



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



ANDERSON GABRIEL CORRÊA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes Versicolor* E
Trichoderma Asperellum UTILIZANDO BAGAÇO DE UVA E FARELO DE TRIGO
COMO SUBSTRATOS**

UBERLÂNDIA - MG

2023



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDERSON GABRIEL CORRÊA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes Versicolor* E *Trichoderma Asperellum* UTILIZANDO BAGAÇO DE UVA E FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATOS

Dissertação apresentada como critério de avaliação para Obtenção do Título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Biocombustíveis pela Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Milla Alves Baffi

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Pasquini

UBERLÂNDIA – MG

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis

Av. João Naves de Ávila, 2121 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: (34) 3239-4385 / 4208 - www.iq.ufu.br - ppbic@iqufu.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 046, PPBIC				
Data:	28 de fevereiro de 2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:15
Matrícula do Discente:	12122PGB002				
Nome do Discente:	Anderson Gabriel Corrêa				
Título do Trabalho:	PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR <i>Trametes versicolor</i> E <i>Trichoderma asperellum</i> UTILIZANDO BAGAÇO DE UVA E FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATOS				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se em ambiente virtual, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta pelos Professores Doutores: Rodrigo Simões Ribeiro Leite, da Universidade Federal da Grande Dourados; Patrícia de Oliveira Rodrigues, da Universidade Federal de Uberlândia; e Milla Alves Baffi, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Milla Alves Baffi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Milla Alves Baffi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia de Oliveira Rodrigues, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Simões Ribeiro Leite, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4264257** e o código CRC **09FFD8F5**.

Referência: Processo nº 23117.010568/2023-21

SEI nº 4264257

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C824
2023 Corrêa, Anderson Gabriel, 1994-
PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes*
Versicolor E *Trichoderma Asperellum* UTILIZANDO BAGAÇO DE
UVA E FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATOS [recurso
eletrônico] / Anderson Gabriel Corrêa. - 2023.

Orientadora: Milla Alves Baffi.

Coorientador: Daniel Pasquini.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Biocombustíveis.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.133>

Inclui bibliografia.

1. Biocombustível. I. Baffi, Milla Alves, 1977-,
(Orient.). II. Pasquini, Daniel, 1974-, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Biocombustíveis. IV. Título.

CDU: 662.756

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus, por todas as graças alcançadas. Em seguida a minha família, que mesmo distante, me ajuda a todo momento, me auxilia, me ampara, minha fortaleza (Guilherme, Marli, Ane e Naira). Não posso deixar de falar da gratidão que tenho a minha orientadora Prof^a Dr^a. Milla Alves Baffi, ao meu co-orientador Prof. Dr. Daniel Pasquini, e a Dr^a. Patrisia de Oliveira Rodrigues, por todo auxílio acadêmico, por compartilharem comigo todos seus conhecimentos, e principalmente aceitarem me orientar e desenvolver meu projeto. Aos amigos que fiz em Uberlândia, pessoas especiais, que me receberam de braços abertos, meu muito obrigado. E por fim, meu reconhecimento à Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio técnico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. Gratidão a todos!

RESUMO

O emprego de biomassas lignocelulósicas como fonte de carbono em processos fermentativos para prospecção enzimática vêm sendo tema de diversos estudos atualmente. O presente trabalho objetivou avaliar a síntese de celulase, xilanases e lacase, pelas linhagens fúngicas *Trametes versicolor* e *Trichoderma asperellum*, em monocultura e consórcio, através de fermentação em estado sólido, utilizando bagaço de uva e farelo de trigo como fonte de carbono. A melhor produção de β -glicosidase, de 218,91 U/g foi obtida utilizando o fungo *T. versicolor* com farelo de trigo como substrato. A produção de xilanases apresentou picos de atividade de 19,39 U/g para β -xilosidase e xilanase de 170,28 U/g, ambas em processos com farelo de trigo e consórcio fúngico. E a produção de lacase, atingiu 16,5 U/g de atividade com substrato misto, contendo bagaço de uva e farelo de trigo, com o microrganismo *T. versicolor*. Os dados obtidos demonstraram que as fontes de carbono utilizadas nos processos fermentativos ofereceram suporte nutricional e de crescimento aos fungos filamentosos utilizados, que por sua vez, foram bons indutores enzimáticos, com destaque para produção de β -glicosidase e xilanase.

Palavras-chaves: Resíduos agroindustriais, fungos filamentosos, β -glicosidase, β -xilosidase, xilanase, lacase.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomass as a source of carbon in fermentation processes for enzymatic prospecting has been the subject of several studies today. The present work intended to evaluate the synthesis of cellulase, xylanases and laccase, by the fungal strains *Trametes versicolor* and *Trichoderma asperellum*, in monoculture and consortium, through solid state fermentation, using grape pomace and wheat bran as a carbon source. The best β -glucosidase production of 218.91 U/g was treated using the *T. versicolor* fungus with wheat bran as substrate. The production of xylanases showed activity peaks of 19.39 U/g for β -xylosidase and xylanase of 170.28 U/g, both in processes with wheat bran and fungal consortium. And the production of laccase, fed 16.5 U/g of activity with mixed substrate, containing grape pomace and wheat bran, with the microorganism *T. versicolor*. The obtained data demonstrated that the carbon sources used in the fermentation processes offer nutritional and growth support to the filamentous fungi used, which, in turn, were good enzyme inducers, with emphasis on the production of β -glucosidase and xylanase.

