste estudo, observa-se que as quantidades de pergaminho do café e água de maceração de milho presentes no meio de cultura foram determinantes para se obter uma maior produção da protease por *Bacillus* sp. SMIA-2. A condição ótima para atividade máxima da protease ocorreu com a concentração do pergaminho e da água de maceração de milho nos níveis centrais estudados.

Souza (2012) obteve maior atividade da protease com 36 horas de fermentação, onde utilizou amido solúvel, proteínas do soro de leite e água de maceração de milho e alcançou níveis de 14,91U/mL.

Hadjidj *et al* (2018) utilizando um meio contendo leite desnatado, conseguiu exibir a maior atividade de protease extracelular secretada por *Bacillus licheniformis* linhagem K7A (cerca de 12.500 U/mL) após 24 h de incubação em meio otimizado.

A análise da determinação de proteínas para o ponto central nesse tempo de 36 horas foi realizada. O resultado corresponde a uma média de 10,6 (U/mg-¹) de proteína. De acordo com as pesquisas de Gentil (2014), o *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em meio de cultura líquido complementado com proteína do soro de leite e água de maceração de milho a 50°C, e o melhor tempo para a produção de proteases foi de 36 horas (27,94 U/mg-¹).

Quanto aos dados relacionados à biomassa, os valores variaram de 0,857 a 12,714 g/L. A significância estatística dos resultados foi verificada pela ANOVA através do F calculado (Tabela 16). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para a biomassa no tempo de 36 horas foi significativo pelo teste F ($p < 0,10$), e a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de (81%), concluindo que houve um bom ajuste aos dados experimentais.

Tabela 16. ANOVA para a resposta da biomassa de *Bacillus* sp. SMIA-2 em 36 horas de fermentação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	118,4373	5	23,68746	4,130246621
Resíduo	28,6756	5	5,73512	
Total	55,4444	10		

% variação explicada (R^2) = 0,81; F_{tab} (10%) = 3,453.

A Tabela 17 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do modelo de biomassa. Os parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração de pergaminho e de água de maceração de milho em 10% de significância ($p < 0,10$).

Tabela 17. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para biomassa, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 36 horas de fermentação, conforme DCCR

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo (90%)	
			Limite inferior	Limite superior
Média	4,333333	0,025838	1,54724	7,119426
X₁	2,996846	0,016572	1,29072	4,702972
X₁²	0,860119	0,432363	-1,17058	2,890815
X₂	1,710968	0,085439	0,10484	3,517094
X₂²	-0,175595	0,868510	-2,20629	1,855101
X₁*X₂	2,000000	0,155731	-0,41283	4,412827

X₁: Pergaminho do café; X₂: AMM.

Observa-se que o modelo ajustado fica caracterizado pela equação (Equação 3).

$$Y \text{ (g/L)} = 4,333 + 2,997x_1 + 0,860x_1^2 + 1,811x_2 - 0,176x_2^2 + 2x_1*x_2 \quad (3)$$

Onde X₁ é a concentração de pergaminho do café e X₂ a concentração de AMM. Após a análise dos resultados, a superfície de resposta para a variável biomassa no tempo de 36 horas foi construída e os resultados ilustrados na figura 9 em função da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho.

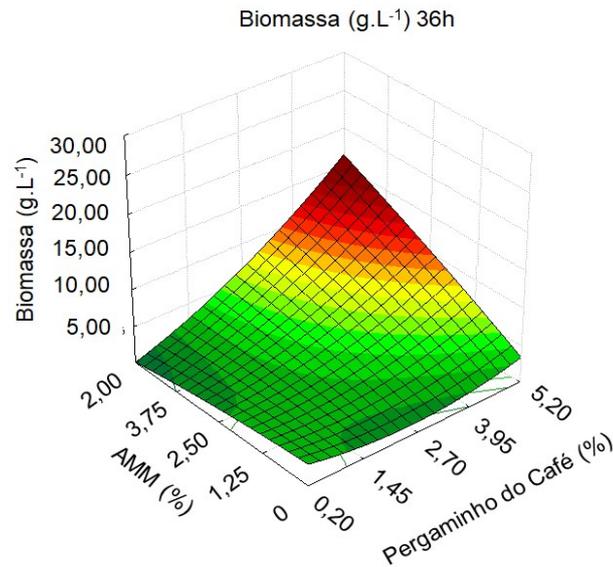


Figura 9. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na produção de biomassa por *Bacillus* sp. SMIA-2 em 36 horas de fermentação.

Na Figura 9, pode-se observar que com o aumento simultâneo da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho, maior é a produção de biomassa, mais quantidade de microrganismo presente no meio. As quantidades de pergaminho do café e de água de maceração de milho presentes no meio de cultura foram determinantes para se obter um aumento do crescimento por *Bacillus* sp. SMIA-2.

Quanto aos dados de açúcares redutores totais, os valores variaram de 0,013 a 0,118 g/L. A significância estatística foi verificada pela ANOVA através do F calculado (Tabela 18). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para concentração de açúcares redutores no tempo de 36 horas foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$), e a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de (98%), concluindo que houve um ótimo ajuste aos dados experimentais.

Tabela 18. ANOVA para a resposta da concentração de açúcares redutores em 36 horas de fermentação

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	0,012963	5	0,0025926	25,21984436
Resíduo	0,000514	5	0,0001028	
Total	0,013477	10		

% variação explicada (R^2) = 0,98; F_{tab} (5%) = 5,05.

