PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL-
MESTRADO E DOUTORADO
GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Joyce Cristina Gonçalvez Roth

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA A REMEDIAÇÃO DO RESÍDUO PÓ DE TABACO POR CULTIVO EM FASE SUBMERSA (*Bacillus subtilis* JB5) E CULTIVO EM FASE SÓLIDA (*Pyconoporus sanguineus*)

Santa Cruz do Sul
2020

Joyce Cristina Gonçalvez Roth

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA A REMEDIAÇÃO DO RESÍDUO PÓ DE TABACO POR CULTIVO EM FASE SUBMERSA (*Bacillus subtilis* JB5) E CULTIVO EM FASE SÓLIDA (*Pyconoporus sanguineus*)

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, área de concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, sob a Linha de pesquisa em Microbiologia Ambiental, da Universidade de Santa Cruz do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Dra. Lisianne Brittes Benitez

Co-orientadora: Dra. Michele Hoeltz

Santa Cruz do Sul
2020

Joyce Cristina Gonçalvez Roth

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA A REMEDIAÇÃO DO RESÍDUO PÓ DE TABACO POR CULTIVO EM FASE SUBMERSA (*Bacillus subtilis* JB5) E CULTIVO EM FASE SÓLIDA (*Pyconoporus sanguineus*)

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, área de concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, sob a Linha de pesquisa em Microbiologia Ambiental, da Universidade de Santa Cruz do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia Ambiental.

_____
Dra. Lisianne Brittes Benitez – UNISC (Orientadora)

_____
Dra. Michele Hoeltz – UNISC (Co-Orientadora)

_____
Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza– Univates

_____
Dra. Mariliz Gutterres Soares– UFRGS

_____
Dra. Rosana de Cássia Schneider– UNISC

_____
Dr. Adilson Ben da Costa – UNISC

Santa Cruz do Sul
2020

AGRADECIMENTOS

Todo o esforço e dedicação nesses 4 anos, jamais poderiam passar sem o meu maior agradecimento ao meu marido, que esteve ao meu lado, "segurando as pontas" com maior carinho e paciência. Esse trabalho também é dele, pois afinal ele vibrou comigo, quando os resultados tão esperados foram aos poucos sendo atingidos, vibrou e comemorou comigo, quando a tão esperada publicação veio, e junto ao meu filho, foram comigo até universidade, incontáveis vezes e deixaram a mamãe trabalhar no laboratório, enquanto brincavam na "rampa maneira" (palavras do meu filho).

Igualmente, agradeço a minha mãe e especialmente ao meu pai, que sempre me incentivou, em todas as novas batalhas que fui assumindo, deste a graduação. Agradeço do fundo da minha existência a sensibilidade em querer entender o que eu tanto fazia no laboratório, fosse nos dias corridos da semana ou mesmo nos finais de semana.

E como não agradecer a parceria de tantos amigos que fiz durante esse período, colegas de laboratório e da sala de estudos, a minha parceira Renata, bolsista de iniciação científica, aos professores do Programa de Pós-graduação e funcionários, cuja amizade e simpatia jamais serão esquecidos.

E o meu agradecimento mais que especial às minhas eternas orientadoras e amigas, Prof. Dra. Lisianne e Prof. Dra. Michele, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram continuamente. Igualmente a Prof. Dra. Mariliz Guterrez, que foi a pessoa que Ele colocou no meu caminho e que participou dos momentos mais importantes da minha vida acadêmica.

Também agradeço à CAPES - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O desenvolvimento dos bioprocessos permite o emprego de muitos micro-organismos para o tratamento e/ou remediação de uma grande variedade de resíduos industriais. Os fungos e as bactérias são apontados como principais agentes nesses processos que preconizam o tratamento e disposição final de resíduos e/ou o restabelecimento de áreas afetadas pela ação do homem. O resíduo pó de tabaco (RPT) apresenta-se como subproduto do processamento do tabaco e, portanto, regionalmente simboliza uma preocupação especialmente na disposição final. Assim, o objetivo desse trabalho foi utilizar o resíduo pó de tabaco no desenvolvimento de bioprocessos que permitam a sua valoração ambiental, através da produção de enzimas e redução de volume. A metodologia de trabalho deste estudo consiste em (i) mapeamento bibliométrico sobre os resíduos de biomassa lignocelulósica e seu principais empregos (ii) caracterização físico-química dos resíduos pó de tabaco e da farinha da casca de mandioca (FCM) (iii) *screening*, isolamento e avaliação do potencial de microrganismos no uso do substrato residual, (iv) condução de cultivos em fase submersa (CFSm) e em fase sólida (CFS); (v) otimização do processo fermentativo de produção de celulases, através da determinação da FPase e (vi) determinação percentual da redução do volume de substrato pela determinação do teor de ergosterol. As concentrações de metais presentes, valor de pH, proteínas, lipídeos e carboidratos diferem daquelas encontradas em outros trabalhos devido à natureza mista do RPT. Para a FCM, os valores encontrados assemelharam-se aos de outros trabalhos relatados pela literatura. Foram isoladas do resíduo pó de tabaco 6 diferentes colônias bacterianas (JB) e após a realização dos testes enzimáticos, foi selecionado o isolado que apresentou maior atividade de celulase, nomeado como JB5, e que foi identificado como *Bacillus subtilis.* A análise química do resíduo pó de tabaco demonstrou que este apresenta potencial para ser utilizado como substrato para a obtenção de enzimas a partir do cultivo de bactérias, no CFSm, e do fungo *P. sanguineus*, no CFS. A produção de celulases total (FPAse) foi avaliada através da foi otimizada através de um planejamento experimental cujas variáveis de temperatura, pH, concentração de resíduo, velocidade de agitação, concentração de NaCl e de surfactante foram avaliadas. A otimização dos processos promoveu o aumento nos índices da atividade FPase, entretanto quando ocorreu aumento de escala (em biorreator STR), os valores obtidos foram inferiores daqueles preditos pelo modelo. O CFS foi conduzido empregando-se uma cepa de *Pycnoporus sanguineus,* e a determinação do teor de ergosterol foi feita pela validação de uma nova metodologia a partir da cromatografia líquida de alta eficiência. As condições de produção de celulases microbianas otimizadas neste trabalho podem servir de orientação para investigações posteriores, permitindo que o emprego do RPT seja atrativo industrialmente, ao mesmo tempo em que permitirão servir de alternativa ambientalmente adequada para a sua remediação. O CFS além de garantir o cultivo do *P. sanguineus,* demonstrou que esse bioprocesso pode minimizar os impactos associados à atividade industrial.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis.* Bioprocessos. Pó de tabaco. Otimização. *Pycnoporus sanguineus.*

ABSTRACT

The development of bioprocesses allows the use of many microorganisms for the treatment or remediation of a wide variety of industrial waste. Fungi and bacteria are identified as the main agents in these processes that advocate the treatment and final disposal of waste and / or the restoration of areas affected by human action. The tobacco powder residue (TPR) is presented as a bioproduct of tobacco processing and, therefore, regionally symbolizes a concern especially in the final disposal. Thus, the objective this work was using the TPR as an alternative substrate for prospecting and growing enzyme-producing microorganisms could be characterized as an alternative for adding value and environmental remediation. The working methodology applied in this work consisted of (i) bibliometric mapping of lignocellulosic biomass residues and their main uses (ii) physical-chemical characterization of TPR, (iii) screening, isolation and evaluation of the potential of microorganisms in use the residual substrate, (iv) conduction of microbial cultivation in submerged fermentation (SmF) and solid phase (SSF); (v) optimization of the fermentation process of cellulases production, by determining the FPase and (vi) determining the ergosterol content in the residual substrate of the SSF. The concentrations of metals present, pH value, proteins, lipids and carbohydrates differ from those found in other studies due to the heterogeneous source of TPR. For FCM, the values found were similar to those of other studies reported in the literature. Six different bacterial colonies (JB) were isolated from the TPR and after performing the enzymatic tests, the isolate with the greatest cellulase activity was selected, named JB5, and which was identified as *Bacillus subtilis*. The chemical analysis of the TPR showed that it has the potential to be used as a substrate for obtaining enzymes from the cultivation of bacteria, in CFSm, and the fungus *P. sanguineus*, in CFS. The production of total cellulases (FPAse) was evaluated through was optimized through an experimental design whose variables of temperature, pH, residue concentration, agitation speed, concentration of NaCl and surfactant were evaluated. The optimization of the processes promoted an increase in the FPase activity indices, however when there was an increase in scale (in STR bioreactor), the values obtained were lower than those predicted by the model. The CFS was conducted using a strain of *Pycnoporus sanguineus*, and the determination of the ergosterol content was performed by validating a new methodology using high performance liquid chromatography. The conditions of production of microbial cellulases optimized in this work can serve as a guide for further investigations, allowing the use of RPT to be industrially attractive, while allowing it to serve as an environmentally adequate alternative for its remediation. Besides guaranteeing the cultivation of P. sanguineus, the CFS demonstrated that this bioprocess can minimize the impacts associated with industrial activity.

Keywords: *Bacillus subtilis.* Bioprocess. Tobacco powder. Optimization. *Pycnoporus sanguineus.*

LISTA DE SÍMBOLOS

CFSm	Cultivo em Fase Submersa
CFS	Cultivo em Fase Sólida
PRISMA	*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*
RTP	Resíduo pó de tabaco
FCM	Farinha da casca de mandioca
MALDI-TOF MS	*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of-flight mass spectrometry*
BHI	*Brain Heart Infusion*
RSM	Metodologia da Superfície de Resposta
PBD	*Design* de Packett Burman
CCD	*Design* de Composto Central
ANOVA	Análise de Variância
CB	Caldo Batata
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
DNS	3,5 dinitro-salicílico
UI	Unidade Internacional
HPLC-DAD	*High performance liquid chromatography with diode array detection*
STR	*Stirred tank reactor*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8
1.1 Caracterização química da lignocelulose 9
1.2 Potencialidades dos resíduos lignocelulósicos e seu emprego em bioprocessos 11
2 OBJETIVOS 14
2.1 Objetivo Geral 14
2.2 Objetivos Específicos 14
3 METODOLOGIA 15
3.1 Estado da arte 15
3.2 Amostragem e Caracterização do Resíduo 16
3.3 Micro-organismos 16
3.4 Cultivos 18
3.4.1 Cultivo em Fase Submersa (CFSm) 18
3.4.2 Cultivo em Fase Sólida (CFS) 19
3.5 Determinação da atividade de celulase total e de xilanase 19
3.6 Análise do teor de ergosterol 20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 21
4.1 Artigo 1 22
4.2 Artigo 2 49
4.3 Artigo 3 69
REFERÊNCIAS 85
APÊNDICE A – *Screenning* e isolamento de micro-organismos do RPT 104
ANEXOS 109

1 INTRODUÇÃO

Recentemente novas metodologias e políticas para o tratamento de resíduos através da reciclagem, reutilização e bioconversão de seus constituintes em bioprodutos tem sido desenvolvidas, permitindo assim a valorização desses materiais. A produção mais limpa pode ser inserida no ramo agroindustrial como instrumento estratégico para a fabricação de bioprodutos em diversos ramos, pela otimizaçao e melhoria da eficiência das etapas produtivas, assim como a redução e emprego do resíduo em tecnologias ambientalmente apropriadas (NAYAK; BHUSHAN, 2019).

Estudos que envolvem a recuperação e valoração de resíduos estão concentrados principalmente em subprodutos agrícolas e de processamento de alimentos (GALANAKIS, 2012). Em função da grande diversidade de resíduos lignocelulósicos gerados nos processos agroindustriais, diferentes soluções, sob medida, precisam ser estudadas para a produção de diferentes produtos químicos, combustíveis e energia, que devem ser avaliadas conforme a disponibilidade local desses materiais (FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010; NAYAK; BHUSHAN, 2019)

A preocupação ambiental associada aos resíduos lignocelulósicos é derivada da alta geração, e em muitos casos, da lenta degradabilidade, que pode também originar subprodutos cumulativos e recalcitrantes. De modo geral, pouca preocupação tem sido observada nos setores agrícolas e agroindustriais geradores de resíduos, passíveis de poluição ambiental se não tratados e destinados adequadamente (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

Em geral, os resíduos lignocelulósicos gerados como subprodutos das atividades industriais e agrícolas são empregados diretamente na agricultura, mesmo que de modo não intencional, através da deposição direta no solo, através de sua incorporação no solo via biodegradação (SCHNEIDER *et al.*, 2012) e também em processos de queima para obtenção de energia termica (GONÇALVES *et al.*, 2005) e ração animal (FREITAS *et al.*, 2013; KHOLIF *et al.*, 2017).

Em termos de disponibilidade, os resíduos de biomassa são dificeis de quantificar, pois são dependentes da espécie cultivada e de sua finalidade, fertilidade do solo, condições climáticas e outros fatores (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Estima-se que os resíduos de biomassa representam cerca de 30% da cadeia produtiva (DO NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015). Algumas culturas agrícolas podem produzir anualmente até 2,4 toneladas de biomassa para cada hectare e pode se tornar um problema ambiental regional-local (DEMIRBAŞ, 2001; DOS SANTOS *et al.*, 2006).

Contextualizando a realidade brasileira, em função de sua grande diversidade produtiva agrícola e consequentemente, a disponibilidade desses resíduos, agregar valor a esse "problema ambiental" simboliza interesse econômico e ambiental para as industrias, que buscam incansavelmente a consolidação de um perfil mais sustentável. No entanto, para atingir esse objetivo, torna-se fundamental a investigação científica que permita a conversão segura, eficiente e ecomicamente viável de resíduos em bioprodutos (DO NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

Muitos municípios do sul do Brasil são impulsionados pela cultura do tabaco, e portanto, regionalmente é grande a produção de resíduos associados a essa atividade. Isso é confirmado pela expansão das áreas cultivadas na região sul do país, especificamente no estado do Rio Grande do Sul a partir da década de 90 (DUTRA; HILSINGER, 2013).

A cultura do tabaco é atualmente gerida por empresas multinacionais estando o maior complexo de processamento do tabaco localizado nos municípios de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires (DUTRA; HILSINGER, 2013; SINDITABACOS, 2019). A maior produção está localizada no entorno das indústrias de transformação e beneficiamento, tais como a região do Vale do Rio Pardo que é a maior produtora do estado.