Keywords: Agro-industrial wastes, filamentous fungi, β -glycosidase, β -xylosidase, xylanase, laccase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica com celulose, hemiceluloses e lignina.	19
Figura 2: Mecanismo enzimático das celulases.	24
Figura 3: Mecanismo enzimático das hemicelulases.	25
Figura 4: Mecanismo de ação das lacases.	26
Figura 5: Fluxograma etapas do projeto.	30
Figura 6: Bagaço de uva.	31
Figura 7: Biomassa triturada: (a) bagaço de uva e (b) farelo de trigo.	31
Figura 8: Pré-inóculo em placa da espécie fúngica <i>Trichoderma asperellum</i>	39
Figura 9: Pré-inóculo em placa da espécie fúngica <i>Trametes versicolor</i> 561.	39
Figura 10: Pré-inóculo em placa das espécies fúngicas <i>T. versicolor</i> e <i>T. asperellum</i> cultivadas em consórcio.	40
Figura 11: Fermentação em estado sólido realizadas no presente estudo.	41
Figura 12: Frascos de Erlenmeyer no processo de FES (a) e (b).	42
Figura 13: FTIR bagaço de uva e farelo de trigo.	47
Figura 14: EDS bagaço de uva.	49
Figura 15: EDS farelo de trigo.	49
Figura 16: Atividade Enzimática β -glicosidase (A – <i>T. Asperellum</i> , B – <i>T. Versicolor</i> , C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).	53
Figura 17: Atividade Enzimática β -xilosidase (A – <i>T. Asperellum</i> , B – <i>T. Versicolor</i> , C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).	55
Figura 18: Atividade Enzimática Xilanase (A – <i>T. Asperellum</i> , B – <i>T. Versicolor</i> , C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).	58
Figura 19: Atividade Enzimática Lacase (A – <i>T. Asperellum</i> , B – <i>T. Versicolor</i> , C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química dos substratos lignocelulósicos utilizados no presente trabalho.....	44
Tabela 2: Principais atribuições dos grupos funcionais presentes nas amostras.....	47
Tabela 3: Porcentagem mássica bagaço de uva e farelo de trigo.....	48
Tabela 4: Dados estatísticos que corroboram os resultados apresentados no presente estudo...	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico

ART - Açúcares Redutores Totais

BU - Bagaço de uva

C/N - Relação Carbono/Nitrogênio

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

DNS - Ácido-dinitrosalissílico

EC 3.2.1.8 - Xilanase

EC 3.2.1.139 - α -glucuronidase (α -glucosiduronase,)

EC 3.2.1.21 - β -glicosidase

EC 3.2.1.37 - β -xilosidase

EC 3.2.1.4 - Endoglucanase

EC 3.2.1.55 - α -arabinofuranosidase

EC 3.2.1.91 - Exo-glucanase

EC1.10.3.2 - Lacases

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

FES – Fermentação em Estado Sólido

FT - Farelo de Trigo

FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GEEs - Gases de Efeito Estufa

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PDA - Ágar Potato Dextrose

pNP - p-nitrofenol

PNPG - p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo

PNPX - p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo

TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry

UV-VIS - Espectroscopia na Região do Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Bagaço de uva	15
2.2 Farelo de trigo.....	17
2.3 Bioetanol.....	27
2.4 Composição biomassa lignocelulósica.....	19
2.5 Enzimas lignocelulolíticas.....	23
2.6 Fungos degradadores de biomassa lignocelulósica	21
2.7 Fermentação em estado sólido (FES).....	22
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Preparação da Biomassa	30
4.2 Caracterização das biomassas	32
4.2.1 Teor de extrativos	32
4.2.2 Teor de Umidade	32
4.2.3 Teor de Cinzas	33
4.2.4 Lignina Klason Insolúvel	34
4.2.5 Lignina Klason Solúvel	34
4.2.6 Determinação de holocelulose.....	35
4.2.7 Determinação de celulose.....	36
4.2.8 Teor de hemiceluloses.....	37
4.2.9 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR.....	37
4.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS).....	38
4.3 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	38
4.3.1 Substratos.....	38
4.3.2 Microrganismos	38
4.3.3 Produção de enzimas.....	40
4.4 Quantificação Enzimática	42

4.4.1 β -Glicosidase	42
4.16.2 β -Xilosidase	42
4.16.3 Xilanase	43
4.16.4 Lacase	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Caracterização das biomassas	44
5.2 Produção de Enzimas por FES.....	49
5.2.1 Produção de β-Glicosidase.....	50
5.2.2 Produção de β-Xilosidase.....	54
5.2.3 Produção de xilanase.....	56
5.2.4 Produção de Lacase.....	59
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional com o acelerado consumo mundial dos recursos energéticos vêm desencadeando impactos negativos no ambiente, como a degradação e esgotamento dos recursos naturais, emissões de gases de efeito estufa (GEEs) e intensas alterações climáticas (FERREIRA *et al.*, 2021). Uma forma de minimizar tais impactos é a valorização dos resíduos agroindustriais, subprodutos que podem ser utilizados na produção de diferentes produtos de valor agregado, geração de energia limpa e biocombustíveis (MOHANTY *et al.*, 2021).

Os biocombustíveis de segunda geração (2G) são produzidos através de biomassa lignocelulósica, que compõe a maioria dos resíduos agroindustriais, matérias-primas promissoras para a bioenergia, devido a sua abundante disponibilidade e baixo custo, é considerado um material residual renovável rico em fonte de nutrientes, como carbono (LIN & LU, 2021).

Dentre as biomassas, destacam-se os resíduos florestais, de beneficiamento da madeira, agroindustriais (SARAVANAN *et al.*, 2022) e os de processamento de alimentos (SARKAR *et al.*, 2018). Sua composição estrutural pode variar por diversos fatores, mas em geral a biomassa lignocelulósica é composta em grande parte de celulose, (35–50 %) hemicelulose (20–30 %) e lignina (10–25 %) (SOCCOL *et al.*, 2017; DAI *et al.*, 2018).

O Brasil possui destaque mundial na produção de grãos, pois segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), nos últimos anos, o país apresentou recordes de produção de trigo, com 7.679,4 mil/ton produzidas em 2021, e aumento estimado de 21,9 %, para a safra de 2022, com um total de 9.359,9 mil/ton do grão (CONAB, 2022).

O principal subproduto do processamento dessa cultura é o farelo de trigo, gerado em elevadas quantidades após o beneficiamento do grão (GERMEC & TURHAN, 2019). Uma pequena parcela desse material é vendida como farelo comercial para indústrias alimentícias (PRUCKLER *et al.*, 2014). Porém, a maior parte é considerada um subproduto agroindustrial, que geralmente é descartada por meio de despejo no solo, queima, ou enviada para aterro, acarretando em efeitos adversos ao ambiente (YAASHIKAA *et al.*, 2022).