A Tabela 19 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do modelo de açúcares redutores totais. Os parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração de pergaminho e de água de maceração de milho em 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 19. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para concentração de açúcares redutores totais, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 36 horas de fermentação, conforme DCCR

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite inferior	Limite superior
Média	0,039775	0,000138	0,029993	0,049556
X₁	0,011980	0,003642	0,005990	0,01790
X₁	0,009336	0,019975	0,002206	0,016465
X₂²	0,035874	0,000021	0,029884	0,041864
X₂²	0,013475	0,004638	0,006346	0,020605
X₁*X₂	0,000836	0,809762	-0,007635	0,099307

X₁: Pergaminho do café; X₂: AMM.

Observa-se que o modelo ajustado fica caracterizado pela equação (Equação 4).

$$Y \text{ (g/L)} = 0,0398 + 0,012x_1 + 0,009x_1^2 + 0,036x_2 + 0,013x_2^2 + 0,001x_1 \cdot x_2$$

(4)

Onde X_1 é a concentração de pergaminho do café e X_2 a concentração de AMM. Após a análise dos resultados, a superfície de resposta para a variável concentração de açúcares redutores totais, no tempo de 36 horas, foi construída e os resultados ilustrados na figura 10 em função da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho.

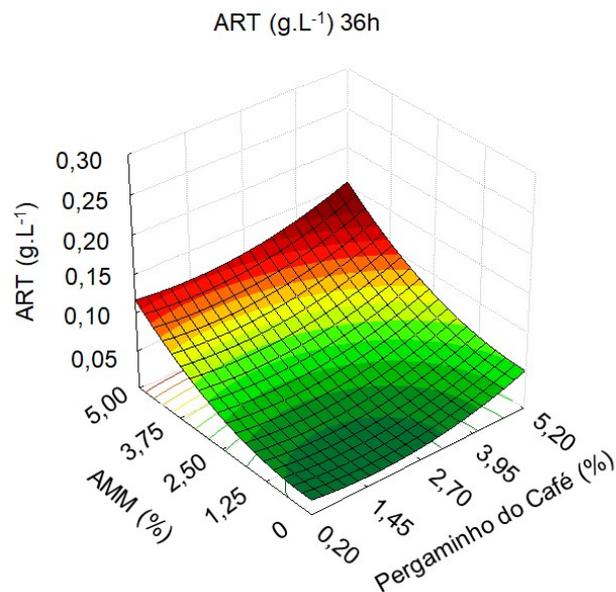


Figura 10. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na concentração de açúcares redutores totais (ART) em 36 horas de fermentação.

Na Figura 10, pode-se observar que o aumento da concentração de pergaminho no meio proporciona maior quantidade de açúcares redutores. Porém, essa relação foi ainda mais forte com a AMM, que também incrementou a concentração de açúcares, de forma que quanto mais AMM, maior a quantidade de ART.

Esses resultados demonstram que a AMM também estava auxiliando como fonte de carbono e não somente de nitrogênio no meio. Esse fato pode ser explicado, pois a água de maceração de milho é um resíduo que contém vários carboidratos e proteínas. Açúcares redutores como glicose e frutose são predominantes, assim como aminoácidos livres, minerais e vitaminas. Por esse

motivo, os açúcares podem ter se apresentado em excesso no meio, não sendo totalmente utilizados para transformação em produto.

Em conclusão, ao observar a relação entre os três fatores analisados, podemos inferir no intervalo estudado que ocorreu um crescimento microbiano (pelo aumento de biomassa) e que este pode ser justificado pelo substrato que estava presente em condições satisfatórias no meio, demonstrados pela elevada concentração de ART. Apesar deste crescimento, a produção enzimática encontrou sua maior produtividade dentro do intervalo estudado (pontos centrais) durante as 36h, ocorrendo mesmo com um excesso microbiano ou de substrato. Ou seja, mesmo que fosse adicionado ainda mais substrato no meio, a produção enzimática não seria maior.

5.5.2 Estudo das condições do meio de cultivo utilizado na fermentação submersa para produção enzimática por *Bacillus sp.* SMIA-2 através da metodologia de planejamento experimental em 48 horas de fermentação.

Seguindo o mesmo delineamento descrito no item 5.5.1, avaliaram-se os efeitos das concentrações de pergaminho do café e água de maceração de milho (AMM) sobre a biomassa, açúcares redutores totais (ART) e atividade da protease em 48 horas de fermentação. A Tabela 20 apresenta a Matriz do DCCR para a atividade da protease (U/mL), biomassa (g/L) e ART (g/L) no tempo de fermentação estudado.

Tabela 20. Matriz do DCCR 2² para a atividade da protease, biomassa e ART com os valores reais e codificados das variáveis independentes

Ensaio	PCN (%m/V)	AMM (%m/v)	Protease (U/mL)	Biomassa (g/L)	ART (g/L)
1	0,93 (-1)	0,73 (-1)	5,61	1,857	0,012
2	4,47 (1)	0,73 (-1)	8,60	5,429	0,034
3	0,93 (-1)	4,27 (1)	9,91	4,714	0,061
4	4,47 (1)	4,27 (1)	7,93	7,571	0,093
5	0,20 (-1,41)	2,5 (0)	9,63	1,714	0,038
6	5,2 (1,41)	2,5 (0)	10,32	12,714	0,081
7	2,7 (-1,41)	0 (-1,41)	5,90	3,571	0,027
8	2,7 (0)	5 (1,41)	6,88	7,714	0,081
9	2,7 (0)	2,5 (0)	9,86	8,143	0,045
10	2,7 (0)	2,5 (0)	10,64	3,429	0,047
11	2,7 (0)	2,5 (0)	10,13	9,571	0,052

PCN: Pergaminho do café *in natura*; AMM: Água de maceração de milho; ART: Açúcares redutores totais. Condição de Fermentação: Temperatura – 50° C; Agitação – 150 rpm; Tempo de fermentação de 48 horas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 17, a atividade da protease variou de 5,616 a 10,644 U/mL. A significância estatística dos resultados relacionados foi verificada pela ANOVA através do F calculado para a produção da protease (Tabela 21). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para a produção da enzima no tempo de 48 horas foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$), e a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de (97%), concluindo que houve um ótimo ajuste aos dados experimentais.