De acordo com Souza Cruz (2018), o processamento industrial do tabaco envolve a separação mecânica da lâmina e do talo realizada pelos separadores e debulhadores. Um processo de secagem é adicionado para manter o nível de umidade do tabaco uniforme. Ao final do processamento cerca de 90% da folha de tabaco é utilizada, restando principalmente o pó de tabaco e os talos, considerados os principais resíduos da indústria fumageira. O pó de tabaco representa 95% do total dos resíduos produzidos (TEDESCO et al., 2011).

A casca representa um dos resíduos gerados no processamento da mandioca e que apresenta elevado teor de amido. Na região sul do país, se destaca grande produtividade (elevado rendimento) e pelas agroindústrias de beneficiamento, que geram quantidades significativas de resíduo (CONAB, 2018).

1.1 Caracterização química da lignocelulose

A lignocelulose é formada por três componentes poliméricos majoritários: a lignina, celulose e hemicelulose, unidos entre si, por ligações covalentes, formando uma estrutura extremamente complexa, recalcitrante e, portanto, resistente ao ataque microbiano (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Existe uma variabilidade nas porções de cada uma dessas substâncias macromoleculares nos materiais lignocelulósicos, mas

de forma geral, a celulose encontra-se em maiores frações, seguida da hemicelulose e lignina (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Além da celulose, hemicelulose e lignina, existe ainda uma pequena porção outros de compostos químicos, chamados de extrativos, que não fazem parte da estrutura da parede celular e podem estar associados a óleos essenciais, resinas, taninos e pigmentos. Esses compostos apresentam baixo peso molecular, solubilidade em água e também em solventes orgânicos neutros e são considerados constituintes secundários orgânicos dos materiais lignocelulósicos (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005). Já as cinzas, representam o material inorgânico de baixo peso molecular presente no material lignocelulósico (KLOCK; ANDRADE, 2013).

A celulose é um polissacarídeo formado por uma cadeia longa de unidades monoméricas de β-D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4), relativamente simples de serem rompidas por ação enzimática de micro-organismos. A hemicelulose é formada por uma classe de componentes poliméricos, como a xilose, arabinose, galactose, manose e glicose, representando de 10 a 40% da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos (SINGHANIA *et al.*, 2017; SPADOTTO; RIBEIRO, 2006). Sua função está associada a propriedades estruturais além de regulação e desenvolvimento das plantas (FERREIRA; DA ROCHA; DA SILVA 2010).

A cadeia polissacarídica de glicose situa-se envolvida pela lignina, um polímero aromático heterogêneo formado por unidade de fenilpropano substituídas unidadas por ligações éter estáveis (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; DE SOUZA, 2013), conferindo elevada resistência a ataques biológicos e químicos, e por esse motivo, apresenta relativa importância na parede celular (MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010; VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Durante o desenvolvimento celular, essas estruturas penetram pelas fibrilas, fortalecendo e enrijecendo a parede celular (KLOCK; ANDRADE, 2013).

Devido a sua conformação estrutural, esses resíduos necessitam de pré-tratamentos que facilitam seu posterior processamento. Isso é garantido pela remoção da lignina e rompimento da estrutura cristalina da celulose (MOSIER *et al.*, 2005; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Os pré-tratamentos alteram o tamanho, estrutura e composição química da biomassa, permitindo que a hidrólise da biomassa seja realizada mais rapidamente e com melhor eficiência (DA SILVA *et al.*, 2010a; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Eles podem ser categorizados conforme seu modo de ação em pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Em geral, os pré-tratamentos físicos e químicos que utilizam ácido, álcali, micro-ondas, explosão a vapor, radiação ionizante ou processos combinados necessitam de instrumentação especial e que por consequência, consomem muita energia e geram inibidores que afetarão a hidrólise enzimática e a fermentação (MOSIER *et al.*, 2005; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Por sua vez, os pré-tratamentos biológicos utilizam metabólitos de micro-organismos a partir da biomassa e atualmente são encarados como tecnologia promissora devido a fatores ambientais, econômicos além de aumentar a taxa de sacarificação enzimática (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

A eficiência do processamento biológico da biomassa é devido aos mecanismos celulares desenvolvidos pelos micro-organismos em extrair energia a partir da lignocelulose via secreção de enzimas. Essas enzimas degradam a parede celular da planta e liberam monômeros de açúcares utilizados como substratos no metabolismo microbiano. Essa habilidade de hidrólise enzimática é distribuída especialmente entre os fungos e bactérias (DE SOUZA, 2013).

1.2 Potencialidades dos resíduos lignocelulósicos e seu emprego em bioprocessos

Em função da tecnologia empregada para a conversão da lignocelulose, diferentes bioprodutos poderão ser obtidos, citando-se as enzimas (LEE *et al.*, 2017; NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016; SHAJAHAN *et al.*, 2017; WYMAN *et al.*, 2018), biocombustíveis (GUERRERO; BALLESTEROS; BALLESTEROS, 2018; LEE *et al..*, 2017; SWAIN, 2017; WYMAN *et al.*, 2018), polímeros de açúcar (JAGTAP *et al.*, 2017), ácidos orgânicos (DESSIE *et al.*, 2018), bioplásticos (MOSTAFA *et al.*, 2015) e furfural (CHEN *et al.*, 2017). Esse aproveitamento ambientalmente adequado dos resíduos de biomassa em sua totalidade, remete ao conceito de biorrefinaria, cujo principal objetivo, é transformar os resíduos de biomassa em produtos que possam ser empregados pelas indústrias através de uma combinação de tecnologias e processos biotecnológicos (FREITAS *et al.*, 2013; POGGI-VARALDO *et al.*, 2014; SANTOS; BORSCHIVER; COUTO, 2012).

Em relação as enzimas, estima-se que os custos oriundos da sua obtenção estejam associados ao valor do material utilizado como substrato o que impulsiona a utilização de resíduos agroindustriais como materia-prima para esse fim (DE SIQUEIRA *et al.*, 2010). A preocupação ambiental atrelada ao resíduos lignocelulósicos tem impulsionado diversos estudos que priorizam o emprego de enzimas para o reaproveitamento dos resíduos e não apenas em etapas do processamento da matéria prima, bem como, a redução do potencial poluidor

agregadado aos materiais orgânicos quando indevidamente dispersos nas matrizes ambientais (FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010).

Nesse sentido, as celulases representam papel importante na conversão do material lignocelulósico em glicose, atuando especificamente sobre as celulose (KESHK, 2016; LEE *et al.*, 2017; SINGHANIA *et al.*, 2017). Elas são caracterizadas por uma mistura complexa de enzimas que atuam sobre o substrato de modo sinérgico, onde celulases, xilanases e beta-glucosidades atuam conjuntamente. Esse complexo multi-enzimas inclui três componentes principais: as endoglucanases ou endo-1,4-β-D-Glucanase (EC 3.2.1.4), as exoglucanases ou exo-celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as β-glucosidases (EC 3.2.1.21) (KESHK, 2016; SINGHANIA *et al.*, 2017).

Essas enzimas celulolíticas são capazes de hidrolisar completamente o polímero de celulose. Em termos de importância no processo de hidrólise do resíduo lignocelulósico, as endoglucanases são responsáveis pela redução do grau de polimerização da celulose atuando randomicamente. As exoglucanases promovem a ruptura física do substrato, acarretando em desestratificação das fibras do substrato, tornando as regiões cristalinas do polímero em amorfas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; KESHK, 2016; SINGHANIA *et al.*, 2017), permitindo uma melhor atuação do complexo enzimático.

Assim como os fungos, muitas estirpes bacterianas podem ser empregadas para a produção de enzimas e para isso, a produção de enzimas microbianas pode ser viabilizada por dois processos: Cultivo em Fase Submersa (CFSm) e Cultivo em Fase Sólida (CFS). Nos CFS as condições microbiológicas são muito similares aos encontradas em processos naturais de compostagem. O material não solúvel empregado no CFS atua como suporte para o micro-organismo que o utiliza também como fonte de nutrientes. A água, em geral, encontra-se complexada na matriz sólida do substrato, se observando a ausência ou quase ausência de água livre, condição que limita a atuação de um pequeno número de micro-organismos, em sua maioria fungos. Cabe salientar da importância do teor de umidade e tamanho da partícula quando os resíduos agroindustriais são utilizados, pois esses fatores podem ser limitantes quando se trata da CFS (COUTO; SANROMÁN, 2006; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Em contrapartida, no CFSm o teor de água ultrapassa os 95% e por esse motivo, se permite um maior controle de temperatura e redução de perdas de bioprodutos (enzimas com baixa estabilidade térmica). Entretanto os CFSm estão mais suceptíveis as contaminações devido ao elevado teor de água livre (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Para qualquer processo escolhido, os meios empregados poderão ser os subprodutos agroindustriais, tais como o pó de tabaco e a farinha da casca de mandioca, que servem como fonte de nutrientes. Entre os nutrientes essenciais para o crescimento microbiano estão o carbono, nitrogênio, fatores de crescimento e micronutrientes (NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

REFERÊNCIAS

ABE, F.; HIRAKI, T. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in Saccharomyces cerevisiae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1788, n. 3, p. 743-752, 2009.

ACHENBACH, H.; BLÜMM, E. Investigation of the Pigments of Pycnoporus sanguineus-Pycnosanguin and New Phenoxazin-3-ones. **Archiv der Pharmazie**, 324, n. 1, p. 3-6, 1991.

ADEKUNLE, A.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 64, p. 518-530, 2016.

AHMED, I. N.; YANG, X.-L.; DUBALE, A. A.; LI, R.-F. *et al.* Hydrolysis of cellulose using cellulase physically immobilized on highly stable zirconium based metal-organic frameworks. **Bioresource technology**, 270, p. 377-382, 2018.

AKRAM, F.; HAQ, I. U.; IMRAN, W.; MUKHTAR, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy**, 122, p. 225-238, 2018.

AL-ZUHAIR, S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, 99, n. 10, p. 4078-4085, 2008.

ALVIRA, P. *et al.* Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; BALASUBRAMANIAN, T. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from Bacillus carboniphilus CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. **Biomass and Bioenergy**, 68, p. 151-160, 2014.

ANNAMALAI, N. *et al.* Thermostable, haloalkaline cellulase from Bacillus halodurans CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. **Carbohydrate Polymers**, 94, n. 1, p. 409-415, 2013.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. ed. Washington: AOAC, 2005.

ARCHAMBAULT, É.; CAMPBELL, D.; GINGRAS, Y.; LARIVIÈRE, V. Comparing bibliometric statistics obtained from the Web of Science and Scopus. **Journal of the Association for Information Science and Technology**, 60, n. 7, p. 1320-1326, 2009.

ASGHER, M.; ASAD, M. J.; RAHMAN, S. U.; LEGGE, R. L. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing. **Journal of Food Engineering**, 79, n. 3, p. 950-955, 2007.

AZADIAN, F. *et al.* Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from Bacillus sonorensis HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 15, n. 1, p. 187-196, 2017.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, n. 11, p. 180, 2016.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of biotechnology**, 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

BAJAJ, B. *et al.* Partial purification and characterization of highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated Bacillus strain M-9. **Indian Journal of Chemical Technology**, 16, p. 382-387, 2009.

BAJPAI, P. Chapter 5 - Sources, Production, and Classification of Xylanases. *In*: BAJPAI, P. (Ed.). **Xylanolytic Enzymes**. Amsterdam: Academic Press, 2014a. p. 43-52.

BAJPAI, P. Chapter 8 - Industrial Applications of Xylanases. *In*: BAJPAI, P. (Ed.). **Xylanolytic Enzymes**. Amsterdam: Academic Press, 2014b. p. 69-104.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied energy**, 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.

BALTZ, R. H.; DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. American Society for Microbiology Press, 2010.

BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, T.; MATSAGAR, V. Evaluation of possibilities in geothermal energy extraction from oceanic crust using offshore wind turbine monopiles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 92, p. 685-700, 2018.

BARAJAS-ACEVES, M. *et al.* Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, 50, n. 3, p. 227-236, 2002.

BASTOS, V. D. Biorrefinarias, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento. **Revista do BNDES, Rio de Janeiro**, n. 38, p. 85-138, 2012.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 86, p. 656-669, 2016.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; HU, H.; WANG, W. *et al.* Metabolic engineering and enzyme-mediated processing: A biotechnological venture towards biofuel production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 82, n. Part 1, p. 436-447, 2018.

CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANDEL, A. K. *et al.* The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**, 264, p. 370-381, 2018.

CHANG, F. *et al.* Carbohydrate-binding module assisted purification and immobilization of β-glucosidase onto cellulose and application in hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 125, n. 2, p. 185-191, 2018.

CHEN, X. *et al.* Catalytic fast pyrolysis of biomass to produce furfural using heterogeneous catalysts. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, 127, n. Supplement C, p. 292-298, 2017.

CHRISTOFF, A. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **White Paper Neoprospecta**, 2017.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

CONAB. Análise Mensal. Mandioca, 2018. Disponível em:< www.conab.gov.br › historico-mensal-de-mandioca › item › download>. Acesso em: fevereiro de 2020.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CRUZ MUÑOZ, R. *et al.* Producción de pigmentos de Pycnoporus sanguineus en medio de cultivo sólido. **Agrociencia**, 49, n. 4, p. 347-359, 2015.

CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Effect of a novel method for in-house cellulase production on 2G ethanol yields. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 9, n. Supplement C, p. 224-229, 2017.

DA ROSA, E. B. **Biorremediação e aproveitamento de resíduos de pó de fumo por Pycnoporus sanguineus.** 2016. 55 (Mestrado). Programa de Pós Gradução em Tecnologia Ambiental, Unisc, Santa Cruz do Sul.

DA SILVA, A. S. A.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S. *et al.* Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource technology**, 101, n. 19, p. 7402-7409, 2010.

DA SILVA, J. A.; PIRES BIANCHI, M. D. L. Cientometria: a métrica da ciência. **Paidéia**, 11, n. 21, 2001.

DA SILVA, N. M. *et al.* Avaliação da produção de biomassa a partir de um isolado amazônico do fungo Pycnoporus sanguineus através do aproveitamento do resíduo de laranja. *In*: 62 REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2010, Natal.

DALENOGARE, L. S.; BENITEZ, G. B.; AYALA, N. F.; FRANK, A. G. The expected contribution of Industry 4.0 technologies for industrial performance. **International Journal of Production Economics**, 204, p. 383-394, 2018.