Outro importante seguimento agroindustrial no país são as vinícolas, que produzem uma quantidade significativa de resíduos sólidos durante o processo de vinificação, conhecido como bagaço de uva, que é obtido após prensagem mecânica e fermentação do vinho, composto por pele, sementes e talos da uva (SIROHI *et al.*, 2020).

O bagaço de uva tem sido considerado uma fonte valiosa na produção de novos produtos através de bioprocessos (ILYAS *et al.*, 2021; MADADIAN *et al.*, 2022). Como exemplos, podemos citar: aditivos alimentares, suplementos dietéticos, xilitol, ácido láctico, biopolímeros, ração animal (DIAS *et al.*, 2018; AHMAD *et al.*, 2020), produção de enzimas (TELES *et al.*, 2019; DIAZ *et al.*, 2007; BOTELLA *et al.*, 2005) e biocombustíveis, como biogás, biodiesel e bioetanol (NAIR *et al.*, 2022). Por sua vez, a valorização do farelo de trigo é dada principalmente na suplementação de ração animal (ALONSO, 2018; WANG *et al.*, 2022), porém, alguns estudos têm utilizado esse material residual para a produção de enzimas, como xilanases (CRUZ DAVILA *et al.*, 2022) e celulases (SANTOS *et al.*, 2021), produção de ácido ferúlico e glicose (FANG *et al.*, 2022), e para uso em biorrefinarias (APPRICH *et al.*, 2014; WANZENBÖCK *et al.*, 2017; BEDO *et al.*, 2019).

A produção de enzimas por processos de FES utilizando como substratos resíduos agroindustriais é um processo biotecnológico de baixo custo e mínimo impacto ambiental (LEITE *et al.*, 2021). Além de auxiliar na gestão dos resíduos gerados, evitando problemas causados pelo descarte inadequado desses materiais (MEINI *et al.*, 2021).

Os fungos filamentosos são os principais agentes desse processo, sendo suas características naturais e seus sistemas enzimáticos amplamente explorados para inúmeras aplicações biotecnológicas, como produção de biocombustíveis, biorremediação de solos contaminados, processamento de alimentos e bebidas (SAINI & SHARMA, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Na FES, a técnica simula o habitat natural desses microrganismos favorecendo sua atividade metabólica e proporcionando maior síntese enzimática (SOCCOL *et al.*, 2017, RODRIGUES *et al.*, 2021).

O fungo *Coriolus versicolor*, também conhecido como *T. versicolor* e *Polyporus versicolor*, é um cogumelo comum encontrado em todo o mundo em troncos de árvores, pertencente à classe de fungos basidiomicetos (DOU *et al.*, 2019), com características de um fungo de podridão branca, degrada todos os constituintes da madeira (SHANG *et al.*, 2013). E os fungos do gênero *Trichoderma* são caracterizados por estarem presentes na grande maioria dos ecossistemas, possuem rápido crescimento e tolerância a diferentes estresses abióticos (KHAN & MOHIDDIN, 2018). Seu emprego é principalmente como agente de biocontrole na agricultura e como produtor de enzimas para diferentes fins industriais (JANGIR *et al.* 2017).

Os biocombustíveis são produzidos através de processos bioquímicos utilizando enzimas, que são essenciais e implicam diretamente na eficiência de produção (SINGH *et al.*, 2022). Nos últimos anos, a produção de extratos multienzimáticos e a síntese de

biocombustíveis utilizando tais enzimas vêm sendo apresentado por diversas indústrias em larga escala, mas infelizmente tal ação sofre entraves, principalmente pelos custos que envolvem seus processos (ARYA *et al.*, 2022).

Em contrapartida, os estudos propostos nessa área estão em ascensão, como o apresentado por Rodrigues *et al.* (2022), na qual os autores avaliaram 16 coquetéis enzimáticos para produção de ligninases, hemicelulases e celulases. Assim como em estudo desenvolvido por Intalsit *et al.* (2021), que produziram coquetéis enzimáticos com elevadas atividades de celulase e xilanase, investigando diferentes fungos e substratos.

Neste contexto, é favorável como rota de valorização para o farelo de trigo e o bagaço de uva a produção enzimática e de bioetanol, através de processos biotecnológicos, impactando positivamente três áreas importantes para o desenvolvimento sustentável: a gestão ambientalmente correta de resíduos agroindustriais, o mercado nacional de enzimas e a produção de biocombustíveis. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo a produção de enzimas lignocelulolíticas por FES, utilizando duas espécies fúngicas, em monoculturas e em consórcio, com bagaço de uva e farelo de trigo como substratos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resíduos agroindustriais

As atividades agroindustriais geram diversos tipos de resíduos sólidos, seja na lavoura ou na indústria durante o processamento, gerando elevados fluxos de resíduos, como exemplo, resíduos de produção agrícola, de colheitas, florestais, serragem e material vegetal (CUSENZA et al., 2021; DEVI et al., 2022). São resíduos gerados sazonalmente, mas com um fluxo anual, assim como as indústrias de cereais que após processamento geram farelos como restos da produção, as indústrias de café geram material residual na forma de polpa de café, as fábricas de bebidas e alimentos processados geram cascas e restos de materiais vegetais (CUSENZA et al., 2021).

Esses resíduos possuem alto teor orgânico que precisam de atenção nas formas de descarte, pois se destinados de forma inadequada seu acúmulo no ambiente pode acarretar em contaminação, liberação de odores e lixiviação, com poluição do solo e de corpos hídricos, além de ocasionar riscos de saúde pública (NAIR et al., 2022).

Porém, esses materiais residuais são considerados subprodutos agroindustriais com características favoráveis para serem utilizados na produção de biocombustíveis de segunda geração, e como fonte de matéria-prima para produção de novos materiais e biomoléculas (VALLADARES-DIESTRA et al., 2023), e compostos bioativos (DEVI et al., 2022). Através de uma série de processos esses resíduos podem ser convertidos em ração animal, enzimas, biocombustíveis, como bioetanol, biodiesel e biogás, produtos químicos e antioxidantes, entre outros (QIAN et al., 2022).