Tabela 21. ANOVA para a resposta da atividade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 em 48 horas de fermentação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	31,47795	5	6,29559	31,47763522
Resíduo	1,00001	5	0,200002	
Total	55,4444	10		

% variação explicada (R^2) = 0,97; F_{tab} (5%) = 5,05.

A Tabela 22 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do modelo de atividade da protease. Os

parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração de e água de maceração de milho, e a interação da concentração do pergaminho e a AMM em 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 22. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para atividade da protease, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 48 horas de fermentação, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite inferior	Limite superior
Média	10,21333	0,00000	9,54961	10,87006
X₁	0,24783	0,177804	-0,15862	0,65428
X₁	-0,15992	0,434258	-0,64368	0,32385
X₂²	0,62916	0,010540	0,22271	1,03560
X₂²	-1,95192	0,000143	-2,43568	-1,46815
X₁*X₂	-1,24100	0,002609	-1,81580	-0,066620

X₁: Pergaminho do café; X₂: AMM.

Observa-se que o modelo ajustado fica caracterizado pela equação (Equação 5).

$$Y(\text{U/mL}) = 10,213 + 0,248x_1 - 0,160x_1^2 + 0,629x_2 - 1,952x_2^2 - 1,241x_1x_2 \quad (5)$$

Onde X₁ é a concentração de pergaminho do café e X₂ a concentração de AMM. Após a análise dos resultados, a superfície de resposta para a variável atividade da protease no tempo de 48 horas foi construída e os resultados ilustrados na figura 11 em função da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho.

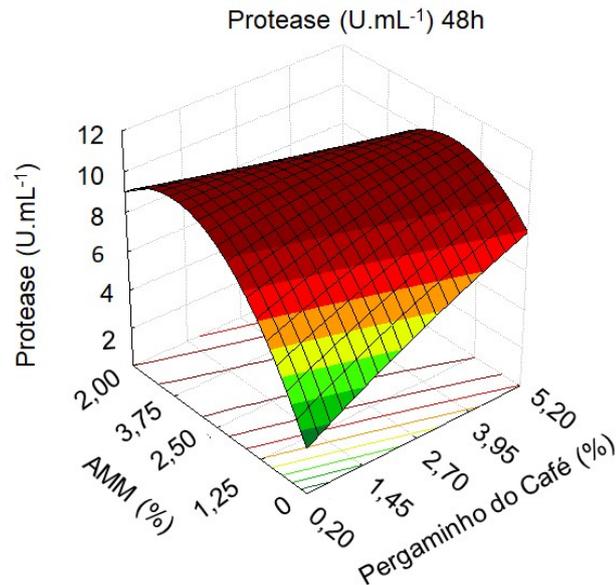


Figura 11. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na secreção de protease por *Bacillus sp.* SMIA-2 em 48 horas de fermentação.

Na Figura 11 pode-se observar que com o aumento simultâneo da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho, temos uma maior atividade da protease. Porém, em elevadas concentrações de pergaminho, a concentração de AMM deve se concentrar entre os pontos centrais, para alcançar maior atividade da enzima.

Barbosa (2011) observou a atividade da protease de *Bacillus sp.* SMIA-2 em meio contendo soro de queijo (0,5%, p/v) suplementado com a farinha de maracujá (0,15%, p/v) e metais. A atividade máxima da protease foi de 16,2 U/mL com 48 horas de incubação.

Quanto aos dados de biomassa, os valores variaram de 1,857 a 12,714 g/L. A significância estatística dos resultados relacionados à biomassa foi verificada pela ANOVA através do F calculado (Tabela 23). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado de produção de biomassa não foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação foi de 82%.

Tabela 23. ANOVA para a resposta da biomassa de *Bacillus* sp. SMIA-2 em 48 horas de fermentação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	93,1137	5	18,62274	4,615072363
Resíduo	20,176	5	4,0352	
Total	113,29	10		

% variação explicada (R^2) = 0,82; F_{tab} (5%) = 5,05.

Pela Tabela 24, pode-se observar os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a medida da concentração de biomassa. Nota-se que o parâmetro linear de concentração de pergaminho do café foi significativo ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 24. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para biomassa, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 48 horas de fermentação, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite inferior	Limite superior
Média	4,333333	0,025838	1,54724	7,119426
X₁	2,996846	0,016572	1,29072	4,702972
X₁	0,860119	0,432363	-1,17058	2,890815
X₂²	1,710968	0,085439	0,10484	3,517094
X₂²	-0,175595	0,868510	-2,20629	1,855101
X₁*X₂²	2,000000	0,155731	-0,41283	4,412827

X₁: Pergaminho do café; X₂: AMM.