DE FIGUEIREDO, R. *et al.* MAPEAMENTO PROSPECTIVO DAS TECNOLOGIAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL. **Cadernos de Prospecção**, 11, n. 1, p. 127, 2018.

DE LAMOTTE, A. *et al.* Investigating the effects of hydrodynamics and mixing on mass transfer through the free-surface in stirred tank bioreactors. **Chemical Engineering Science**, 172, p. 125-142, 2017.

DE SIQUEIRA, F. G. *et al.* The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 64, n. 1, p. 20-26, 2010.

DE SOUSA JABBOUR, A. B. L.; JABBOUR, C. J. C.; FOROPON, C.; GODINHO FILHO, M. When titans meet – Can industry 4.0 revolutionise the environmentally-sustainable manufacturing wave? The role of critical success factors. **Technological Forecasting and Social Change**, 132, p. 18-25, 2018.

DE SOUZA, W. R. Microbial degradation of lignocellulosic biomass. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, p. 207-247, 2013.

DEKA, D.; JAWED, M.; GOYAL, A. Purification and characterization of an alkaline cellulase produced by Bacillus subtilis (AS3). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 43, n. 3, p. 256-270, 2013.

DEMIRBAŞ, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. **Energy Conversion and Management**, 42, n. 11, p. 1357-1378, 2001.

DESSIE, W. *et al.* Succinic acid production from fruit and vegetable wastes hydrolyzed by on-site enzyme mixtures through solid state fermentation. **Bioresource Technology**, 247, n. Supplement C, p. 1177-1180, 2018.

DHABHAI, R.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Effect of pretreatment conditions on structural characteristics of wheat straw. **Chemical Engineering Communications**, 200, n. 9, p. 1251-1259, 2013.

DJAJAKIRANA, G.; JOERGENSEN, R.; MEYER, B. Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. **Biology and Fertility of Soils**, 22, n. 4, p. 299-304, 1996.

DO NASCIMENTO FILHO, W. B.; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, 7, n. 6, p. 1968-1987, 2015.

DOS SANTOS, D. T. *et al.* Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Janus**, 3, n. 4, 2006.

DUTRA, É. J.; HILSINGER, R. A cadeia produtiva do tabaco na região Sul do Brasil: aspectos quantitativos e qualitativos. **Geografia Ensino & Pesquisa**, 17, n. 3, p. 17-33, 2013.

DWIDAR, M.; KIM, S.; JEON, B. S.; UM, Y. *et al.* Co-culturing a novel Bacillus strain with Clostridium tyrobutyricum ATCC 25755 to produce butyric acid from sucrose. **Biotechnology for Biofuels**, 6, n. 1, p. 35, 2013.

DWORKIN, J.; LOSICK, R. Developmental Commitment in a Bacterium. **Cell**, 121, n. 3, p. 401-409, 2005.

EISENTRAUT, A. **Sustainable production of second-generation biofuels**. 2010.

EL-HAGGAR, S. M. Chapter 7 - Sustainability of Agricultural and Rural Waste Management. *In*: **Sustainable Industrial Design and Waste Management**. Oxford: Academic Press, 2007. p. 223-260.

ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. **International journal of medicinal mushrooms**, 14, n. 3, 2012.

ELSEVIER, B. **Scopus: content coverage guide**. Amsterdam: Elsevier BV 2016.

ENFORS, S.-O. *et al.* Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. **Journal of biotechnology**, 85, n. 2, p. 175-185, 2001.

FALAGAS, M. E.; PITSOUNI, E. I.; MALIETZIS, G. A.; PAPPAS, G. Comparison of PubMed, Scopus, web of science, and Google scholar: strengths and weaknesses. **The FASEB journal**, 22, n. 2, p. 338-342, 2008.

FANG, X.; SHEN, Y.; ZHAO, J.; BAO, X. *et al.* Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. **Bioresource Technology**, 101, n. 13, p. 4814-4819, 2010.

FENG, C.; ZOU, S.; LIU, C.; YANG, H. *et al.* Ethanol production from acid-and alkali-pretreated corncob by endoglucanase and β-glucosidase co-expressing Saccharomyces cerevisiae subject to the expression of heterologous genes and nutrition added. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, n. 5, p. 86, 2016.

FENILLI, T. A. B.; SCHORN, L. A.; NASATO, S. K. Utilização do pó de fumo no substrato para produção de mudas de tucaneira. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, 8, n. 2, 2010.

FERES, P. F. D. **Os biocombustíveis na matriz energética alemã: possibilidades de cooperação com o Brasil**. Brasília: Fundação Alexandre de Gusmão, 2010.

FERREIRA, V. F.; DA ROCHA, D. R.; DA SILVA, F. D. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares Potentiality and opportunity in the chemistry of sucrose and other sugars. **Química Nova**, 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FERREIRA-LEITAO, V. *et al.* Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, 1, n. 1, p. 65-76, 2010.

FREITAS, S. *et al.* Pré-tratamento de resíduos agro-industriais e novas perspectivas na produção de bioprodutos. **SINAFERM 2013-Anais do XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, p. 1-4, 2013.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature protocols**, 4, n. 5, p. 732, 2009.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science & Technology**, 26, n. 2, p. 68-87, 2012.

GAO, W. *et al.* Optimization of mineral salts in medium for enhanced production of pullulan by Aureobasidium pullulans HP-2001 using an orthogonal array method. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 15, n. 5, p. 837-845, 2010.

GAO, Y.; CHEN, T.; BREUIL, C. Ergosterol—a measure of fungal growth in wood for staining and pitch control fungi. **Biotechnology techniques**, 7, n. 9, p. 621-626, 1993.

GAUDIO, A.; ZANDONADE, E. P. Validação e Análise dos Modelos que Correlacionam Estrutura Química e Atividade Biológica. **Quim. Nova**, 24, n. 5, p. 658-671, 2001.

GEETHA, K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of nutrient medium containing agricultural waste for xylanase production by Bacillus pumilus B20. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 15, n. 5, p. 882-889, 2010.

GESSNER, M. O.; BAUCHROWITZ, M. A.; ESCAUTIER, M. Extraction and quantification of ergosterol as a measure of fungal biomass in leaf litter. **Microbial Ecology**, 22, n. 1, p. 285-291, 1991.

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

GOMES, D. G. *et al.* Insights into the economic viability of cellulases recycling on bioethanol production from recycled paper sludge. **Bioresource Technology**, 267, p. 347-355, 2018.

GONCALVES, G. A. *et al.* Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. **Enzyme and microbial technology**, 72, p. 16-24, 2015.

GONÇALVES, A. R. *et al.* Integrated processes for use of pulps and lignins obtained from sugarcane bagasse and straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, 123, n. 1, p. 821-826, 2005.

GOYAL, V. *et al.* Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase production using pretreated rice straw by Bacillus sp. 313SI under stationary and shaking conditions. **Biotechnology research international**, 2014, 2014.

GREENBERG ARNOLD, E.; CLESCERI LENORE, S. Standard methods for the examination of water and wastewater. USA: American Public Health Association; ISBN 0-87553-207-1 1992.

GUERRERO, A. B.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. **Fuel**, 213, n. Supplement C, p. 176-185, 2018.

GUEVARA, A. J. D. H.; SILVA, O. R. D.; HASEGAWA, H. L.; VENANZI, D. Evaluation of Sustainability of Brazilian Ethanol Production: A model in System Dynamics. **BBR. Brazilian Business Review**, 14, n. 4, p. 435-447, 2017.

GUTAROWSKA, B.; ŻAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, 48, n. 5, p. 605-610, 2009.

HALEVI, G.; MOED, H.; BAR-ILAN, J. Suitability of Google Scholar as a source of scientific information and as a source of data for scientific evaluation—Review of the Literature. **Journal of Informetrics**, 11, n. 3, p. 823-834, 2017.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: Drivers, challenges, and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 101, p. 590-599, 2019.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances**, 30, n. 6, p. 1207-1218, 2012.

HILOIDHARI, M.; DAS, D.; BARUAH, D. C. Bioenergy potential from crop residue biomass in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 32, p. 504-512, 2014.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists Washington, DC, 1975.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for biofuels**, 4, p. 36, 2011.

IMMANUEL, G. *et al*. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. **International Journal of Environmental Science & Technology**, 3, n. 1, p. 25-34, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro 2003.

IQBAL, M.; AZAM, M.; NAEEM, M.; KHWAJA, A. *et al.* Optimization classification, algorithms and tools for renewable energy: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 39, p. 640-654, 2014.

IRANMAHBOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass and Bioenergy**, 22, n. 5, p. 401-404, 2002.

IRENA. **Renewable Energy Prospects: China, REmap 2030 analysis.** IRENA. Abu Dhabi. 2014.

IRFAN, M. *et al.* Optimization of process parameters for xylanase production by Bacillus sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 9, n. 2, p. 139-147, 2016.

JAGTAP, S. *et al*. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. **Bioresource Technology**, 245, n. Part A, p. 283-288, 2017.

JAIN, L.; AGRAWAL, D. Performance evaluation of fungal cellulases with dilute acid pretreated sugarcane bagasse: A robust bioprospecting strategy for biofuel enzymes. **Renewable Energy**, 115, p. 978-988, 2018.

JOUZANI, G. S.; TAHERZADEH, M. J. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. **Biofuel Research Journal**, 2, n. 1, p. 152-195, 2015.

JUNG, Y. R.; PARK, J. M.; HEO, S.-Y.; HONG, W.-K. *et al.* Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus Penicillium sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, 76, p. 66-71, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 33, p. 188-203, 2014.

KARIM, A. *et al*. Hyper production of cellulose degrading endo (1,4) β-d-glucanase from Bacillus licheniformis KIBGE-IB2. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 8, n. 2, p. 160-165, 2015.

KAVANAGH, K. **Fungi – biology and applications**. 2° ed. John Wiley & Sons, 2005.

KESHK, S. M. Cellulase application in enzymatic hydrolysis of biomass. *In*: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**: Elsevier, 2016. p. 185-191.

KHOLIF, A. E. *et al.* Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. **Journal of Cleaner Production**, 142, n. Part 4, p. 2649-2655, 2017.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, 41, n. 1, p. 465-501, 1987.

KLOCK, U.; ANDRADE, A. S. D. Química da madeira. Curitiba: UFPR. 4**:** 85 p. 2013.

KOBAYASHI, H.; OHTA, H.; FUKUOKA, A. ChemInform Abstract: Conversion of Lignocellulose into Renewable Chemicals by Heterogeneous Catalysis. **Catal. Sci. Technol.**, 2, p. 869-883, 2012.

KOGO, T.; YOSHIDA, Y.; KOGANEI, K.; MATSUMOTO, H. *et al.* Production of rice straw hydrolysis enzymes by the fungi Trichoderma reesei and Humicola insolens using rice straw as a carbon source. **Bioresource Technology**, 233, p. 67-73, 2017.

KUIJK, S. J. A. *et al.* Fungal treatment of lignocellulosic biomass: Importance of fungal species, colonization and time on chemical composition and in vitro rumen degradability. **Animal Feed Science and Technology**, 209, 2015.

KULIĆ, G. J.; RADOJIČIĆ, V. B. Analysis of cellulose content in stalks and leaves of large leaf tobacco. **Journal of Agricultural Sciences, Belgrade**, 56, n. 3, p. 207-215, 2011.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LADEIRA, S. A. *et al.* Cellulase production by thermophilic Bacillus sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, 18, n. 2, p. 110-115, 2015.

LAMB, C. D. C. *et al.* Bioethanol production from rice hull and evaluation of the final solid residue. **Chemical Engineering Communications**, 205, n. 6, p. 833-845, 2018.

LANGE, L. *et al.* The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. **IMA fungus**, 3, n. 1, p. 87-92, 2012.

LARSSON, G. *et al.* Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. **Bioprocess Engineering**, 14, n. 6, p. 281-289, 1996.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products::(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. **Bioresource Technology**, 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LAUSCHNER, M. H. *et al.* Utilização de resíduos de agroindústria fumageira como corretivo de acidez em diferentes solos1. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, 18, n. 1, p. 75-80, 2012.

LEE, H. *et al.* Utilization of agricultural residues for enhancement of cellulolytic enzyme production and enzymatic saccharification by Trichoderma harzianum KUC1716. **Industrial Crops and Products**, 109, n. Supplement C, p. 185-191, 2017.

LI, J. *et al.* Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, 155, p. 258-265, 2014.

LIU, J. *et al.* Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by Trichoderma viride in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, 41, n. 11, p. 2347-2351, 2006.

LOMASCOLO, A. *et al.* Peculiarities of Pycnoporus species for applications in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, 92, n. 6, p. 1129-1149, 2011.

LOPES, M. L. *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47, p. 64-76, 2016.

LOPES, S. *et al.*, A Bibliometria e a Avaliação da Produção Científica: indicadores e ferramentas. *In*: Actas dos Congressos Nacionais de Bibliotecários, Arquivistas e Documentalistas, n. 11, 2012.

LUO, L.; MENG, H.; GU, J.-D. Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems. **Journal of Environmental Management**, 197, p. 539-549, 2017.

LV, X. *et al.* Vacuum-assisted alkaline pretreatment as an innovative approach for enhancing fermentable sugar yield and decreasing inhibitor production of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 239, p. 402-411, 2017.

LYND, R. L.; WYMAN C. E.; GERNGROSS, U. T. Biocommodity Engineering. **Biotechnology Progress**, 15, n. 5, p. 777-793, 2008.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACHADO, C. M. M. Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos. **Brasília, DF: Embrapa Agroenergia**, 2013.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 1, n. 2, p. 105-114, 2002.

MARQUES, C. J. D. S. **Atividade de antiparasitária e antiviral de Pycnoporus sanguineus (L.: Fr.) Murr**. 2001. 73 f. (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MAWADZA, C. *et al*. Purification and characterization of cellulases produced by two Bacillus strains. **Journal of Biotechnology**, 83, n. 3, p. 177-187, 2000.

MCKINNEY, K. *et al.* Optimization of phytase production from Escherichia coli by altering solid-state fermentation conditions. **Fermentation**, 1, n. 1, p. 13-23, 2015.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. *In*: ACS Publications, 1994.

MEHER, K. *et al.* Biomethanation of tobacco waste. **Environmental Pollution**, 90, n. 2, p. 199-202, 1995.