O Brasil é um dos países destaque no agronegócio, produtor de diversas culturas agrícolas, como a cana-de-açúcar e soja, que são as principais safras produzidas no país, com foco na produção de alimentos e biocombustíveis, que geram elevados fluxos de resíduos, como bagaço de cana-de-açúcar e casca de soja que representam aproximadamente 30 e 10 % do peso processado (VALLADARES-DIESTRA et al., 2022). Além dos resíduos gerados pelas culturas de sorgo, cevada e aveia (YAASHIKAA et al., 2022).

No entanto, existem uma série de tipos de resíduos agroindustriais gerados atualmente, com elevados fluxos e diversificação nos componentes químicos e estruturais desses materiais,

que vão depender do tipo e período da colheita, das etapas envolvidas no processamento, das características das matérias-primas utilizadas e do tipo e natureza dos produtos obtidos (NAYAK & BHUSHAN, 2019).

2.2 Bagaço de uva

A videira (*Vitis vinifera L.*, *Vitaceae*) é uma das principais culturas frutícolas cultivada em todo o mundo (GOMEZ-BRANDON *et al.*, 2019), com mais de 70 milhões de toneladas de uvas produzidas em 2020 (FAO, 2022). A Europa é o maior produtor da fruta, com 39 % de participação na produção mundial, seguida pela Ásia com 34 % e América com 14 % (OIV, 2019).

De todo esse percentual produzido, parte é consumida *in natura* e o restante é processada para fabricação de uma série de produtos, como sucos, bebidas alcoólicas, geleias, entre outros. Em torno de 75–80 % da produção de uvas é direcionada para a vinificação (ZHU *et al.*, 2015; KALLI *et al.*, 2018), pois o vinho está entre as bebidas mais consumidas no mundo, atingindo em média 25–27 bilhões de litros anualmente (AMIENYO *et al.*, 2014; ZACHAROF, 2017).

No Brasil, a produção de vinhos, espumantes e derivados da uva é uma atividade agroindustrial de grande importância nacional. Em 2019, a produção de uva foi de 1.445.705 toneladas, com 698.045 destinadas para processamento, sendo o Rio Grande do Sul responsável pela maior parte dessa atividade, totalizando 508,74 milhões de litros de vinhos, sucos e derivados (IBGE, 2020; EMBRAPA, 2020), com aumento na produção em 2021, de 652.414 milhões de litros (IBA, 2022).

A produção de vinho nunca foi tratada como uma atividade altamente poluidora, porém, esta situação está mudando atualmente, visto que durante o processo de vinificação são geradas elevadas quantidades de resíduos sólidos e líquidos, além de GEEs (AHMAD *et al.*, 2020). Além disso, o próprio cultivo da fruta também contribui com impactos negativos no ambiente, com o uso de agrotóxicos, fertilizantes, e no transporte da fruta com combustíveis fósseis (DAROS *et al.*, 2016). Assim, é crescente a escolha pela adequação das vinícolas em processos mais sustentáveis e a minimização dos impactos gerados no ambiente, bem como pesquisas voltadas para a valorização desses resíduos, objetivando evoluir e melhorar os processos dentro das indústrias.

As vinícolas são indústrias de processamento de frutas de grande relevância no setor agrícola, gerando milhões de toneladas de resíduos sólidos orgânicos durante suas atividades

(SIROHI *et al.*, 2020; BHARATHIRAJA *et al.*, 2020). Dentre eles, o bagaço de uva, como mencionado acima, é constituído principalmente por cascas, caule, talos e sementes (ZIETSMAN *et al.*, 2017; NCUBE *et al.*, 2021). Os talos e folhas são separados durante o desengace das uvas, enquanto o bagaço é produzido através da prensagem da fruta, maceração e após fermentação do mosto (IOANNIDOU *et al.*, 2022). Com o bagaço sendo responsável por cerca de 15–30 % da massa total de fruta processada (DWYER *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2018; SIROHI *et al.*, 2020; CHOWDHARY *et al.*, 2021). Com isso, tem-se em torno de 20 milhões de toneladas desse material descartados a cada ano (DE BRUNO *et al.*, 2018), considerado um passivo ambiental, que necessita de correta gestão.

A atividade vitivinícola é caracterizada por ser um processo sazonal, e por isso, os resíduos sólidos gerados devem ter destinação ambientalmente correta em pouco tempo, pois são materiais putrescíveis (IOANNIDOU *et al.*, 2022), ricos em compostos fenólicos, com alta carga orgânica e baixo pH (AHMAD *et al.*, 2020; DE ISEPPI *et al.*, 2020). Pois, quando lançados no ambiente sem o devido tratamento, causam poluição nos recursos naturais, seja pela decomposição, odor, lixiviação, entre outros problemas (DREVELEGKA & GOULA 2020).

Assim, a utilização desses resíduos na produção de produtos com valor agregado e energia renovável é de extrema relevância, pois dentre as inúmeras vantagens, o uso desse material para produção de biocombustíveis não compete com a produção de alimentos (ZABANIOTOU *et al.*, 2018; ALLISON & SIMMONS, 2018), gera lucros para as vinícolas e evita possíveis problemas ambientais devido seu manuseio e descarte incorreto.

A composição química dos resíduos gerados durante a produção de vinho podem alterar conforme a espécie de uva utilizada e das etapas do processamento empregadas (DEL MAR CONTRERAS *et al.*, 2022), mas a maioria inclui açúcares, como glicose, frutose, galactose, manose, ramnose, conhecidos como monossacarídeos do tipo hexoses (C6) e pentoses (C5), como xilose e arabinose, estruturados como celulose e hemicelulose, juntamente com a lignina, proteínas, lipídios e pectinas (PEDRAS *et al.*, 2020).