Na Figura 12 está demonstrado o gráfico de valores preditos e observados para a variável resposta da biomassa (g/L).

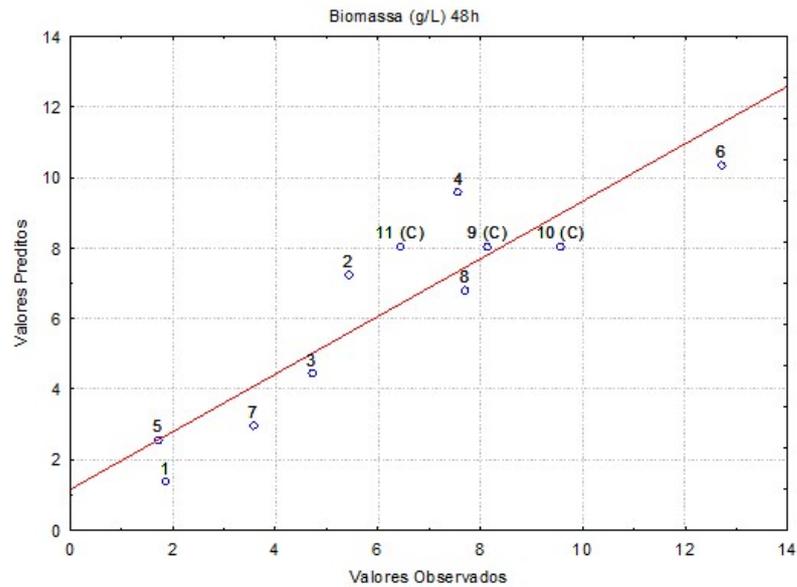


Figura 12. Valores preditos e observados para a variável biomassa em função de diferentes concentrações de pergaminho e AMM, conforme DCCR 2².

A qualidade do ajuste pode ser avaliada através do gráfico de valores preditos versus valores observados. Quanto mais os dados se ajustam à reta de identidade, melhor é a qualidade do ajuste. Logo, como os valores da concentração de biomassa se apresentaram dispersos em relação à reta de identidade, não foi possível gerar um modelo e construir as superfícies de resposta para esta variável dependente.

Na Figura 13 está ilustrado o diagrama de Pareto para a concentração biomassa.

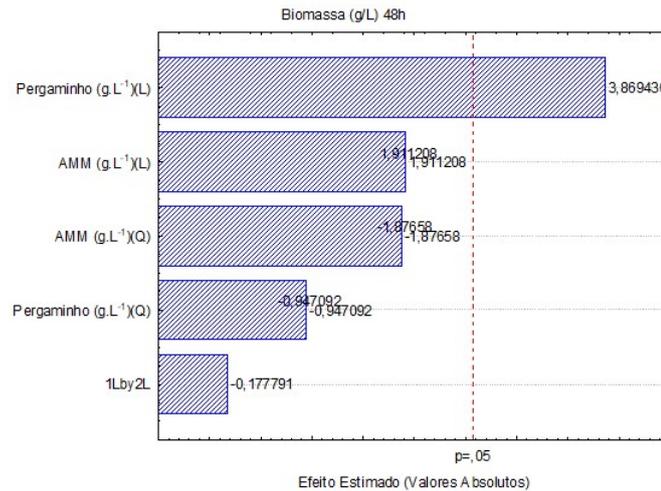


Figura 13. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 5% de significância.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 13), a única variável que interferiu na produção de biomassa foi a concentração do pergaminho do café ($p < 0,05$), sugerindo que maiores concentrações deste subproduto resultam em uma maior produção de biomassa. Porém, chega determinado momento que o aumento da concentração de pergaminho não possibilita um consequente incremento na produção de biomassa, demonstrando uma inibição por excesso de substrato. As demais variáveis não foram estatisticamente significativas ao nível de 5%.

Quantos aos dados de concentração de açúcares redutores totais, os valores variaram de 0,012 a 0,093 g/L. A significância estatística dos resultados foi verificada pela ANOVA através do F calculado (Tabela 25). De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado para concentração de açúcares redutores no tempo de 48 horas foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$), e a porcentagem de variação explicada (R^2) foi de (95%), concluindo que houve um ótimo ajuste aos dados experimentais.

Tabela 25. ANOVA para a resposta da concentração de açúcares redutores em 48 horas de fermentação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	0,006404	5	0,0012808	18,61627907
Resíduo	0,000344	5	0,0000688	
Total	0,006748	10		

% variação explicada (R^2) = 0,95; F_{tab} (5%) = 5,05.

A Tabela 26 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para as medidas do modelo de açúcares redutores totais. Os parâmetros significativos foram os termos quadráticos para a concentração de pergaminho e de água de maceração de milho com 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 26. Coeficiente de regressão dos parâmetros do modelo para concentração de açúcares redutores totais, obtidos para as diferentes concentrações de pergaminho de café e AMM em 48 horas de fermentação, conforme DCCR.

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite inferior	Limite superior
Média	0,048417	0,000162	0,036111	0,060722
X₁	0,015532	0,003196	0,007996	0,023067
X₁	0,005412	0,181588	-0,003557	0,014381
X₂²	0,023129	0,000526	0,015593	0,030664
X₂²	0,000854	0,816420	-0,008115	0,009823
X₁*X₂²	0,002509	0,571457	-0,008148	0,013166

X₁: Pergaminho do café; X₂: AMM.