MILLE-LINDBLOM, C.; VON WACHENFELDT, E.; TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **Journal of Microbiological Methods**, 59, n. 2, p. 253-262, 2004.

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

MOOD, S. H. *et al.* Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 27, p. 77-93, 2013.

MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; MELO, D. C. D. Chemical analysis of Pinus oocarpa wood part I: quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MORAÏS, S.; HEYMAN, A.; BARAK, Y.; CASPI, J. *et al.* Enhanced cellulose degradation by nano-complexed enzymes: synergism between a scaffold-linked exoglucanase and a free endoglucanase. **Journal of biotechnology**, 147, n. 3-4, p. 205-211, 2010.

MOSHI, A. P. *et al.* Combined production of bioethanol and biogas from peels of wild cassava Manihot glaziovii. **Chemical Engineering Journal**, 279, p. 297-306, 2015.

MOSIER, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOSTAFA, N. A. *et al.* Production of biodegradable plastic from agricultural wastes. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

MOTTA, F.; C P ANDRADE, C.; SANTANA, M. H. A review of xylanase production by the fermentation of xylan. *In*: CHANDEL A, K, SILVA. S. S. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass Techniques, Applications and Commercialization.** Intech, Rijeka, 2013. p. 251-275.

MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Méndez-Vilas, A., Ed.)**, 2, p. 897-907, 2010.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, 179, p. 28-41, 2018.

NANDA, S. *et al.* An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 50, p. 925-941, 2015.

NAYAK, A.; BHUSHAN, B. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. **Journal of Environmental Management**, 233, p. 352-370, 2019/.

NEWELL, S. Y.; MILLER, J. D.; FALLON, R. D. Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. **Mycologia**, 79, n. 5, p. 688-695, 1987.

NGUYEN, Q.; BOWYER, J.; HOWE, J.; BRATKOVICH, S. *et al.* Global production of second generation biofuels: Trends and influences. **Dovetail Partners Inc**, 2017.

NIENOW, A. Hydrodynamics of stirred bioreactors. **Appl. Mech. Rev .** 51(1), p. 3-32, 1998.

NIENOW, A. W. Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 42, n. 11, p. 789-796, 2009.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, 198, p. 119-124, 2016.

NYKO, D. *et al.* A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, n. 32, p. 5-48, 2010.

OLSSON, P. A. *et al.* Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 159, n. 1, p. 7-10, 2003.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 7, n. 3, 2012.

PASTINEN, O. *et al.* Fractionation process for the protective isolation of ergosterol and trehalose from microbial biomass. **Process Biochemistry**, 58, p. 217-223, 2017.

PATRA, S. K.; BHATTACHARYA, P.; VERMA, N. Bibliometric study of literature on bibliometrics. **DESIDOC Journal of Library & Information Technology**, 26, n. 1, 2006.

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M. *et al.* Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, 33, n. 6, Part 2, p. 1091-1107, 2015.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; DE OLIVEIRA MORAES, I. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, 2, n. 1, 2007.

PENGILLY, C. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. **Fuel**, 154, p. 352-360, 2015.

PETZOLD-WELCKE, K.; SCHWIKAL, K.; DAUS, S.; HEINZE, T. Xylan derivatives and their application potential – Mini-review of own results. **Carbohydrate Polymers**, 100, p. 80-88, 2014.

PLEISSNER, D.; KWAN, T. H.; LIN, C. S. K. Fungal hydrolysis in submerged fermentation for food waste treatment and fermentation feedstock preparation. **Bioresource Technology**, 158, p. 48-54, 2014.

POGGI-VARALDO, H. M. *et al.* Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: a review. **Waste Management & Research**, 32, n. 5, p. 353-365, 2014.

POLIZELI, M.; RIZZATTI, A.; MONTI, R.; TERENZI, H. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POLTRONIERI, P. Chapter 6 - Tobacco Seed Oil for Biofuels. *In*: POLTRONIERI, P. e D'URSO, O. F. (Ed.). **Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products**: Elsevier, 2016. p. 161-187.

PRIMO, D. C. *et al.* Avaliação da qualidade nutricional de composto orgânico produzido com resíduos de fumo. **Revista Brasileira de Engenharia Agricola e Ambiental-Agriambi**, 14, n. 7, 2010.

PRONYK, C. *et al.* Correlation of total ergosterol levels in stored canola with fungal deterioration. **Journal of Stored Products Research**, 42, n. 2, p. 162-172, 2006.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, 101, n. 24, p. 9624-9630, 2010.

QUIROZ-CASTANEDA, R. E. *et al.* Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi Bjerkandera adusta and Pycnoporus sanguineus. **Biodegradation**, 22, n. 3, p. 565-572, 2011.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. *et al.* Characterization of cellulolytic activities of Bjerkandera adusta and Pycnoporus sanguineus on solid wheat straw medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, 12, n. 4, p. 5-6, 2009.

RAINER, J.; F, T. A.; DOMINIK, R.; RITA, M. Production facilities for second-generation biofuels in the USA and the EU – current status and future perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 7, n. 6, p. 647-665, 2013.

RAINER, J.; TURHOLLOW, A. F.; RUTZ, D.; MERGNER, R. Production facilities for second-generation biofuels in the USA and the EU – current status and future perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 7, n. 6, p. 647-665, 2013.

RAJAK, R. C.; BANERJEE, R. Enzyme mediated biomass pretreatment and hydrolysis: a biotechnological venture towards bioethanol production. **RSC Advances**, 6, n. 66, p. 61301-61311, 2016.

RAMOS, J. L.; VALDIVIA, M.; GARCÍA-LORENTE, F.; SEGURA, A. Benefits and perspectives on the use of biofuels. **Microbial Biotechnology**, 9, n. 4, p. 436-440, 2016.

RASTOGI, G. *et al.* Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. **Bioresource Technology**, 101, n. 22, p. 8798-8806, 2010.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, 199, p. 92-102, 2016.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by Bacillus subtilis strain LFS3. **Extremophiles**, 16, n. 4, p. 637-644, 2012.

REESE, E. T. Enzymatic hydrolysis of cellulose. **Applied microbiology**, 4, n. 1, p. 39, 1956.

REETZ, M. Enzyme Engineering by Directed Evolution. *In*: BALTZ R. H, D. *et al.* (Ed.). **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. American Society for Microbiology Press, Washington, 2010. 3rd., p. 466-479.

RODRIGUES, C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G. *et al.* Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. *In*: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4, cap. 8.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial biotechnology**, 2, n. 2, p. 164-177, 2009.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase Production by Bacteria: A Review. **British Microbiology Research Journal**, 3, n. 3, p. 235-258, 2013.

SAINI, A.; AGGARWAL, N. K.; YADAV, A. Cost-effective cellulase production using Parthenium hysterophorus biomass as an unconventional lignocellulosic substrate. **3 Biotech**, 7, n. 1, p. 12, 2017.

SALOMÃO, G. S. B. *et al.* Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 17, p. 1-6, 2019.

SANTOS, M. D.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. **Revista Economia & Energia,[si]**, n. 82, p. 14-32, 2012.

SANTOS, R. N. M. D.; KOBASHI, N. Y. Bibliometria, cientometria, infometria: conceitos e aplicações. **Tendências da Pesquisa Brasileira em Ciência da Informação**, 2, n. 1, p. 155-172, 2009.

SARSAIYA, S. *et al.* Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. **Bioresource Technology**, 291, p. 121905, 2019.

SAUER, S. *et al.* Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PloS one**, 3, n. 7, p. e2843, 2008.

SCHNEIDER, V. E. *et al.* **Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindustriais associadas**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). Brasília, p. 134. 2012.

SHAJAHAN, S. *et al.* Statistical modeling and optimization of cellulase production by Bacillus licheniformis NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University - Science**, 29, n. 3, p. 302-310.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHARMA, M.; KUMAR BAJAJ, B. Optimization of bioprocess variables for production of a thermostable and wide range pH stable carboxymethyl cellulase from Bacillus subtilis MS 54 under solid state fermentation. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, 36, n. 4, p. 1123-1130, 2017.

SHARMA, S.; YAZDANI, S. S. Chapter 6 - Diversity of Microbial Cellulase System. *In*: GUPTA, V. K. (Ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 49-64.

SILVA, E.; CASTRO, A.; AGUIAR, I. D. J. A. Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica Hura crepitans L. por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes. **Acta Amazonica**, 31, n. 3, p. 397-397, 2001.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass– An overview. **Bioresource technology**, 199, p. 76-82, 2016.

SINDITABACOS. Tabaco: relevância econômica e social. Santa Cruz do Sul**:** 33 p. 2019.

SINGHANIA, R. R. *et al*. Chapter 4: Cellulases. *In*: PANDEY A., NEGI, S., SOCCOL, C. R. (Ed.) **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**: Elsevier, 2017. p. 73-101.

SLUITER, A. *et al.* Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, 1617, p. 1-16, 2008.

SONG, C. *et al.* Process intensification of cellulosic ethanol production by waste heat integration. **Chemical Engineering Research and Design**, 132, p. 115-122, 2018.

SONG, M.; WANG, S. Can employment structure promote environment-biased technical progress? **Technological Forecasting and Social Change**, 112, p. 285-292, 2016.

SOUSA, E. D.; MACEDO, I. D. C. Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação. 2010.

SOUZACRUZ. **Nossos produtos: Tabaco.** 2018. Disponível em: www.souzacruz.com.br. Acesso em: 10 julho de 2018.

SPADOTTO, C. A.; RIBEIRO, W. C. **Gestão de resíduos na agricultura e agroindústria**. Botucatu: FEPAF, 2006.

SREENA, C.; SEBASTIAN, D. Cost effective cellulase production by Bacillus subtilis MUS1 using lignocellulosic biomass residues. **Biodiversity and Evaluation: Perspectives and Paradigm Shifts**, 2015, p. 268-270, 2015.

SREENA, C. P.; SEBASTIAN, D. Augmented cellulase production by Bacillus subtilis strain MU S1 using different statistical experimental designs. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 16, n. 1, p. 9-16, 2018.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 82, p. 2379-2386, 2018.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (Pachyrhizus erosus L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SWAIN, P. K. Utilisation of Agriculture Waste Products for Production of Bio-Fuels: A Novel Study. **Materials Today: Proceedings**, 4, n. 11, Part 3, p. 11959-11967, 2017.

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

SÓTI, V.; LENAERTS, S.; CORNET, I. Of enzyme use in cost-effective high solid simultaneous saccharification and fermentation processes. **Journal of Biotechnology**, 270, p. 70-76, 2018.

TEDESCO, M. J. *et al.* Land disposal potential of tobacco processing residues. **Ciência Rural**, 41, n. 2, p. 236-241, 2011.

THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from Aspergillus sp. for bioethanol production. **Renewable Energy**, 98, p. 9-15, 2016.

THOMAS, L.; RAM, H.; SINGH, V. P. Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant Bacillus sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus Bacillus. **Brazilian Journal of Microbiology**, 49, n. 2, p. 429-442, 2018.

TOIVANEN, H.; NOVOTNY, M. The emergence of patent races in lignocellulosic biofuels, 2002–2015. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 77, p. 318-326, 2017.

UNEP. **GLOBAL TRENDS IN RENEWABLE ENERGY INVESTMENT**. p. 86. 2018.

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

VIVIESCAS, C.; LIMA, L.; DIUANA, F. A.; VASQUEZ, E. *et al.* Contribution of Variable Renewable Energy to increase energy security in Latin America: Complementarity and climate change impacts on wind and solar resources. **Renewable and sustainable energy reviews**, 113, p. 109232, 2019.

VOHRA, M.; MANWAR, J.; MANMODE, R.; PADGILWAR, S. *et al.* Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2, n. 1, p. 573-584, 2014.

WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLOS ONE**, 4, n. 10, p. 7401, 2009.

WANG, Z.; CAO, G.; ZHENG, J.; FU, D. *et al.* Developing a mesophilic co-culture for direct conversion of cellulose to butanol in consolidated bioprocess. **Biotechnology for Biofuels**, 8, n. 1, p. 84, 2015.

WEETE, J.; GANDHI, S. Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. *In*: **Biochemistry and Molecular Biology**: Springer, 1996. p. 421-438.

WEETE, J. D. Structure and function of sterols in fungi. *In*: **Advances in lipid research**: Elsevier, 1989. v. 23, p. 115-167.

WHITE, W. L.; MANDELS, G.; SIU, R. Fungi in relation to the degradation of woolen fabrics. **Mycologia**, 42, n. 2, p. 199-223, 1950.

WYMAN, V. *et al.* Lignocellulosic waste valorisation strategy through enzyme and biogas production. **Bioresource Technology**, 247, n. Supplement C, p. 402-411, 2018.

XIAO, Z. *et al*. **Effects of sugar inhibition on cellulases and β-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates**. Springer. 1115-1126, 2004.

YANG, S. Q. *et al.* High-level of xylanase production by the thermophilic Paecilomyces themophila J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, 97, n. 15, p. 1794-1800, 2006.

YE, Y.; LI, X.; CAO, Y.; DU, J. *et al.* A β-xylosidase hyper-production Penicillium oxalicum mutant enhanced ethanol production from alkali-pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, 245, p. 734-742, 2017.

YIN, L.-J.; LIN, H.-H.; XIAO, Z.-R. Purification and characterization of a cellulase from Bacillus subtilis YJ1. **Journal of Marine Science and Technology**, 18, n. 3, p. 466-471, 2010.

YU, H.-Y.; LI, X. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, Gracilibacillus sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 81, p. 19-25, 2015.

ZHA, Y. *et al.* Inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates during hydrolysate fermentation processes. **J Bioprocess Biotech**, 2, n. 1, p. 112-122, 2012.

ZHANG, X.; LI, Y.; ZHAO, X.; BAI, F. Constitutive cellulase production from glucose using the recombinant Trichoderma reesei strain overexpressing an artificial transcription activator. **Bioresource Technology**, 223, p. 317-322, 2017.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, X.; LIN, Q.; BROOKES, P. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? **Soil Biology and Biochemistry**, 37, n. 2, p. 311-317, 2005.

APÊNDICE A – *Screenning* e isolamento de micro-organismos do RPT

Screenning

Para encontrar isolados com potencial de biorremediar o resíduo pó de tabaco foi adotado a técnica de screening da amostra de resíduo pó de tabaco para o isolamento e identificação preliminar dos micro-organismos com potencial de produção enzimática.