O bagaço de uva possui em sua constituição de 30–36 % de celulose, de 21–25 % de hemiceluloses, e elevados teores de lignina, entre 17–40 % (PING *et al.*, 2011). A alta concentração de lignina está relacionada à presença de sementes, que possuem maior teor de lignina do que a casca e polpa (PEDRAS *et al.*, 2020). Entretanto, Pedras *et al.* (2020a) encontraram valores inferiores para os carboidratos, de 15 % para celulose e 11 % de

hemiceluloses, e ainda analisaram as concentrações de xilose, frutose e glicose, com concentrações de 4,1, 3,1 e 2,8 %, respectivamente.

2.3 Farelo de trigo

O trigo é um dos cereais mais cultivados em todo mundo, em média com 150 milhões de toneladas produzidas por ano (ALONSO, 2018), é uma das culturas agrícolas de maior importância mundial, principalmente para alimentação humana (GERMEC & TURHAN, 2019). No Brasil, a produção do grão bate recorde a cada ano, com área destinada ao plantio de mais de dois milhões de hectares, com produção crescente nos últimos anos, de 5,2 em 2019, 6,3 em 2020 e 7,7 milhões de toneladas em 2021, com estimativa para safra de 2022, de mais de 9 milhões de toneladas do grão (CONAB, 2022).

O cereal pertence à família das gramíneas, ao gênero *Triticum* e as principais espécies de cultivo são *T. monococcum*, *T. durum* e *T. aestivum*. Seu nome faz referência às palavras *quebrado* e *triturado*, relacionando-se à atividade que deve ser realizada para separar o grão da casca que o envolve. No Brasil, o trigo é cultivado no Sul, Cerrado e Região Central, sendo uma cultura com boa adaptação edafoclimática (CONAB, 2017).

Sua produção pode ser classificada de acordo com a época de semeadura, na primavera ou no inverno, assim como em relação à dureza, mole ou duro, e à cor, branco ou vermelho (ROSENFELDER *et al.*, 2013). O grão de trigo compreende três frações principais, o endosperma, germe, e a camada externa, que compreende o farelo (ONIPE *et al.*, 2015),

O farelo de trigo é o subproduto gerado, comumente considerado um resíduo agrícola (VU *et al.*, 2022), gerado após processo de moagem do grão para a produção de farinha branca (MAO *et al.*, 2020), através de tecnologias de dissociação e separação dos tecidos externos do grão (ALONSO, 2018). Essa técnica tem taxa de extração de 73 a 77 %, dependendo do processo de moagem, da variedade do trigo e das condições de cultivo (PRUCKLER *et al.*, 2014).

O subproduto farelo de trigo representa de 13–25 % do peso do grão de trigo processado (ONIPE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018; GERMEC & TURHAN, 2019), sendo que essa taxa pode variar se o processo for úmido ou seco (ONIPE *et al.*, 2015). Desta forma, grandes quantidades desse material são geradas por ano, com estimativa de 2 milhões de toneladas de farelo de trigo gerados no Brasil só em 2022.

A destinação mais comum dada ao farelo de trigo é para ração animal, com cuidados em relação ao seu valor nutricional, que pode limitar o uso na dieta de ruminantes e aves. Em sua maior parte, o farelo é descartado como resíduo, ou queimado, por conta do alto custo com transporte (SLOMINSKI *et al.*, 2004; RAHMAN *et al.*, 2017).

No entanto, a valorização desse material é favorável, seja para fabricação de produtos químicos, geração de energia ou na produção de biocombustíveis, principalmente das frações não comestíveis, como lignina, celulose e hemicelulose, assim como é possível explorar seus compostos com alto potencial bioativo, proteínas e ácidos fenólicos (ALONSO, 2018).

Em especial, na produção de enzimas, estudos prévios têm demonstrado o potencial de reutilização desse resíduo como fonte de carbono em bioprocessos. Por exemplo, Cruz da Vila *et al.* (2022) avaliaram a produção de celulase e xilanase utilizando cinco cepas fúngicas. Rosa-Garzon *et al.* (2022) investigaram a produção de uma série de enzimas, entre elas, lipase, amilase, CMCase, FPase, β -glicosidase, xilanase e lacase, utilizando como substratos resíduos agrícolas, entre eles, farelo de trigo. Rodrigues *et al.* (2017) compararam a eficiência da produção de xilanase e β -glicosidase com diferentes biomassas lignocelulósicas, pré-tratadas e *in natura*.

Apesar dos esforços para a valorização desse material através de bioprocessos, tal ação ainda é vista como escassa, pois atualmente, grande parte do farelo de trigo gerado é utilizado como ração animal, causando desperdício de recursos, pois possui uma gama de componentes de alto valor, incluindo proteína, amido, polissacarídeo não amiláceo e lignina, que podem ser explorados para produção de diversos produtos (LV *et al.*, 2021).

O farelo de trigo é composto em sua maior parte por hemiceluloses, celulose e lignina, sendo cerca de 12 % de água, 56 % de carboidratos, e de 13 a 18 % de proteína, e menores concentrações de ácidos fenólicos e flavonóides (PRUECKLER *et al.*, 2014). É formado principalmente por amido, arabinoxilanos, celulose, β -glucanos e proteínas (APPRICH *et al.*, 2014), e apresenta em média 41,9 % de celulose de, 26,2 % de hemiceluloses e 25,7 % de lignina (GHAHFAROKHI *et al.*, 2019). Outros componentes presentes no farelo de trigo são, 35,7 % de glicose, em sua maior parte na forma de amido, 16,9 % de xilose, 9,7 % de arabinose, e 17,5 % de proteína (OKAMOTO *et al.*, 2011).

A composição química do farelo de trigo depende da tecnologia empregada no processamento, mas um dos polímeros presentes em maior quantidade é o arabinoxilano, que possui como componentes xilose, em torno de 21,6 % e arabinose, 12,1 % (CASSARINI & RÉMOND, 2021). Mostra-se ser um material rico em diversos compostos, os quais favorecem

a produção de uma série de novos produtos, seja a base biológica ou química, energia limpa e biocombustíveis.