Observa-se que o modelo ajustado fica caracterizado pela equação (Equação 6).

$$Y \text{ (g/L)} = 0,0484 + 0,0155x_1 + 0,005x_1^2 + 0,023x_2 + 0,001x_2^2 + 0,003 \quad (6)$$

Onde X_1 é a concentração de pergaminho do café e X_2 a concentração de AMM. Após a análise dos resultados, a superfície de resposta para a variável concentração de açúcares redutores totais, no tempo de 48 horas, foi construída e os resultados ilustrados na figura 14 em função da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho.

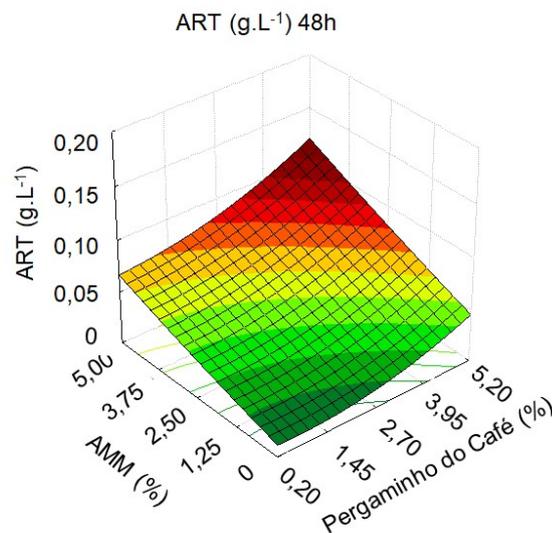


Figura 14. Superfície de resposta 3D: Efeitos da concentração de pergaminho do café e água de maceração de milho na concentração de açúcares redutores totais (ART) em 48 horas de fermentação.

Na Figura 14, pode-se observar que quanto maior a concentração de pergaminho e de água de maceração de milho no meio, maior a quantidade de açúcares redutores.

Em conclusão, ao observar a relação entre os três fatores analisados para os tempos de 36 e 48 horas, podemos inferir no intervalo estudado que ocorreu um crescimento microbiano (pelo aumento de biomassa) e que este pode ser justificado pelo substrato que estava presente em condições satisfatórias no meio, demonstrados pela concentração de ART. Apesar deste crescimento, a produção enzimática encontrou sua maior produtividade dentro do intervalo estudado

durante as 36h de fermentação, demonstrando que não é necessário prolongar a fermentação de forma a obter uma maior produção enzimática.

5.6 Estudo das condições do meio de cultivo e atividade enzimática em fermentação submersa por *Bacillus sp.* SMIA-2 utilizando pontos centrais e pontos críticos do planejamento experimental.

Os dados de produção de protease pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 após 48 h de fermentação estão apresentados na Tabela 27, onde foram utilizados os pontos centrais e os pontos críticos descritos no item 4.9 na tabela 7.

Os melhores valores foram observados para os tratamentos 1 e 2 (pontos centrais em 36 e 48 horas), acima de 10 U/mL de protease. Foi realizado o teste de Tukey, e as médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % de probabilidade, demonstrando que os tratamentos 1 e 2 diferiram estatisticamente entre si e que o tratamento 1 possui os maiores valores de produção de protease.

Tabela 27. Produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2.

Tratamentos	Protease (U/mL)
1	11,72 ^a
2	10,21 ^b
6	7,35 ^c
4	7,01 ^c
3	7,00 ^c
5	6,34 ^c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A partir dos resultados obtidos da produção de protease pelo o *Bacillus sp.* SMIA-2, o tratamento um, contendo os pontos centrais no tempo de 36 horas, foi escolhido para ser utilizado em uma última fermentação, nas mesmas condições, a fim de se obter material suficiente para a realização das análises descritas nos itens (4.12), (4.13) e (4.14).

5.7 Efeito do pH na atividade da protease

As melhores atividades das enzimas foram encontradas em pHs alcalinos (7,5 e 8,5), que podem ser visualizados na tabela 28. Foi realizado o teste de Tukey, e as médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % de probabilidade.

A atividade da enzima aumentou com a elevação do pH, atingindo seu valor máximo em pH 8,5 e havendo a redução da atividade em valores acima deste. Estes resultados corroboram com valores encontrados por outros autores.

Araújo (2020) produziu enzimas de *Bacillus subtilis* TIM27 cultivadas em caldo nutriente contendo 0,2% de glicerol e submetidas a precipitação com sulfato de amônio tiveram sua melhor atividade em pH 8,0.

Barbosa (2011) viu que a atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi superior em pH 9.0. E que quando submetidas a pH inferiores a 8,0 e superiores a 9, a atividade cai consideravelmente.

Ghorbel *et al.* (2002) realizaram estudos sobre proteases de *Bacillus cereus* que revelaram um pH ótimo da enzima 8,0, sendo que a enzima foi bastante estável em vários tampões de pH entre pH 6,0 e 9,0 quando incubada a 50 °C por 1 e 3h.

Tabela 28. Atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo 2,7% de PCN e 2,5% de AMM por 36 horas a 50°C, em diferentes pHs.

pH	Protease (U/mL)
6,5	9,316 ^a
7,5	9,428 ^a
8,5	10,492 ^b
9,5	7,46 ^c
10,5 Tris HCl	6,256 ^d
10,5 Glicina	4,328 ^e

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

5.8 Efeito da temperatura na atividade da protease

A atividade da protease estudada foi aumentando em decorrência do aumento da temperatura. A redução da atividade da enzima foi observada em valores de temperatura acima de 70°C e abaixo de 47,5°C., demonstrando não haver diferença estatística para as temperaturas de 47,5°C e 70°C, que foram as que permitiram maior produção enzimática.