Pesou-se 25 g do resíduo, assepticamente, diluiu-se em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril e homogeneizou-se por agitação em BagMixer® durante 1 minuto (diluição 10-1). Após, o sobrenadante foi disposto em erlenmeyer procedendo-se com a diluição seriada (até diluição 10-7). O volume de 0,1 mL de cada diluição foi semeado em superfície de ágar Nutriente – AN (Extrato de carne 0,3%, peptona bacteriológica 0,5% e ágar bacteriológico 1,5%), para isolamento de bactérias, e ágar Sabouraud- AS (Dextrose 40%, peptona 10%, ágar bacteriológico 20%) para isolamento de fungos. As placas contendo meio AN, foram incubadas a 30°C por 3 dias e aquelas contendo o meio AS, incubadas a 25°C por 3-5 dias.

Os micro-organismos isolados foram identificados a partir de suas características morfológicas macroscópicas e pela forma, arranjo e reação tintorial das células (características microscópicas).

Para isolamento em cultura pura os micro-organismos foram individualmente estriados por esgotamento em placas de AN ou AS. Os isolados foram cultivados e armazenados sob refrigeração (4°C), com repliques mensais para manutenção da cultura. Para o armazenamento do isolado bacteriano, 0,8 mL da amostra crescida em caldo Brain Heart Infusion – BHI (Infuso cérebro coração 17,5%, peptona 10%, dextrose 2%, cloreto de sódio 5%, fosfato dissódico 2,5%), foi adicionada em 0,2 mL de glicerol e mantidas à temperatura de -20ºC (BALTZ *et al*., 2010).

A partir dos diferentes micro-organismos isolados, foi feita a inoculação em placas de Petri contendo os meios AS para os fungos e AN para as bactérias e incubadas por 5 dias a 25°C e 30°C, respectivamente. Após esse período, as colônias foram repicadas para o centro de placas de Petri contendo o meio sólido indicativo para atividade enzimática específica. Foram analisadas qualitativamente as atividades enzimáticas, em triplicata, por meio das seguintes provas enzimáticas:

(i) Pectinase: Os isolados foram semeados por picada em Ágar Pectina e incubados até crescimento das colônias. A revelação do halo de hidrólise se deu através da adição sobre a

BALTZ, R. H.; DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. **Manual of industrial microbiology and biotechnology.** American Society for Microbiology Press, 2010.

colônia de uma solução de iodo-iodeto de potássio (1,0 g iodo; 5,0 g iodeto de potássio; 330 mL água) por 5 minutos (SOARES *et al.*, 1999).

(ii) Amilase: Os isolados foram semeados por picada em Ágar Amido como indutor e indicador de atividade. A revelação da atividade enzimática foi realizada através da adição sobre as colônias uma solução de iodo (lugol) durante 5 minutos.

(iii) Protease: Os isolados foram semeados por picada em Ágar Leite Desnatado – ALD e incubadas até o crescimento das colônias. A expressão metabólica foi evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, decorrente do metabolismo microbiano sobre as proteínas existentes no meio.

(iv) Celulase: Os isolados foram semeados por picada em Ágar Endoglucanase (carboximetilcelulose 10%; extrato de levedura 0,6%; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,25%; fosfato monobásico de potássio 0,7%; fosfato dibásico de potássio 0,2%; sulfato de amônio 1%; ágar bacteriológico 20%). As placas foram incubadas até crescimento das colônias. A revelação da atividade enzimática pelas endoglucanases foi realizada através da adição sobre as colônias uma solução de Vermelho Congo 1,4% + Tampão Tris HCl 0,1 M durante 30 minutos e em seguida, o excesso da solução foi removida com adição de NaCl 0,2 M, e lavagens sucessivas com água destilada.

As colônias foram avaliadas pela sua capacidade de hidrólise dos respectivos substratos através do índice enzimático (IE), um parâmetro semiquantitativo que correlaciona o halo de degradação do substrato e o diâmetro médio da colônia (STAMFORD et al., 1998).

Os resultados dos cálculos dos IE, para os isolados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Índice Enzimático para os isolados bacterianos para os substratos pectina, amido, celulase e protease

Isolado	**Pectinase IE (média)**	**Amilase IE (média)**	**Celulase IE (média)**	**Protease IE (média)**
JB1	2,267±0,274	1,094±0,088	4,180±0,489	1,046±0,017
JB2	1,199±0,071	0,000	2,178±0,402	5,233±0,243
JB3	2,265±0,485	1,010±0,036	5,181±0,272	1,096±0,020
JB4	1,889±0,435	1,022±0,013	3,389±0,417	1,049±0,008
JB5	3,492±0,449	1,350±0,076	5,472±0,488	1,661±0,239
JB6	1,584±0,503	0,000	5,059±0,625	0,000

SOARES, M. M.; SILVA, R. D.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by Bacillus sp. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 299-303, 1999.

Identificação dos isolados empregados nos cultivos

Os micro-organismos isolados da amostra de pó de tabaco foram identificados através de suas características macro e microscópicas. Inicialmente a técnica de coloração de Gram foi empregada para a diferenciação de grupos de bactérias e a descrição morfológica das colônias.

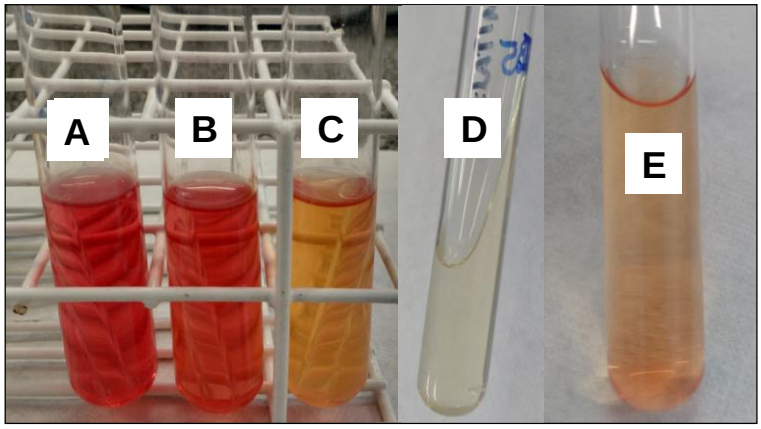
Provas metabólicas também foram utilizadas para investigação do metabolismo bacteriano, utilizando-se para tanto, o meio diferencial ágar MacConkey (identificação bactérias Gram negativas fermentadoras de lactose), ágar Cetrimida (seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*) e ágar NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) semi-seletivo para isolamento de fitopatógenos (Quadro1).

Quadro 1 - Testes metabólicos aplicados ao isolado bacteriana selecionada

Teste	Tipo de Semeadura	Incubação
Carboidratos (Glicose, Lactose e Dulcitol)	Inoculação com alça de platina	18-24 h a 37°C
Utilização do Citrato de Sódio	Estria central sobre o bisel com alça de platina	24 h a 37°C
Produção de Gás Sulfídrico, Indol e Motilidade (ágar S.I.M.)	Inoculação em picada com agulha de platina não ultrapassando 2/3 da coluna	24 h a 37°C
Produção de Urease	Inoculação com alça de platina	24 h a 35°C
Descarboxilação da lisina	Inoculação com alça de platina	18-24 h a 35°C
Hidrólise da gelatina	Inoculação em picada com agulha de platina não ultrapassando 2/3 da coluna	7-14 dias a 28-30°C
Proteólise do leite	Inoculação com alça de platina	24 h a 35°C
Descarboxilação do aminoácido lisina	Inoculação com alça de platina	7-14 dias a 28-30°C
Teste Vermelho de Metila (VM) e Voges Proskauer (VP)	Inoculação com alça de platina	24 h a 35°C

A Figura 1 demostra alguns dos resultados obtidos através das provas metabólicas (Quadro 2) aplicadas ao isolado JB5. Pela identificação metabólica, reação tintorial e aspectos morfológicos do isolado observados através de microscopia, refere-se a uma bactéria do gênero *Bacillus* sp. Em relação a identificação molecular do isolado, os resultados demostraram-se inconclusivos, havendo, portanto, a necessidade de encaminhamento externo para a realização dessa análise.

Figura 1 - Resultado dos testes metabólicos aplicados ao isolado JB5 (A, B, e C- Hidrólise do dulcitol, lactose e glicose, respectivamente, em D- Hidrólise da gelatina, e em E- Hidrólise de ureia)



Quadro 2 - Resultados das provas metabólicas aplicadas ao isolado JB5

Prova metabólica	**Resultado obtido para o isolado JB5**	**Resultado conforme literatura**
Fermentação de carboidratos (Glicose, Lactose, Dulcitol)	Positiva sem produção de gás	Dulcitol (+)[1], Lactose (variável) [1], Glicose (+)[1]
Utilização de Citrato	Negativo	Positivo[1]
Urease	Negativo	Negativo[1]
Produção de H_2S	Negativo	Negativo[1]
Indol	Negativo	Negativo[1]
Motilidade	Negativo	Positiva[1]
Proteólise do Leite	Negativo	-
Hidrólise da Gelatina	Positiva	Positiva[1]
Descarboxilação da lisina	Negativo	Negativa[1]
Crescimento em meio MacConkey, Cetrimida, NYDA	Negativo	McConkey (negativo)[2], Cetrimida (negativo)[3], NYDA (-)[3]
Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VP)	Negativo	VM (negativo)[1] e VP (positivo)[2]
Fenilalanina desaminase	Negativo	Negativo[1]

Legenda: 1- Aryal (2016), 2- Biopaddles™, 3- Lowbury e Collins (1955)

Ao comparar esses resultados com aqueles conferidos à espécie *B. subtilis* por Biopaddles™; Lowbury e Collins (1955); Gordon *et al.* (1973) e Aryal (2016) verifica-se grande similaridade de informações. Salienta-se que os resultados ditos positivos para as provas metabólicas, são representativos para 85-100% os isolados testados (Gordon *et al.*, 1973), o que

poderia justificar os resultados diferenciados, ou mesmo erro de interpretação frente aos resultados obtidos experimentalmente.

LOWBURY, E. J. L., COLLINS A. G. 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for Pseudomonas aeruginosa. **J. Clin. Pathol**. 8:47.
GORDON, R. E.; HAYNES, W.; PANG, C. H.-N. The genus bacillus. **US Department of Agriculture handbook**, n. 427, p. 109-26, 1973.
ARYAL, S**. Biochemical Test and Identification of *Bacillus subtilis***. 2016.

ANEXOS

ANEXO A

29° Congresso de Microbiologia – Resumo em Anais

TITLE: PRODUCTION OF BACTERIAL ENZYMES FROM TOBACCO POWDER RESIDUE

AUTHORS: ROTH, J.C.G; HOELTZ, M.; MÜLLER, A.P.; BENITEZ, L.B.

INSTITUTION: UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL, UNISC, SANTACRUZ DO SUL, RS (AVENIDA INDEPENDÊNCIA, 2293, CEP 96816-501,SANTA CRUZ DO SUL – RS, BRAZIL)

ABSTRACT:
The development of bioprocesses allows the use of many microorganisms for the treatment and/or remediation of a wide variety of industrial residues, such as tobacco powder (*Nicotiana tabacum L.*). Tobacco powder, resulting from the processing of tobacco, is an abundant residue in southern Brazil and large quantities are deposited directly in the crops leading to accumulationt of substances often harmful to the environment. The objective of this work was to search for alternatives to the use of tobacco powder through the isolation of bacteria and to evaluate the potential of the isolates in the production of enzymes of industrial interest. The centesimal composition of the residue was performed according to the Adolfo Lutz Institute. The bacterial prospection was conducted by serial dilution in Nutrient Agar. After incubation, at 30ºC for 72 h, bacteria were isolated according to their distinct morphological characteristics and pre-characterized by the form and tinctorial reactions of the cells. The enzymatic activity of cellulase, protease, amylase and pectinase of the isolates was determined by the ratio between the mean diameter of the degradation halo and the mean colony diameter expressed as Enzyme Index (EI), spiked in specific media, incubated at 30ºC for up to 5 days. The isolate with higher EI was identified through biochemical tests. The residue had the following centesimal composition: moisture content: 13.75 ± 0.19; Proteins: 18.12 ± 0.38; Ashes: 12.46 ± 0.18; Lipids: 4.14 ± 0.22; Carbohydrates: 6.24 ± 2.30. A total of six different bacterial colonies were isolated from the tobacco powder. After the enzymatic tests, the isolate with the highest and most extensive enzymatic activity was selected, with EI-pectinase = 3,492 ± 0,449; EI-cellulase = 5.472 ± 0.488; EI-amylase = 1,350 ± 0,076; EI-protease = 1.661 ± 0.239. The isolate was identified as a Gram positive rod, glucose and lactose fermenter and gelatin hydrolysis positive. The results for urease, lysine decarboxylase, phenylalanine deaminase, VP (Voges Proskauer), MV (methyl red) and citrate use were negative. The partial identification suggests a bacterium of the genus *Bacillus*. In the liquid phase fermentation studies, the selected bacterium has shown similar metabolic behavior in both the BHI commercial medium and in the tobacco powder medium. The tested isolate showed, until now, a good potential for the bioconversion of the tobacco powder in enzymes with industrial application.