2.4 Composição biomassa lignocelulósica

Os três principais componentes estruturais da biomassa lignocelulósica são: celulose (40-50 %), hemiceluloses (25-30 %) e lignina (15-20 %), interligadas por ligações covalentes e não covalentes em cadeias poliméricas complexas (VOLYNETS *et al.*, 2017; CRUZ DA VILA *et al.*, 2022). Lignoceluloses são ainda compostas por uma pequena quantidade de pectina e proteínas (BHATIA *et al.*, 2020), e possuem elevados teores de oxigênio, carbono e hidrogênio, e menores proporções de nitrogênio (LI *et al.*, 2020).

A matriz estrutural da biomassa lignocelulósica é uma rede complexa, onde a celulose é envolvida por uma monocamada de hemicelulose, incorporada ao núcleo interno da matriz de lignina e hemicelulose (LAURICHESSE & AVÉROUS, 2014). A Figura 1 apresenta a composição estrutural da lignocelulose, com os dois carboidratos principais (celulose e hemicelulose), a lignina, e as respectivas unidades repetitivas e monoméricas de cada polímero.

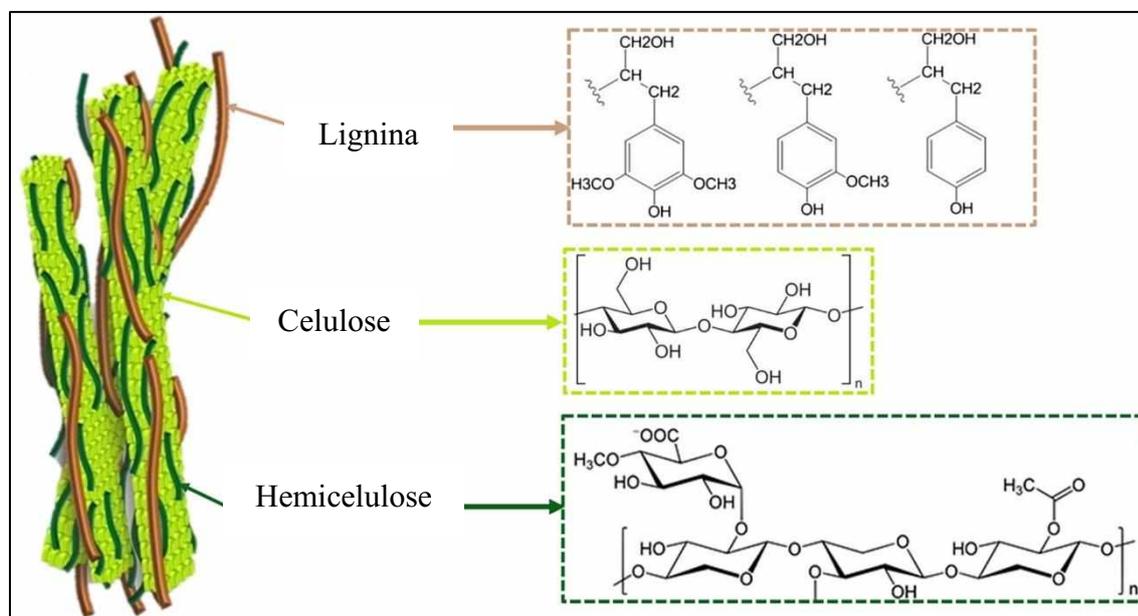


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica com celulose, hemiceluloses e lignina.

Fonte: HOANG *et al.*, (2021).

A celulose é um homopolissacarídeo não ramificado formado por monômeros de glicose. Mais especificamente, a celulose é descrita como um homopolímero linear e cristalino, de unidades repetidas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, com uma longa cadeia linear, de 10.000 unidades de glicose, ligadas por ligações de hidrogênio e de Van Der Waals e com organização estrutural em paralelo (KUMARI & SINGH, 2018).

As hemiceluloses, consistem em heteropolissacarídeos compostos por diferentes monômeros de açúcar, como arabinose, galactose, manose e xilose (PEDRAS *et al.*, 2020; VERMA & KUMAR, 2020). Além disso, tais carboidratos podem assumir uma variedade de formas químicas, incluindo polissacarídeos, oligossacarídeos, monossacarídeos, ou formar glicoconjugados como glicoproteínas e glicolipídios (CORBIN *et al.*, 2015).

As hemiceluloses ainda são compostas de polímeros lineares e ramificados de diferentes açúcares, principalmente pentoses, possuem baixo nível de polimerização, dando menor resistência à degradação mecânica e química da biomassa (HOANG *et al.*, 2021). Além da composição química, as hemiceluloses diferem da celulose por ter estrutura amorfa, pela presença de ramificações da cadeia principal e no tamanho das cadeias, sendo em torno de 50-300 unidades de açúcares (CHEAH *et al.*, 2020).

Diferente da celulose e hemiceluloses, a lignina não é um carboidrato, e é o constituinte mais recalcitrante da parede celular vegetal, com a principal função de atuar como uma barreira natural para proteção contra a degradação química e enzimática das células vegetais (HOANG *et al.*, 2021). É o biopolímero aromático renovável mais complexo, formada por vários grupos funcionais, principalmente metoxi, hidroxila fenólica, carbonila e carboxila, que determinam as propriedades químicas do material (LIU *et al.*, 2021; ASHOKKUMAR *et al.*, 2022). Além disso, é composta principalmente dos monolignóis fenilpropanoídeos siringil, guaiacil e hidroxifenol (CURRAN *et al.*, 2021).

Assim, a cristalinidade da celulose, a hidrofobicidade da lignina e o encapsulamento da celulose pela matriz lignina-hemicelulose associada fortemente pelas ligações formam essa matriz robusta (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020), que possui algumas vantagens, como boa biocompatibilidade, estereoregularidade, hidrofiliabilidade e grupos hidroxila reativos, com a celulose considerada um bom polímero para produção de biocombustíveis e produtos químicos (ASHOKKUMAR *et al.*, 2022).

2.6 Fungos: *Trametes versicolor* e *Trichoderma asperellum*

Os fungos são um grupo de microrganismos com imensa variedade de aplicações na biotecnologia e na indústria, seja para produção de antibióticos, enzimas industriais, controle de pragas e patógenos de plantas, como fertilizantes ou até mesmo biorremediadores do solo, entre outras aplicações (HYDE *et al.*, 2019).