Esses valores são próximos às temperaturas ótimas encontradas para outras proteases de cepas de *Bacillus* sp., que obtiveram atividade máxima em torno de 60°C (Genckal e Tari, 2006). Em estudos realizados por Corrêa (2009), foi encontrada uma temperatura ótima de 70°C para proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2.

Yilmaz et al. (2015) estudaram a atividade e estabilidade a temperatura de proteases obtidas de *Bacillus licheniformis* A10 e encontraram a atividade máxima em 70 °C. Ainda verificou-se que a enzima obteve uma atividade bastante alta entre 50–80°C, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo com *Bacillus* sp. SMIA-2.

Tabela 29. Atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo 2,7% de PCN e 2,5% de AMM por 36 horas a 50°C, em diferentes temperaturas.

Temperatura	Protease (U/mL)
25°C	3,608 ^a
47,5°C	8,448 ^b
70°C	9,352 ^b
92,5°	3,636 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. PCN: Pergaminho do café *in natura*; AMM: Água de maceração de milho.

5.9 Atividade da protease em estocagem sob congelamento.

A atividade da protease presente no extrato bruto das culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 em função do tempo de estocagem a 3°C está apresentada na Tabela 30. De acordo com os resultados, a protease manteve suas atividades estáveis em até 45 dias de estocagem e após os 60 dias a atividade ficou abaixo de 90%.

Tabela 30. Atividade relativa da protease presente no extrato bruto de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 em função do tempo de estocagem a 3°C por 60 dias. (100% de atividade da protease = 10,49 U/mL).

Tempo	Protease (U/mL)	Atividade (%)
0	10,49 ^a	100
15	9,73 ^{bc}	92,75
30	10,16 ^{ab}	96,85
45	9,62 ^c	91,70
60	9,356 ^c	89,19

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Estudos com proteases de *Bacillus licheniformis* P003 demonstraram que a enzima reteve cerca de 66% e 46% de sua atividade inicial após 28 dias de armazenamento a 4°C e temperatura ambiente 25°C (Sarker et al. 2013).

Proteases extraídas do fungo *Cladosporium cladosporioides* ficaram estocadas sob refrigeração a 8 °C por 2 meses e após esse período a atividade hidrolítica da enzima permaneceu inalterada (Acosta et al. 2017).

Sangeetha et al. (2009) utilizou o *Bacillus licheniformis* VSG1 para produzir proteases e a enzima se mostrou estável durante o armazenamento a -4 e 32°C com apenas uma diminuição de 4% na atividade, através de análises feitas após 10 e 20 dias.

A temperatura é um fator limitante para algumas enzimas, onde a maioria é pouco estável quando permanece à temperatura ambiente e esse fator acaba limitando o uso e a distribuição. De forma geral, as enzimas podem ser armazenadas a -20°C ou +4°C na presença de um estabilizador, visando prolongar a sua estabilidade (Cruz, 2017).

6. CONCLUSÕES

O maior custo atrelado à produção de enzimas em escala industrial está relacionado ao cultivo utilizado, principalmente às fontes de carbono e nitrogênio. Este trabalho, visando buscar novas alternativas para tornar o custo de produção da protease mais acessível, avaliou a produção desta enzima por uma bactéria termofílica, *Bacillus sp.* SMIA-2, utilizando substratos de baixo custo.

Os resultados obtidos mostraram que é possível produzir protease utilizando pergaminho do café e água de maceração de milho como fonte de carbono e nitrogênio, pelo microrganismo *Bacillus sp.* SMIA-2.

A aplicação das diferentes concentrações de PCN e AMM no meio de cultivo utilizando um delineamento composto central rotacional (2²), mostrou que a atividade da protease foi melhor quando o *Bacillus sp.* SMIA-2 foi cultivado em culturas submersas contendo PCN 2,7% m/v e AMM 2,5% por 36 horas, à temperatura de 50 °C. A produção atingiu um máximo em 36 horas, com níveis de 11,40 U/mL.

As análises de atividade da protease demonstraram que a temperatura ótima dessa enzima foi de 70°C e pH ótimo foi de 8,5. A estabilidade da enzima, presente no extrato bruto da cultura se manteve estável até os 45 dias à temperatura de 3°C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. B. R.; Inez, D. C. S.; Baleiro, L. F.; Mano, E. T.; Silva, L. F. (2017) Enzimas hidrolíticas (DNAses, lipases e proteases) secretadas por *Cladosporium cladosporioides* isolado de solo e seu potencial de aplicação em biotecnologia. *Sociedad Venezolana de Microbiologia. Revista*, Caracas. 37:61-65.
- Aguiar, C. M. (2010) Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Toledo – PR, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste Centro de Engenharias e Ciências Exatas, 118p.
- Agnoletti, B. Z. (2015) *Avaliação das propriedades físico-químicas de café arábica (Coffea arabica) e conilon (Coffea canephora) classificados quanto à qualidade da bebida*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Alegre – ES, Universidade Federal do Espírito Santo, 112p.
- Almeida, E. *et al.* (2018) Multiplex PCR identification and culture-independent quantification of *Bacilluslicheniformis* by PCR using specific DNA markers. *Food Microbiology*, Porto, 74:1-10.
- Araujo, T. R. (2018) *Aplicação de Bacillus cereus e Enterococcus faecalis, isolados de bacalhau seco salgado (Gadus sp), no tratamento de resíduos sólidos agroindustriais salinos por compostagem controlada*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Pelotas - RS, Universidade federal de pelotas, 66p.
- Araújo, F. J. S (2020). *Avaliação de proteases e biossurfactantes produzidos por Bacillus subtilis TIM27 como aditivos em detergente*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Fortaleza – CE, Universidade Federal do Ceará. 73p.