Keywords: tobacco powder, enzymatic activity, bioprocess
Financial support: CAPES, FAPERGS

ANEXO B

X Salão de Ensino e Extensão, XXV Seminário de Iniciação Científica -Resumo em Anais (ISSN: 2618- 8685)

PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS PRODUTORAS DE ENZIMA EM MEIO ALTERNATIVO PÓ DE FUMO

Ana Paula Müller, Joyce Cristina Gonçalvez Roth, Michele Hoeltz, Lisianne Brittes Benitez

Resumo

Em virtude das quantidades e de certas características das substâncias poluidoras, como persistência e toxicidade, a poluição ambiental representa um perigo para a saúde humana, de animais e de plantas, além de comprometer a habilidade ambiental para sustentação da vida. Deste modo, reduzir e/ou remediar estes poluentes é extremamente necessário à melhoria da qualidade ambiental. O objetivo desse trabalho é a prospecção de microrganismos produtores de enzimas, cultivados em meio contendo o resíduo industrial pó de fumo, como alternativa em etapas de tratamento de efluentes da indústria fumageira. Para isso, a triagem de bactérias presentes no resíduo foi realizada pela técnica de diluição seriada e semeadura em Ágar Nutriente. Após incubação a 30ºC por 72 h as bactérias foram isoladas de acordo com as características macroscópicas das distintas colônias e pré-identificadas pela forma, arranjo e reação tintorial das células. Para verificação do potencial enzimático, os isolados foram repicados para meios de cultura específicos (celulase, protease, amilase e pectinase) e incubados a 30ºC. As bactérias foram avaliadas pela sua capacidade de hidrólise dos respectivos substratos através do índice enzimático (IE). O resíduo pó de fumo foi encaminhado à Central Analítica da UNISC e caracterizado conforme a presença de metais, além do teor de cinzas. Análises complementares de nitrogênio (método Kjeldahl), fósforo (colorimetria) e verificação de princípios ativos de agrotóxicos por meio da Cromatografia Gasosa com detector de Espectrometria de Massas (CG-EM) serão realizadas na sequência do estudo. O isolado com maior IE foi submetido à identificação por provas metabólicas. Foram isoladas do resíduo pó de fumo 6 diferentes colônias bacterianas, submetidas a coloração de gram. Após os testes enzimáticos, foi selecionado o isolado que apresentou maior e mais ampla atividade enzimática, sendo IEpectinase= 3,492±0,449; IEcelulase=5,472±0,488; IEamilase=1,350±0,076; IEprotease= 1,661±0,239. O isolado, nomeado como PF1, apresentou resultados positivos para a fermentação de carboidratos (glicose, lactose e dulcitol) sem a formação de gás, hidrólise da gelatina, e resultados negativos para a hidrólise de ureia, e crescimento em ágar cetrimina, VP (Voges Proskauer) e VM (vermelho de metila), citrato, lisina descarboxilase e fenilalanina desaminase. O resíduo apresentou 40,31±1,59 % de cinzas, destacando-se na análise de metais os teores médios de Ca (296,43 mg mL^{-1}), K (305,70 mg mL^{-1}), Al (94,69 mg mL^{-1}) e Mg (71,17mg mL^{-1}). As concentrações de metais presentes diferem das concentrações encontradas em outros trabalhos, devido a sua natureza mista. O pó de fumo pode conter resíduos em proporções distintas de talo e folha, que poderiam contribuir para essa diferenciação. O isolado testado mostrou, até o momento, excelente potencial para a bioconversão do resíduo em enzimas com aplicação industrial, demonstrando através da curva de crescimento a adaptação de PF1 ao pó de fumo como substrato alternativo para crescimento.

ANEXO C

X Salão de Ensino e Extensão, XXV Seminário de Iniciação Científica -Resumo em Anais (ISSN: 2618- 8685)

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Bacillus* sp. UTILIZANDO O RESÍDUO PÓ DE TABACO COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO

Aline Otto Pfeifer, Joyce Cristina Gonçalvez Roth, Cleiciane dos Reis Rosa, Rosana de Cássia de Souza Schneider, Michele Hoeltz, Lisianne Brittes Benitez

Resumo

Os resíduos gerados durante os processos agroindustriais representam desperdício e podem gerar graves problemas de poluição ao ambiente. Na região sul do Brasil a produção de resíduos associados à indústria do fumo é significativa, destacando-se o pó de tabaco. Este resíduo lignocelulósico tem sido depositado diretamente no solo como fertilizante, entretanto ainda não se conhece os efeitos desta deposição a longo prazo. A produção de biocompostos a partir de resíduos agroindustriais é uma alternativa que além de agregar valor ao resíduo pode reduzir seu volume impactando positivamente na qualidade do ambiente. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar a produção de enzimas celulases pela bactéria *Bacillus* sp. quando cultivada em meio contendo o resíduo industrial pó de tabaco. A metodologia proposta utilizou o cultivo em fase submersa, testando três diferentes temperaturas (27, 33 e 37°C), para promover o crescimento do microrganismo e a consequente produção de celulases. Para isso, dois diferentes meios foram utilizados, o meio Caldo Padrão (CP) composto de BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de 2% de Carboximetilcelulose (CMC) e o meio Caldo Pó de Tabaco (CPT) (10 g L^{-1}), obtido através da infusão do resíduo em água fervente e posterior filtração. Aos caldos estéreis adicionou-se um volume de 10% de um pré-inóculo da bactéria, preparado a partir da inoculação do microrganismo em 20 mL de caldo BHI estéril, mantida a 35ºC *overnight* sob agitação (150 rpm). A fermentação foi conduzida nas três diferentes temperaturas propostas (27, 33 e 37°C), sob agitação de 150 rpm e pH inicial de 7, durante 288 horas. Para a determinação da atividade enzimática foram retiradas alíquotas de ambos os caldos em intervalos regulares de 24 horas. Para a extração das enzimas em meio líquido, as alíquotas foram centrifugadas (5000 rpm, por 20 minutos), e o sobrenadante utilizado para a análise da atividade enzimática. Para cada complexo enzimático uma metodologia diferenciada foi adotada. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível em comprimento de onda de 540 nm, acompanhadas por controles. As atividades enzimáticas das celulases produzidas pela bactéria *Bacillus* sp. resultaram em diferentes valores para cada temperatura testada. No Caldo Padrão (CP) as atividades foram maiores se comparadas ao Caldo Pó de Tabaco (CPT). A atividade da CMCase (endoglucanases) atingiu valor máximo para o CP após 48 horas de atividade a 37ºC (4,770UI/mL), e em CPT se observou uma elevação da atividade no último tempo de observação, correspondente a 288 horas de cultivo. A atividade de exoglucanase (Avicelase) teve sua maior atividade em CP na temperatura de 28ºC (4,184 UI/mL) e em CPT em 37ºC (1,947 UI/mL), igualmente em 288h de cultivo. Os valores para a atividade celulolítica total (FPase) foram semelhantes para todas as temperaturas testadas, tanto

em CPT quanto em CP. Considerando os maiores valores de atividade enzimática encontrados para cada meio é possível observar que não houveram diferenças que possam ser consideradas significativas. A atividade de beta-glicosidase teve seu valor máximo atingido após 288 horas de atividade a 28ºC (1,433 UI/mL) para o CP e a 33ºC (1,147 UI/mL) para o CPT. Concluiu-se que embora o caldo padrão tenha apresentando os maiores índices de atividade enzimática o pó de tabaco como substrato alternativo mostrou-se eficiente para aplicação na obtenção de celulases pela bactéria *Bacillus* sp.

ANEXO D

X Salão de Ensino e Extensão, XXV Seminário de Iniciação Científica -Resumo em Anais (ISSN: 2618- 8685)

OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE CELULASES DE BACILLUS SP. POR CULTIVO EM FASE SUBMERSA A PARTIR DO RESÍDUO PÓ DE TABACO

Renata Luiza Scherer, JOYCE CRISTINA GONÇALVEZ ROTH, Elton Mateus Kipper Schuch, Michele Hoeltz, Lisianne Brittes Benitez

Resumo

Os processos que geram produtos biotecnológicos têm obtido cada vez mais importância no desenvolvimento da tecnologia ao redor do mundo. A destinação dos resíduos produzidos pelas agroindústrias para a produção de biocompostos tem sido uma alternativa utilizada para agregação de valor aos resíduos. Enzimas microbianas, como as celulases, são um dos principais produtos obtidos através de processos biotecnológicos como o cultivo em fase submersa. O rendimento produtivo de enzimas depende de avaliações da inter-relação de uma variedade de fatores abióticos que contribuem para a otimização da produção de celulases. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os melhores fatores abióticos para condução de um cultivo submerso utilizando-se uma bactéria do gênero *Bacillus* sp., isolada do resíduo pó de tabaco, através do planejamento experimental de Composto Central (CC) e análise de superfície de resposta visando otimizar a produção de celulases totais (FPase). O design de CC avaliou 5 fatores, e 3 pontos centrais, totalizando 29 ensaios, nos quais foi medida a atividade enzimática total (FPase) em UI mL^{-1}. Os fatores foram avaliados em 5 diferentes níveis (-a, -1, 0, +1, +a) e incluíram: temperatura (°C); velocidade de agitação (rpm); concentração do resíduo (g/L); quantidade de inóculo bacteriano (%); e concentração de Tween 80 (%). O pH foi fixado em 5 durante os experimentos. A matriz de planejamento e a avaliação das respostas foram obtidas através do *software* Statistica. O caldo de cultivo foi obtido através de uma infusão com o resíduo de pó de tabaco em diferentes concentrações. O inóculo foi preparado em caldo BHI estéril, mantido a 35ºC, *overnight* sob agitação (150 rpm), com concentração inicial determinada através da densidade óptica (0,9 a 1). Os resultados na produção de FPase, em 48 horas de fermentação, variaram de 0,8647 até 5,2933 UI mL^{-1}, reforçando a importância de avaliar-se a influência da variação dos diferentes fatores na produção de celulases durante o processo fermentativo. Os fatores considerados significativos (p=0,01) foram a temperatura, velocidade de agitação e concentração de inóculo, permitindo a obtenção da equação de regressão linear de segunda ordem $Y=-23,613+0,444T+0.113A-0.0025T^2-0.0002A^2-0.0392I^2$ com $R^2=0.87287$. A falta de ajuste (*Lack of fit*) não foi significativa, demostrando que o modelo proposto é adequado. A análise da superfície de resposta demostrou que condições otimizadas para a validação do modelo predito pelo *software* deverão ocorrer em: temperatura de 70°C, velocidade de agitação de 180 rpm, 55 g/L de pó de tabaco, 8% de inóculo, 4% de Tween 80. A condução dessa validação vem sendo realizada pelo grupo de pesquisa a partir de um processo de cultivo em fase submersa em um biorreator de 5 L. Concluiu-se que os resultados de otimização do processo fermentativo são bastante promissores considerando que o pó de tabaco, produzido em grandes quantidades pela indústria do tabaco, ao ser utilizado como indutor da produção de celulases pode otimizar a eficiência do agronegócio, além de reduzir os impactos negativos ao meio ambiente.

ANEXO E

XXXVIII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUCÃO – Artigo completo em Anais (ISSN: 2594-9713, doi: 10.14488/enegep2018_tn_stp_266_528_35936)

"CONTRIBUIÇÃO PARA GESTÃO DE RESÍDUOS NA INDÚSTRIA DO FUMO PELA OBTENÇÃO DE CELULASES A PARTIR DO PÓ DE TABACO"

Lisianne BRITTES BENITEZ lisianne@unisc.br
CLEICIANE DOS REIS ROSA cleicianereis.fgf77@gmail.com
Michele Hoeltz hoeltz@unisc.br
Aline Otto Pfeifer alineotto@hotmail.com
Joyce Cristina Gonçalvez Roth joyce_goncalvez@hotmail.com

Os resíduos representam matéria-prima não utilizada e, portanto, ações que busquem o seu reaproveitamento/reciclagem são essenciais na busca da sustentabilidade. A disponibilidade desses materiais é dependente diretamente do processamento da matéria prima e poderá variar conforme a realidade regional-local. O objetivo deste estudo foi demostrar uma alternativa para a destinação final dos resíduos sólidos gerados pela indústria do fumo na região sul do Brasil. O resíduo pó de tabaco, cedido por uma indústria de processamento de tabaco localizada no município de Santa Cruz do Sul-RS, foi utilizado como substrato alternativo para a produção de celulases por uma cepa de Bacillus sp., isolada do próprio resíduo, a partir da técnica de Cultivo em Fase Submersa. Foram testadas as atividades das enzimas FPase, Celobiase, Avicelase e CMCase em três diferentes temperaturas, mantidas fixas as variáveis pH (7,0) e velocidade de agitação (150 rpm) do meio. Para fins de comparação utilizou-se como controle o meio composto de BHI + 2% CMC. Como resultados preliminares observou-se que a temperatura de 33ºC foi a que apresentou maiores índices de atividade para a maioria das enzimas, exceto para a avicelase (27ºC), além disso, que a celobiase apresentou atividade similar em ambos os meios testados. O isolado bacteriano testado mostrou, até o momento, boa adaptação de CBJB5 ao pó de tabaco como substrato alternativo para crescimento. O resíduo pó de tabaco permitiu o desenvolvimento da bactéria através da produção de enzimas do complexo celulolítico, entretanto salienta-se que as melhores condições para maximização dessa produção, ainda serão melhor exploradas. Palavras-chave: resíduo industrial, Pó de tabaco, celulases, Cultivo em Fase Submersa

ANEXO F

1º Congresso de Inovação e Biotecnologia – InovaBiotec – Resumo em Anais (ISBN: 978-85-8167-283-0)

Caracterização química do resíduo pó de tabaco para emprego em bioprocessos

Joyce Cristina Gonçalvez Roth[1] , L. B. Benitez[1], M. Hoeltz[1]
1 Universidade de Santa Cruz do Sul - Unisc

Resumo: Uma gestão eficiente dos resíduos dos diversos processos produtivos é uma premissa obrigatória de acordo com a legislação ambiental vigente e é de responsabilidade das indústrias geradoras desenvolver/modificar processos ou buscar soluções sustentáveis para essa questão. Este trabalho teve como objetivo analisar as propriedades químicas do pó de tabaco procurando identificar seu potencial de uso em bioprocessos. A amostra do resíduo pó de tabaco foi cedida por uma indústria fumageira, do munícipio de Santa Cruz do Sul/RS. O teor de umidade, proteínas, cinzas, lipídeos e metais foram determinados por métodos clássicos. A determinação dos açúcares foi feita através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu) com detector RID-20A, e a interpretação dos dados analíticos, através do software RealTime Analyses (GPC-System). O teor de lignina presente na amostra, foi determinado através da filtração a vácuo do conteúdo presente no interior do frasco Schott, e secagem do material retido no filtro em estufa a 45°C até peso constante. Um perfil cromatográfico dos compostos presentes na amostra foi obtido a partir do infravermelho (4.000 a 600 cm-1). Em relação aos principais metais, a amostra apresentou os teores (mg/mL) de Ca, K, Al, Fe, Mn e Zn equivalentes a 296,43; 305,70; 94,69; 40,80; 5,76 e 0,96 respectivamente, pH 7,17, teor de humidade inferior a 1%, ~ 60% de cinzas e valores percentuais (%) de lipídeos, proteínas, celulose e lignina equivalentes a 3,215 ± 0,088; 20,125 ± 0,195; 30.184 ± 2.284 e 38.751 ± 7.137, respectivamente. As concentrações de metais, valor de pH e demais análises diferem daquelas encontradas em outros trabalhos. Isso pode ser justificado pela natureza mista do resíduo pó de tabaco, com proporções distintas de talo e folha, o que contribui para essa diferenciação. Conclui-se que o resíduo pode ser utilizado como substrato para o crescimento microbiano, devido à presença de açúcares fermentescíveis e ausência de metais em níveis potencialmente nocivos ao desenvolvimento biótico.