Os fungos filamentosos são formados por uma única unidade estrutural, a hifa, e uma coleção de hifas formam o micélio, são microrganismos saprofiticos e eucarióticos, que obtêm seu carbono de material vegetal, destacando-se os gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (WIKANDARI *et al.*, 2022).

Uma das principais vantagens dos fungos filamentosos está na alta capacidade de secretar uma ampla gama de enzimas extracelulares, como celulases, xilanases, lacases e β -xilosidases (TROIANO *et al.*, 2020), importantes na conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol, na etapa de hidrólise ou sacarificação (WIKANDARI *et al.*, 2022).

Existem cerca de 100 espécies identificadas em todo o mundo do gênero fúngico *Trichoderma*, com várias vantagens quando comparada a outros fungos, como rápido crescimento, capacidade de usar diferentes substratos e boa adaptação a presença de diferentes contaminantes e condições ambientais adversas (HU *et al.*, 2020).

Os microrganismos do gênero *Trichoderma* são ascomicetos utilizados principalmente como agentes de biocontrole contra várias pragas (ZACHOW *et al.*, 2016). Entretanto, são fungos que possuem alta capacidade de secreção de enzimas e metabólitos, que incluem enzimas líticas e proteolíticas, sendo *T. reesei* a principal espécie para aplicações industriais (BISCHOF *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos na produção de enzimas utilizando o gênero *Trichoderma*, como produção de xilanase pelas espécies *T. koningii* e *T. pseudokoningii* (SANGUINE *et al.*, 2022), celulase pelo microrganismo *T. reesei* e *T. harzianum* (ALHOMODI *et al.*, 2022; GALAIN *et al.*, 2021), celulase e xilanase por *T. longiflorum* (DONG *et al.*, 2021) e produção de CMCase, celobiohidrolase, β -glicosidase, β -xilosidase pela espécie fúngica *T. reesei* (NOGUCHI *et al.*, 2022). Entretanto, com a espécie *T. asperellum*, a literatura é escassa (EZEILO *et al.*, 2019).

Atualmente, existem cerca de 10.000 espécies de fungos de podridão branca (SURYADI *et al.*, 2022), incluindo *Trametes versicolor*. Estes basidiomicetos apresentam morfologia complexa, com várias formas estruturais ao longo de suas fases, são conhecidos como fungos

de “podridão branca”, por conta de sua aparência esbranquiçada, pelo fato de consumirem a lignina da madeira mais rapidamente do que a celulose (TISMA *et al.*, 2021; SURYADI *et al.*, 2022).

Os fungos da podridão branca secretam várias enzimas oxidativas extracelulares durante o processo de degradação da lignina, capazes de despolimerizar e mineralizar a lignina, incluindo algumas oxidoredutases extracelulares, transformando em vários derivados fenólicos (TISMA *et al.*, 2021; SURYADI *et al.*, 2022).

Existem diversas pesquisas envolvendo a produção enzimática com microrganismos do gênero *Trametes*, Wang *et al.* (2014) e Xu *et al.* (2020) avaliaram a produção de lacase utilizando o microrganismo *T. versicolor*. Couto *et al.* (2004) utilizaram duas espécies de *Trametes* para produção de lacase, *T. versicolor* e *T. hirsuta*. Levin *et al.* (2008) investigaram a produção de uma série de enzimas, entre elas, β -glicosidase, β -xilosidase e lacase por *T. trogii*. Andriani *et al.* (2020) estudaram a produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas, pelo microrganismo *T. hirsuta*.

2.7 Fermentação em estado sólido (FES)

O alto custo envolvendo a produção de enzimas comerciais se tornou um grande obstáculo atualmente, de acordo com pesquisas sobre produção enzimática, os substratos são responsáveis por cerca de 40 % do custo total de produção, sendo necessário o uso de substratos alternativos (RESHMY *et al.*, 2022), como os resíduos agroindustriais, que possuem baixo custo e disponibilidade em todas as regiões do mundo, pois se trata de material residual de atividades agroindustriais (DEMIR *et al.*, 2016).

A FES é uma técnica que utiliza substratos sólidos, orgânicos e úmidos, que servem como fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos e produção de enzimas. Este método envolve uma série de etapas que são caracterizadas em processos *upstream*, *midstream* e *downstream*. O processo *upstream* envolve a preparação de substratos, meios de crescimento e o isolamento de microrganismos utilizados para a fermentação, seguido pelo processo *midstream* durante o qual o substrato é inoculado e fermentado, e por fim, o processo *downstream*, onde os produtos finais são obtidos (YAFETO *et al.*, 2022).

Essa técnica apresenta algumas vantagens sobre a fermentação submersa, porque não necessita de operação e instrumentos complexos, utilizando substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, que não requerem pré-tratamento, baixo gasto de energia, fornecendo

alto rendimento de enzimas (SADEGHIAN-ABADI *et al.*, 2019; TULY *et al.*, 2022). Além disso, a FES é considerada uma técnica com menor impacto ambiental pelo reuso de subprodutos agrícolas (TISMA *et al.*, 2021).

Os fatores mais importantes a serem considerados durante tal processo são: a escolha dos microrganismos adequados e da composição do substrato utilizado, assim como utilizar consórcios microbianos e combinações de substratos a fim de otimizar a fermentação e consequentemente aumentar a atividade enzimática (SOCCOL *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2021).

Em relação à composição do substrato nos processos de fermentação é importante equilibrar os nutrientes para sustentar o máximo crescimento microbiano e aumentar o rendimento, com monitoramento das variáveis, como temperatura, pH, umidade, entre outras (KUMAR *et al.*, 2022). Em relação a escolha do microrganismo para o processo de FES, é importante se atentar ao seu crescimento, rendimento específico do produto, capacidade de romper o substrato e boa tolerância à temperatura e pH (UPADHYAYA *et al.*, 2016).