- Aygan, A.; Karcioğlu, L.; Arıkan, B. (2011) Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology*, Karamamaras, 10:789-796.
- Baqueta, M. R. (2016) *Extração e caracterização de compostos do resíduo casca de café*. Trabalho de conclusão de curso (Tecnólogo em Alimentos) -Campo Mourão – PR, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 56p.
- Baqueta, M. R. *et al.* (2017) Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal casca de café. *Brazilian Journal of Food Research*, Campo Mourão, 8:68-89.
- Barbosa, J. B (2011) *Aproveitamento de soro de queijo e farinha da casca de maracujá para produção de proteases e α -amilases por Bacillus sp. SMIA-2*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 96p.
- Barbosa, J.B.; Gentil, N.O.; Ladeira, S.A.; Martins, M.L.L. (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalysis and Biotransformation*. 32:244-250.
- Barbosa, J. B (2015) . Utilização da farinha da casca de maracujá (*Passiflora edulis Sims*) para produção de enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 97p.
- Bernardo, S.P.C., Rosana, A.R.R, Souza, A.N., Chiorean, S., Martins, M.L.L., Vederasb, J.C. (2020). Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 9:1-3.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A (1959) Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 8:911-917.
- Blinová, L.; Sirotiak, M.; Bartošová, A.; Soldán, M. (2017) Review: utilization of waste from coffee production. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology Bratislava*, 25:91-101.
- Box, G.E. and Wilson, K.G. (1951) On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*, 13:1-45.
- Brito, E. C. M., Braga, R. S., Teixeira M. F. S & Martim S. R. (2019) Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (*Polyporaceae*). *Ciências Naturais: Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, 14: 453-461.
- Brum, S. S. (2007) *Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para produção de novos materiais*. Dissertação

- (Mestrado em Agroquímica) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras, 152p.
- Carvalho, A. S. S. (2019) *Produção de lipases em cultivo submerso por bactéria termofílica utilizando resíduo e coprodutos agroindustriais*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos do Goytacazes –RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 87p.
- Carvalho, I. Z. *et al.* (2018) Avaliação da casca de café como substrato produção de celulases por fermentação em estado sólido. *Anais do Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia*, 75, Maceió-AL.
- Castro, A. M.; Júnior, N. P. (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, 33:181-188.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Análise Mensal do café – Dezembro 2021. Disponível em <: file:///C:/Users/win10/OneDrive/%C3%81rea%20de%20Trabalho/Mestrado/DISSERTA%C3%87%C3%83O/E-book_BoletimZdeZSafrasZcafZ-ZdezembroZ21-compact.pdf>: Acesso em: 10 de janeiro de 2022.
- Corrêa, T. L. R. (2009) Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 76p..
- Corrêa, T. L. R. *et al* (2011) Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 31:843-848.
- Costa, E. A. (2017) Formulação de um meio de cultura para a produção de celulases por *Bacillus* sp. e potencial das enzimas para hidrolisar a celulose. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte FluminenseDarcy Ribeiro. 80p.
- Cruz, E. (2017) Estudos sobre a estabilidade de celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 63p.
- Cruz, E. (2021) Celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2: Secagem e uso para o desenvolvimento de formulações ecológicas de limpeza. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 177p.
- Delatorre, A. B. *et al.* (2018) Congresso Sul-Americano de resíduos sólidos e sustentabilidade, Universidade Estácio de Sá. Anais eletrônicos. Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/conresol/conresol2018/XV-040.pdf>>. Acesso em: 15 Janeiro 2021.

- 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.
- Duarte Neto, J. M. W. (2018) *Purificação e caracterização de protease produzida por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 em fermentação submersa visando aplicação biotecnológica*. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde) – Recife – PB, Universidade Federal de Pernambuco, 39p.
- 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.
- Fernandes, R. N. (2016) *Utilização do bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farinha da casca de maracujá para a produção de celulases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Alegre – ES, Universidade Federal Do Espírito Santo, 66p.
- Ferrão, R. G. *et al.* (2017) *Café Conilon*. 2. ed. Vitória - ES, 786p.
- Freitas, V. V. (2018) *Avaliação da fermentação do café arábica com uso de culturas starters*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa, 54p.
- Genckal, H., Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:703-710.
- Gentil, N. O. (2014). *Purificação parcial de proteases termorresistentes secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 59p.
- Ghorbel, B., Sellami-kamoun, A., Nasri, M. (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:513-518.
- Holzmann, H. A.; Dallamuta, J.(2020) *Resultados das pesquisas e inovações na área das engenharias 2*. 2. ed. Ponta Grossa: Atena, 36p.
- Instituto Adolfo Lutz. (2008) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 4. ed. São Paulo: IMESP, v. 1, 1020p.
- Johnvesley, B., Naik, G.R. (2001). Study on Production of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic And Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB99 in a Chemically Defined Medium. *Journal Process Biochemistry*. 37:139-144.