Palavras-chave: Bioprocessos, Propriedade Química, Pó de Tabaco

ANEXO G

30° Congresso Brasileiro de Microbiologia – Resumo em Anais (ISSN: 2176-414X)

TITLE: EFFECT OF ABIOTIC FACTORS IN THE PRODUCTION OF FPASES BY *Bacillus* sp. IN SUBMERSAL CULTURE USING TOBACCO POWDER RESIDUE

AUTHORS: ROTH, J.C.G., SCHUH, E.; HOELTZ, M.; BENITEZ, L.B.

INSTITUTION: UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL (AVENIDA INDEPENDENCIA, 2293, UNIVERSITÁRIO, CEP 96815-900, SANTA CRUZ DO SUL – RS, BRAZIL)

ABSTRACT:

The residue of tobacco powder is a by-product of tobacco processing and symbolizes a concern at the level of final disposal. Their conversion into bioproducts may represent an alternative from the economic and environmental point of view. The productive yield of enzymes depends on evaluations of the interrelationship of a variety of abiotic factors that contribute to the optimization of cellulase production. Thus, it is justified to evaluate the best abiotic factors for conduction of the submerged culture using an isolate of the genus Bacillus sp. through the Plackett-Burman experimental design (PB), to the enzymatic production FPase. The PB design evaluated N + 1 experiments, and 3 central points, thus totaling 15 trials considering variables described as significant. The nutritional medium was obtained by infusing the tobacco powder residue in different concentrations. The inoculum was prepared in sterile BHI broth, maintained at 35 ° C, overnight under agitation (160 rpm), with initial concentration determined by optical density (0.9 to 1). The planning matrix and the evaluation of the responses were obtained through Chemoface software v1.61. The factors were evaluated in the high (+) and low (-) levels and included: temperature (65 and 45 ° C); agitation (200 and 120 rpm); pH (5 and 9); residue (45 and 15%); inoculum (10 and 2%); NaCl (5 and 0%) and Tween80 (5 and 0%). The results in the production of FPase, in 48 hours of fermentation showed a wide variation of enzyme production, 3.4914 to 1.89 IU ml-1, emphasizing the importance of variation of various factors studied. All factors were considered significant ($p \leq 0.05$), and pH and NaCl concentration showed a negative effect on the production response of FPase. Industrially the wide range pH range found for the production of cellulases may be an important feature due to the stability conferred to the enzyme. The next step of the research will be to define the optimum levels for cellulolytic enzymatic production and their interactions through Central Compound (CC) planning using the variables considered significant in the PB planning (Temperature, agitation, residue concentration, inoculum and Tween). The NaCl concentration and pH will be maintained at the low level (-1) due to its negative effect on FPase production.

Keywords: *Bacillus*, Experimental design, FPase.

ANEXO H

Capítulo de Livro Publicado. Sustentabilidade e Responsabilidade em Foco – Volume 13, 2019. Editora Poisson (ISBN: 978-7042-068-3)

"Contribuição para Gestão de Resíduos na Indústria do fumo pela obtenção de celulases a partir do pó de tabaco"

1. Introdução

A adequada Gestão dos Resíduos possibilita melhoria no cenário econômico e ambiental das empresas que buscam atender as novas exigências de um mercado consumidor cada vez mais sensível as mudanças ambientais ao mesmo tempo em que garante economia em termos de consumo de matéria prima e de tratamento de resíduos. A Gestão Ambiental é definida como as diretrizes e atividades administrativas e operacionais aplicadas no intuito de obter efeitos positivos sobre o meio ambiente, reduzindo ou eliminando os danos e problemas causados pelas ações humanas ou também evitando que os mesmos surjam (BARBIERI, 2016).

Os resíduos representam matéria-prima não utilizada e, portanto, ações que busquem o seu reaproveitamento/reciclagem são essenciais na busca da sustentabilidade. O emprego de resíduos oriundos das agroindústrias se estende a bagaços, cascas, farelos, tortas e pó. A disponibilidade desses materiais é dependente diretamente do processamento da matéria prima e poderá variar conforme a realidade regional-local.

O resíduo pó de tabaco tem sido depositado diretamente no solo com a finalidade de melhorar a sua qualidade nutricional. Entretanto, ainda não se conhece os efeitos em longo prazo de sua deposição. Assim, buscar tecnologias de aprimoramento que visem reduzir e/ou remediar os resíduos gerados nos processos produtivos são extremamente necessárias para minimização do efeito danoso associado, e por consequência, melhoria da qualidade ambiental.

O emprego dos bioprocessos, pela produção de enzimas utilizando os resíduos lignocelulósicos gerados, atende a esta premissa, pois permite à indústria aplicar princípios norteadores da Gestão Ambiental de Resíduos ao mesmo tempo em que atende aos requisitos ambientais para minimização dos impactos ambientais inerentes as suas atividades.

O objetivo desse trabalho foi demostrar uma alternativa para a destinação final dos resíduos sólidos gerados pela indústria do fumo, que atenda aos preceitos ambientais, pela melhoria da qualidade, e econômicos, pela valorização econômica do resíduo pó de tabaco e sua conversão em bioprodutos.

2. Referencial teórico

A Gestão Ambiental visa obter ou assegurar a economia, o uso racional de matérias-primas e insumos, dando destaque à responsabilidade ambiental das empresas, buscando permanente melhoria da qualidade ambiental dos serviços, produtos e ambiente de trabalho de qualquer organização pública ou privada. Ela oferece meios eficientes para o uso dos recursos naturais, e ainda gerar lucro para as organizações, além de aplicar medidas corretivas e preventivas, a fim de corrigir ou impedir a geração de impactos adversos (LUNKES, 2008; PHILIPPI et al. 2013).

Frente a crescente cobrança por uma postura responsável e de comprometimento com o meio ambiente, as empresas têm procurado estabelecer formas de gestão com objetivos explícitos, de controle da poluição e de redução das taxas de efluentes, controlando ou minimizando os impactos ambientais como também otimizar o uso de recursos naturais – controle de uso da água, energia, e outros insumos. Empresas e indústrias de vários setores estão voltando suas ações em prol da gestão ambiental aplicada aos resíduos (CHAN e WONG, 2006; TEIXEIRA e BESSA, 2009).

De modo geral, pouca preocupação tem sido observada nos setor agroindustriais geradores de resíduos, e a Produção mais Limpa (P+L) pode ser inserida neste setor como instrumento estratégico para a obtenção de bioprodutos e pela melhoria da eficiência das etapas produtivas (LAUFENBERG et al., 2003).

A produção de resíduos agroindustriais é significativa ao se contabilizar as suas diferentes origens e formas, mas independente de sua origem, esses materiais gerados durante as processos agroindustriais representam desperdício e risco ambiental. Atualmente os principais destinos dados aos resíduos referem-se a sua aplicação direta no solo, seu incremento em objetos utilizados para a construção (isolantes e painéis), queima direta como combustível (forma sólida ou líquida através do processo de pirólise) e aquecimento (SPADOTTO e RIBEIRO, 2006; EL-HAGGAR, 2007). Esses materiais, devido as suas características químicas, apresentam potencialidades que precisam ser melhor exploradas.

Na região sul do Brasil é grande a produção de resíduos associados a indústria do fumo, destacando-se o pó de tabaco. De acordo com Sinditabacos (2017), em 2015 foram plantados cerca de 308 mil hectares de fumo na região sul brasileira e uma produção de aproximadamente 700 mil toneladas. O processamento industrial do tabaco envolve a separação mecânica da lâmina e do talo realizada pelos separadores e debulhadores. Um processo de secagem é adicionado para manter o nível de umidade do tabaco uniforme. Ao final do processamento, 89% da matéria-prima é aproveitada. De acordo com Tedesco et al (2011), o pó de tabaco e os talos são considerados os principais resíduos da indústria fumageira. O pó de tabaco representa 95% do total dos resíduos produzidos.

Os resíduos lignocelulósicos são formados por três componentes poliméricos majoritários: a lignina, celulose e hemicelulose, unidas entre si, por ligações covalentes, formando uma estrutura extremamente complexa e resistente ao ataque microbiano (CASTRO e PEREIRA JR, 2010). Para

serem convertidas em bioprodutos, esses componentes precisam ser convertidos em açúcares fermentescíveis (KUMAR et al. 2009; VALENCIA e CHAMBERGO, 2013).

O aproveitamento dos resíduos agroindústrias exige etapas de preparação da biomassa residual, incluindo um (i) pré-tratamento, para redução do tamanho da partícula e da cristalinidade da fibra vegetal e (ii) hidrólise, que pode ser química ou enzimática. Como as condições ambientais para a atuação de enzimas ocorrem de modo geral, e condições brandas de temperatura, pressão e pH quando comparados aos processos químicos, a hidrolise enzimática tem sido a escolha mais adequada. Estão envolvidas na catalise enzimática diversas enzimas do complexo celulolítico, incluindo as endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidades (KUMAR et al, 2009; THOMAS et al, 2016).

3. Metodologia

3.1 Amostragem

O resíduo pó de tabaco foi cedido por uma indústria localizada no município de Santa Cruz do Sul-RS, e mantido em frasco hermeticamente fechado.

3.2 Manutenção da cultura e Cultivo em Fase Submersa

Para o cultivo em Fase Submersa (CFSm) a cepa bacteriana do gênero *Bacillus* sp., nomeada de CBJB4, isolada do resíduo pó de tabaco, foi cultivada em placa contendo o meio ágar nutriente- AN (Extrato de carne 0,3%, peptona bacteriológica 0,5% e ágar bacteriológico 1,5%) e armazenada sob refrigeração (4°C) com repiques mensais para a manutenção da cultura.

Dois diferentes meios foram empregados no CFSm com a finalidade de analisar comparativamente a taxa de produção enzimática com as diferentes fases de crescimento celular. Os meios utilizados foram (i) Caldo Padrão *Brain Heart Infusion* – BHI (CP) (Infuso cérebro coração 17,5%, peptona 10%, dextrose 2%, cloreto de sódio 5%, fosfato dissódico 2,5%) acrescido de 2% de Carboximetilcelulase (CMC) e Caldo Pó de Tabaco (CPT) (10 $g.L^{-1}$), preparado a partir de uma infusão com pó de tabaco e água fervente, posteriormente filtrado. Aos caldos estéreis adicionou-se um pré-inócuo, preparado a partir da inoculação do isolado em 20 mL de caldo BHI estéril, mantida a 35ºC em *overnight* sob agitação (150 rpm), em incubadora *shaker* SL – 222 SOLAB. O volume do pré-inóculo utilizado para inoculação dos caldos foi equivalente a 10% do volume utilizado para a fermentação líquida.

A fermentação foi conduzida em três diferentes temperaturas (27, 33 e 37°C), sob rotação de 150 rpm e pH inicial 7, durante 216 horas.

3.3 Determinação das Atividades Celulolíticas

Para a determinação da atividade enzimática foram retiradas alíquotas de ambos os caldos em intervalos regulares de 24 horas. Para a extração das enzimas em meio líquido, as alíquotas foram

centrifugadas (5000 rpm, por 20 minutos), e o sobrenadante utilizado para a análise da atividade enzimática. Para cada complexo enzimático uma metodologia diferenciada foi adotada. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível em comprimento de 540 nm, acompanhadas por controles.

Uma curva padrão de glicose foi construída para permitir a determinação dos açúcares redutores formados em cada uma das atividades celulolíticas. Para construção da curva padrão de glicose, diferentes concentrações de glicose (0,1 até 0,9 g L^{-1}) foram preparadas. 0,5 mL de cada uma das soluções de glicose foram adicionadas em 9 tubos de ensaio juntamente com 0,5 mL de uma solução 3,5 dinitro-salicílico (DNS). Os tubos foram submetidos a banho-maria a 100°C, por 15 min. Após esse tempo, aos tubos foram adicionados 5 mL de água destilada e realizadas as leituras em espectrofotômetro a 540 nm (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

A unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C. Os valores foram expressos em U/mL, onde 1 unidade representa 1 µmol de açúcar redutor correspondente produzido por minuto. A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios de atividade enzimática dos experimentos foram realizados em triplicata.

Para a determinação da atividade ceulolítica total (endo+exoglucanases) (FPase) adotou-se o método descrito por (GHOSE, 1987). Uma tira de papel Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm, ~50 mg) enrolada em formato espiral foi disposta dentro de tubos de ensaio de 9 cm contendo em cada tudo 1 mL de solução tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL do caldo enzimático, nos diferentes tempos, aos tudo de ensaio, que serão então homogeneizados e mantidos em banho-maria 50°C por 60 min. Os tubos serão então resfriados à temperatura ambiente. Aos tubos foram adicionados 3 mL do reagente DNS para interromper a reação e a solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho-maria 100 °C durante 5 min, e posterior leitura em espectrofotômetro.

A atividade de CMCase (endoglucanases), foi determinada pela adição de 0,5 mL da solução tampão de citrato de sódio pH 4,8 0,05 M em 0,5 mL de solução CMC 2% e 0,5 mL de extrato enzimático, seguida de banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Após, foi adicionado em cada tubo, 3 mL de solução DNS para interromper a reação de hidrólise. Os tubos serão submetidos a novo banho banho-maria em água fervente por 5 minutos, seguido de leitura em espectrofotômetro (Miller, 1959).

A atividade de exoglucanase foi determinada pelo método (Ghose, 1987), empregando Avicel 2% (celulase microcistalina) como substrato. O volume de 0,5 mL da solução tampão de citrato de sódio pH 4,8 0,05 M foi homogeneizada em 0,5 mL de solução Avicel 2%, com adição de 0,5 mL de extrato enzimático, e posterior banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Após, foi adicionado em cada tubo, 3 mL de solução DNS e leitura em espectrofotômetro.