- Jung, D. U., Yoo, H. Y., Kim, S. B., Lee, J. H., Park, C., & Kim, S. W. Optimization of medium composition for enhanced cellulase production by mutant *Penicillium brasilianum* KUEB15 using statistical method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.25:145-150.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Revista Química Nova*, 1-5.
- Lacerda, J. X.; Pinotti, L. M. (2015). *Produção de Celulases por Penicillium sp.* Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 11, Campinas, UNICAMP. Anais Eletrônicos. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeqic2015/052-31993-242947.pdf>>. Acesso em: 10 Fevereiro 2021.
- Ladeira, S. A. (2013) *Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de Bacillus sp.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 164p.
- Ladeira, S.; Cruz, E.; Delatorre, A.; Batista, B. J.; Martins, M. (2015) Cellulase production by thermophilic *Bacillus sp.* SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8:110-115.
- Lopes, H. J. J. (1998) *Enzimas no Laboratório clínico: aplicações diagnósticas*. Analisa. Belo Horizonte, 29p.
- Mansur, L. R. C. O. (2011) *Produção de avicelases pelo termofílico bacillus sp. SMIA-2*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense, 116p.
- Massey, J. L. (2016) *Coffee production, consumption and health benefits*. New York: Nova Science Publishers, v. 1, 199p.
- Mateus, N. B.; Barbin, D.; Conagin, A. (2001) Viabilidade de uso do delineamento composto central. *Acta Scientiarum*, 23:1537-154.
- Mattietto, R. A.; Matta, V. M. (2012) *Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica de polpas de açaí pasteurizadas*. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 19, Búzios - RJ. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/940285/1/2012184.pdf>>. Acesso em: 17 Janeiro 2021.
- Meneghelli, C. M.; Lo Monaco, P. A. V.; Haddade, I. R.; MENEGHELLI, L. A. M.; KRAUSE, M. R. (2016) Resíduo da secagem dos grãos de café como substrato alternativo em mudas de café conilon. *Coffee Science*, 11:330-335.

- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
- Mores, L. (2017) *História ambiental do agroecossistema do café (Coffea arábica) no norte do Paraná (1945-1975)*. Dissertação (Mestrado em História) - Florianópolis – SC, Universidade Federal de Santa Catarina.321p.
- Moura, Y. H. P. (2016) *Aproveitamento da casca de café tratada com enzimas fibrolíticas na alimentação de ruminantes*. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Itapetinga- BA, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 88p.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos, S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses, *Biochemical Engineering Journal*. 6:153-162.
- Pena, F. R. (2011) *Otimização do parâmetro concentração de hidróxido de sódio, empregado no pré – tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, visando à obtenção de etanol celulósico*. Trabalho de Programa de Iniciação Científica (Programa de Iniciação Científica) -Assis – SP, Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, 46p.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83:346-356.
- Queiroz, C.; Sousa, A. C. B. B. (2020). Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. *Brazilian Journal of Development* , 6:51849-51860.
- Ratnadewi, A. A. I.; Masruroh, H.; .., S.; Santoso, A. (2019). Application of coffee peel waste as raw material for xylooligosaccharide production. *Coffee Science*, 14:446 - 454.
- Razzaq, A., Shamsi S., Ali, A.; Ali, Q.; Ali, M.; Sajjad, A.; Malik, A.; Ashraf, M. (2019) Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:1-20.
- R. Hadjidj, A. Badis, S. Mechri, K. Eddouaouda, L. Khelouia, R. Annane, M. El Hattab, B. Jaouadi. (2018) Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A, *Int. J. Biol. Macromol.* 114:1033–1048.
- Rigo, D.; Gayeski, L.; Tres, G. A.; Camera, F. D.; Zeni, J.; Valduga, E.; Cansian, R. L.; Toniazzo, G. T. (2021). Produção microbológica de enzimas: uma revisão. *Brazilian journal of Development*. 7:9232-9254.
- Santos, L. C. (2017) *Tratamento oxidativo de cascas de café com ozônio com vistas à produção de biogás e etanol 2g*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Ouro Preto – MG, Universidade Federal de Ouro Preto, 139p.

- Santos, P.; Solidade, L.; Souza, J.; Sampaio, G.; Jr, A.; Assis, F.; Leal, P. (2018) Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4:181-188.
- Sarker, P. K., Talukdar, S. A., Deb, P., Sayem, S. A., & Mohsina, K. (2013). Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003. *Springer Plus*. 2:506.
- Shi, F.; Xu, Z.; Cen, P. (2006). Optimization of γ -Polyglutamic Acid Production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 Using a Surface-response Methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11:251-257.
- Silva, R. A. (2019) *Produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica a partir do bagaço do sorgo sacarino por fermentação semissólida e submersa*. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Campina grande – PB - Universidade Federal de Campina Grande, 110p.
- Somogy, M. (1945). Determination of blood sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 160-169.
- Souza, A. N.; Martins, M. L. L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of athermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Souza, E. F. (2012) *Aplicação de proteases e amilases produzidas por Bacillus sp. SMIA-2 na remoção de manchas de tecidos*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Do Norte Fluminense, 77p.
- Statistical Analysis System. (2003) SAS ® Institute Inc. SAS User's Guide. Cary. USA.
- USDA - United States Department of Agriculture (2021). Foreign Agricultural Service. *Coffee World Markets and Trade*. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>>. Acesso em: 11 Janeiro 2021.
- Yilmaz, B.; Baltaci, M. O.; Sisecioglu, M. (2015) Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 31:1241-1247.
- Zhang, P.; Gimmel, M. E.; Mielenz, J. R. (2006) Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advance*, 24:452-481.