A atividade de beta-glicosidase foi determinada pelo método recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987), empregando celobiose 15 mM como substrato. Foram adicionados aos tubos de ensaio, 1 mL do extrato enzimático (para cada intervalo tempo) acrescidos em 1mL do tampão Citrato 0,05M

pH 4,8 e 1 mL da solução de 15 Mm de Celobiose. Os tubos foram então incubados em banho-maria por 30 minutos a 50ºC. A reação foi então interrompida pela imersão dos tubos em banho fervente por 5 minutos, seguido de um banho de água fria. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

4. Resultados e Discussão

A evolução das atividades celulolíticas para os CP e CPT, ao longo das 168 horas estão demonstrados pelas Figuras 1, 2 e 3.

Figura 1- Variação das Atividades Celulolíticas utilizando Caldo Padrão BHI (CP) e Caldo Pó de Tabaco (CPT) na temperatura de 27°C

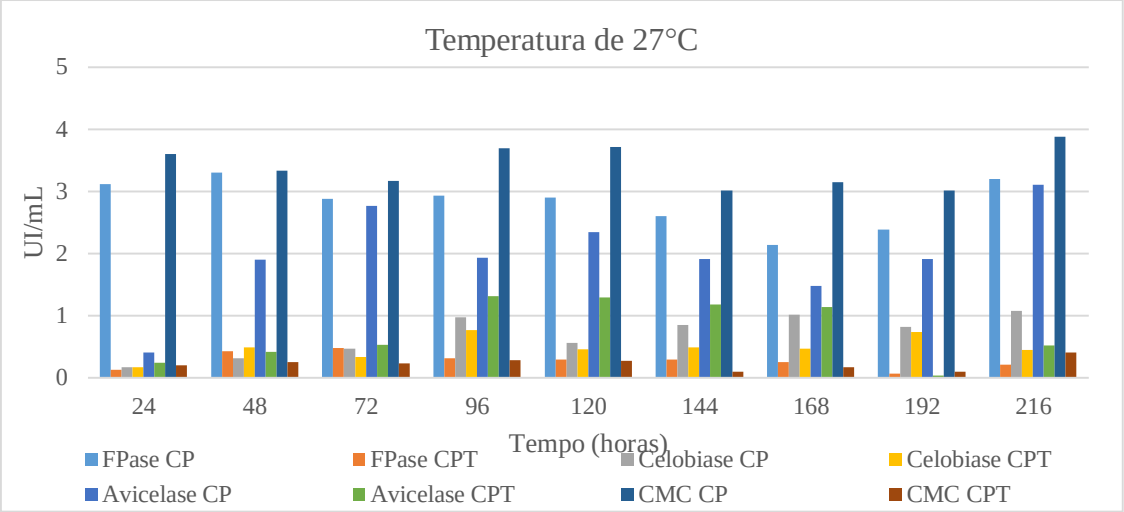


Figura 2- Figura 1- Variação das Atividades Celulolíticas utilizando Caldo Padrão BHI (CP) e Caldo Pó de Tabaco (CPT) na temperatura de 33°C

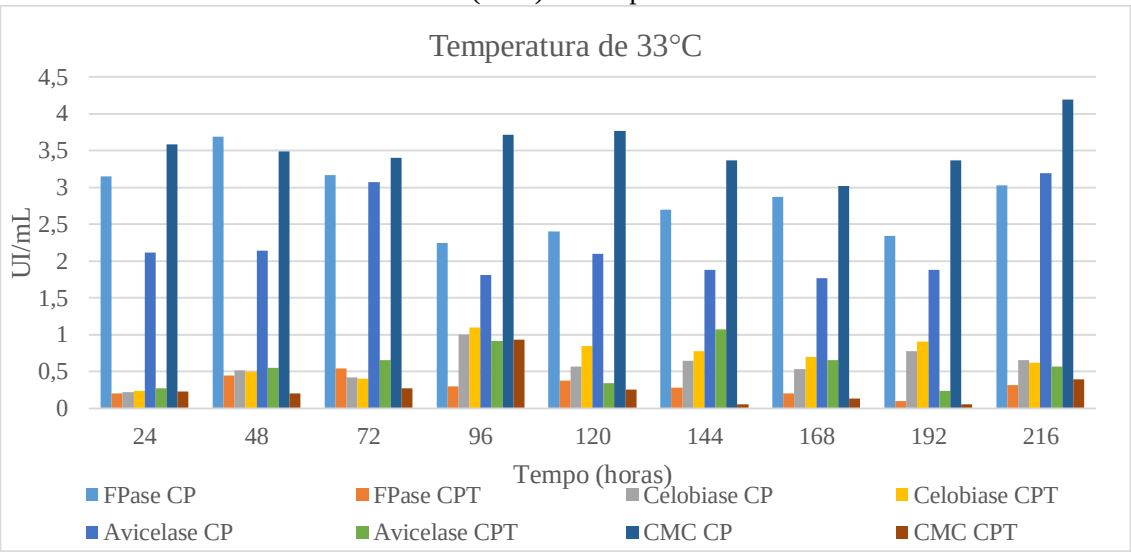
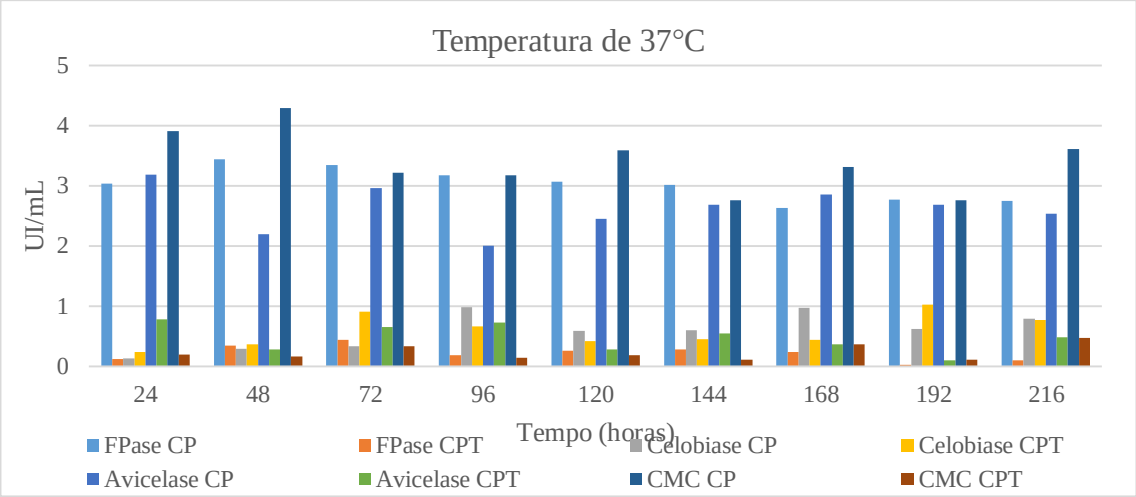


Figura 3- Figura 1- Variação das Atividades Celulolíticas utilizando Caldo Padrão BHI (CP) e Caldo Pó de Tabaco (CPT) na temperatura de 37°C



O tempo de fermentação estabelecido em 216 horas é devido ao comportamento da fase de crescimento da cepa testada em CP, onde fica evidenciado a fase de declínio. Além disso, demais pesquisas envolvendo o gênero *Bacillus*, curvas de crescimento foram observadas. É o caso dos estudos conduzidos por Ladeira et al (2015), em que a produção de celulases (CMCase e Avicelase) pela cepa Bacillus sp. SMIA-2 foi avaliada durante as primeiras 168 horas, onde se observou a fase de declínio celular. Esse estudo demonstrou que a produção de enzimas endo e exoglucanases entra em declínio após as 168 horas. A máxima atividade foi encontrada quando a temperatura de fermentação foi mantida em 50°C. Kuancha *et al.* (2017) encontrou melhor atividade CMCase e de xilanase, quando a temperatura foi mantida em 60°C.

Apesar disso, dentro da faixa testada, a temperatura de 33°C apresentou de modo geral os maiores picos de atividade para CPT. Para a avicelase, o maior pico de atividade foi observado no tempo de 96 horas e 27°C. Sugere-se ampliar a faixa de temperatura para que seja possível avaliação de estabilidade térmica das enzimas, importante para futuros empregos industriais.

Observa-se que para a atividade de celobiase, os valores obtidos de atividade foram proporcionalmente similares (CP/CPT próximo de 1) quando comparado o meio padrão (CP) e alternativo (CPT). Diferentemente para as demais atividades, onde foram observadas diferenças significativas. A Tabela 1 mostra a relação proporcional média entre o CP e CPT para o nível mais alto de atividade enzimática para diferentes temperaturas.

Tabela 1- Relação CP/CPT para as atividades enzimáticas testadas considerando o maior valor obtido em cada faixa de temperatura testada

	27°C	*33°C*	*37°C*	*27°C*	*33°C*	*37°C*	*27°C*	*33°C*	*37°C*
		CPT			**CP**			**CP/CPT**	
FPse	0,480	0,544	0,444	3,304	3,686	3,440	6,890	6,776	7,753
Celobiase	0,766	1,096	1,030	1,076	1,004	0,991	1,405	0,916	0,962
Avicelase	1,310	1,073	0,788	3,101	3,193	3,188	2,367	2,977	4,046
CMCase	0,411	0,932	0,478	3,878	4,198	4,296	9,437	4,505	8,988

A partir dessa dos dados evidenciados nessa Tabela, percebe-se que o substrato alternativo pó de fumo apresenta capacidade de ser empregado para a obtenção de enzimas celulolíticas, mas que novos ensaios precisam ser realizados de forma a promover maior níveis de atividade que sejam atrativos industrialmente. Liu *et al.* (2006) demonstrou que a adição de surfactantes como o Tween 80 podem estimular a produção de celulases e xilanases em processos fermentativos, e podem ser interessantes quando o objetivo é a bioconversão ou biodegradação de resíduos lignocelulósicos.

Nosso estudo mostra que a atividade Avicelase foi maior, para as diferentes faixas de temperatura avaliadas, que a CMCase. Outros estudos já demostraram que bactérias de gênero *Bacillus* possuem altos níveis de exoglicanases (BEUKES e PLETSCHKE, 2006; LADEIRA *et al*, 2015), apesar do gênero *Bacillus* apresentar em geral, elevadas atividades na presença de carboximetilcelulose.

Como já era esperado, as atividades enzimáticas do CP são superiores ao do CPT. Nos estudos conduzidos por Sadhu *et al* (2014), o tempo de incubação foi essencial para a avaliação das atividades enzimática, avaliadas em tempos superiores a 216 horas. Assim, sugere-se ampliar a faixa de tempo de fermentação para obter uma melhor avaliação das atividades celulolíticas utilizando-se o resíduo pó de tabaco.

5. Conclusões

O isolado bacteriano testado mostrou, até o momento, excelente potencial para a bioconversão do resíduo em celulases, demostrando a adaptação de BCJB5 ao pó de tabaco como substrato alternativo para crescimento.

Novos condicionantes deverão ser atribuídos ao CFSm para viabilizar o tratamento dos resíduos gerados durante esse estudo, bem como, sugerir uma alternativa viável ambientalmente, para a redução do volume dos resíduos gerados pela indústria fumageira e garantir uma aplicação biotecnológica ao resíduo pó de tabaco.

REFERÊNCIAS

BARBIERI, José Carlos. Gestão Ambiental Empresarial: Conceitos, Modelos e Instrumentos. 4ª ed. São Paulo, SP: Saraiva, 2016.

BERTOLINI, G. R. F.; BRANDALISE, L. T.; ROJO, C. A.; CORREIO, A. G. R. L. A viabilidade financeira no desenvolvimento de produtos ecológicos valorizados pelos consumidores. **Gestão e Projetos**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 01-29, set/dez. 2013.

BEUKES, N.; PLETSCHKE, B.I. Effect of sulfur-containing compounds on Bacillus cellulosome-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities. **FEMS Microbiol Lett**, v. 31, 264:226, 2006.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova,** v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHAN, E. S. W.; WONG, S. C. K. Motivations for ISO 14001 in the hotel industry**. Tourism Management**, v. 27, n. 3, p. 481-492, 2006.

EL-HAGGAR, S. M. Chapter 7 - Sustainability of Agricultural and Rural Waste Management. In: (Ed.). **Sustainable Industrial Design and Waste Management**. Oxford: Academic Press, 2007. p.223-260.

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

LADEIRA, S. A. et al. Cellulase production by thermophilic Bacillus sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology,** v. 18, n. 2, p. 110-115, 2015.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept;(B) practical implementations. **Bioresource Technology,** v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LIU, J. et al. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by Trichoderma viride in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry,** v. 41, n. 11, p. 2347-2351, 2006

KUANCHA, C. et al. Fermentable sugars production from lignocellulosic materials hydrolysis by thermophilic enzymes from Bacillus subtilis J12. **Energy Procedia,** v. 138, p. 151-156, 2017.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research,** v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

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

PHILIPPI JUNIOR, Arlindo et al. **Curso de Gestão Ambiental**. 2ª ed. Barueri (SP): Manole, 2013 – Coleção Ambiental.

SADHU, S.; GHOSH, P. K.; ADITYA, G,; MAITI, T. K. Optimization and strain improvement bymutation for enhanced cellulase production by Bacillus sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. **J King Saud Univ Sci** , v. 26, 323–332,2014.

SINDITABACOS. **Perfil do produtor e da indústria do tabaco e exportações**. 2017. Disponível em: < http://sinditabaco.homolog.inf.br>. Acesso em: jun/2017.

SPADOTTO, C. A.; RIBEIRO, W. C. **Gestão de resíduos na agricultura e agroindústria**. Botucatu: FEPAF, 2006.

TEDESCO, M. J. et al. Land disposal potential of tobacco processing residues. **Ciência Rural,** v. 41, n. 2, p. 236-241, 2011.

TEIXEIRA, M. G. C.; BESSA, E. S.; Estratégias para compatibilizar desenvolvimento econômico e gestão ambiental numa atividade produtiva local**. Revista de Administração Contemporânea**, Curitiba, v. 13, ed. especial, p. 1-18, Junho 2009.

THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from Aspergillus sp. for bioethanol production. **Renewable Energy,** v. 98, p. 9-15, 2016.

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

VASCONCELOS, N.; PINTO, G.; DE ARAGAO, F. Determinação de açuçares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2013.