Fungos filamentosos digerem substratos orgânicos sólidos em um ambiente com baixo teor de umidade, tornando-os ideais para uso em FES (YAZID *et al.*, 2017), os quais podem ser empregados isoladamente ou em consórcio com duas ou mais culturas (SADH *et al.*, 2018). Os substratos servem como fontes de nutrientes para os fungos sintetizarem componentes celulares e também atua como suporte sólido sobre o qual eles se desenvolvem (YAFETO *et al.*, 2022). Neste processo, destacam-se fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* na produção de enzimas lignocelulolíticas (MANAN & WEBB, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2021; YAFETO *et al.*, 2022).

2.8 Enzimas lignocelulolíticas

As enzimas atuam nas reações químicas com boa especificidade e alta atividade catalítica, tornando os processos químicos mais ecológicos e sustentáveis, em meios controlados de temperatura, pH, teor de umidade, entre outros (BILAL *et al.*, 2019). As enzimas são descritas como biocatalisadores de alta eficiência, presentes em vários processos industriais, como exemplo, as celulasas (β -glicosidases), amilases, lipases, lacases e xilanasas (β -xilosidades) (CHAPMAN *et al.*, 2018; AWASTHI *et al.*, 2022).

Os três principais componentes do sistema enzimático das celulasas são as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, catalisadores biológicos capazes de digerir a

maioria dos resíduos agrícolas, convertendo a celulose em açúcares fermentescíveis (PAUL *et al.*, 2021). As enzimas celulolíticas incluem: endoglucanases (endo-1,4 β -D-glucanases, EC 3.2.1.4), exo-glucanases (1,4 β -D-glucano-celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) e β -glicosidas (β -D-glicosídeo glico-hidrolases, celobiase, EC 3.2.1.21).

Essas enzimas, compreendem um conjunto de hidrolases glicosídicas que atuam na hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas durante a degradação da celulose (FARAINAS, 2015). A maioria das celulases são de fontes microbianas, produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* e bactérias, *Bacillus* e *Paenibacillus*. Essas enzimas clivam as ligações β -1,4 glicosídicas na celulose para produzir glicose e são utilizadas na produção de biocombustíveis, bebidas, alimentos, celulose e papel (EJAZ *et al.*, 2021). A Figura 2 apresenta o mecanismo enzimático das celulases para catalisar a hidrólise das ligações β -1,4-glicosil presentes na celulose, através da quebra da celulose em cadeias menores pela ação da β -glicosidase por meio de dois tipos de celulases, as exoglucanases que atuam na região cristalina da celulose e as endoglucanases na região amorfa (DURÁN-ARANGUREN *et al.*, 2021).

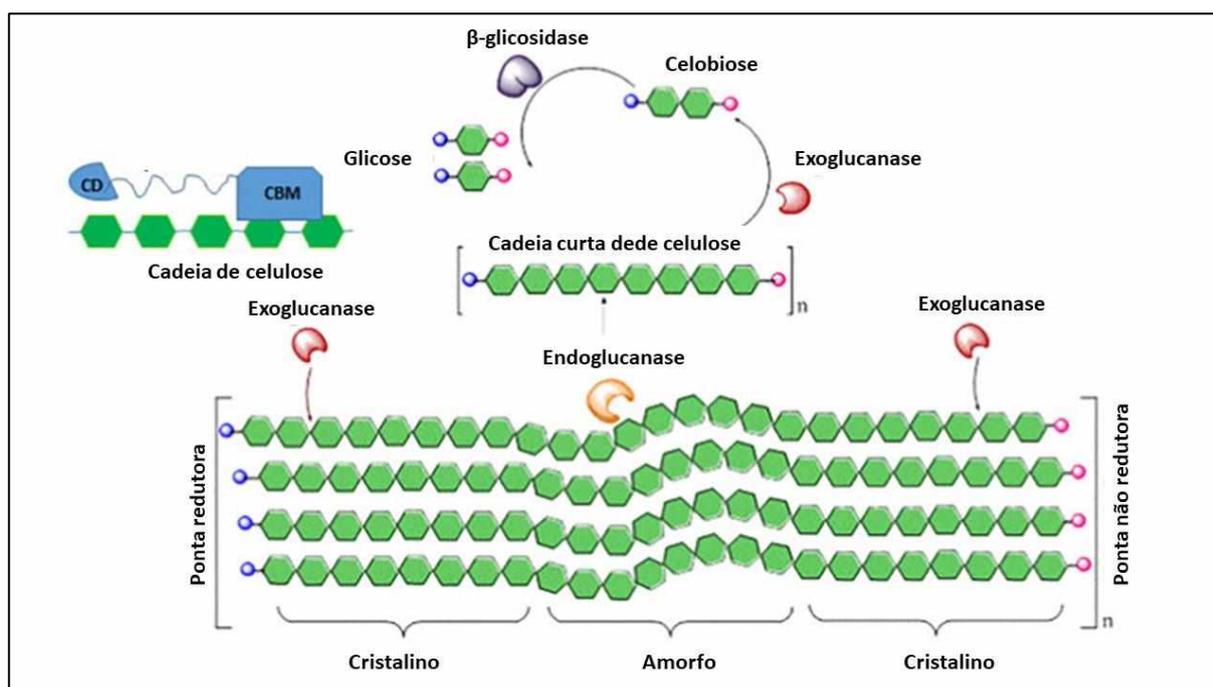


Figura 2: Mecanismo enzimático das celulases.

Fonte: Adaptado de SHING *et al.*, 2021.

Entre as enzimas hemicelulolíticas, estão as endo-xilanases (endo-1,4- β -xilanases, EC 3.2.1.8), β -xilosidas (xilan-1,4- β -xilosidase, EC 3.2.1.37), α -glucuronidas (α -glucosiduronases, EC 3.2.1.139) e α -arabinofuranosidas (α -1-arabinofuranosidas, EC 3.2.1.55) (LOPEZ-RAMIREZ *et al.*, 2018). As xilanases (EC 3.2.1.8), um dos tipos mais

comuns de hemicelulases (SINGH *et al.*, 2019), são enzimas que degradam a xilana, hidrolisando suas ligações β -1,4 para conversão da hemicelulose em pentose (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022), com seu mecanismo enzimático descrito na Figura 3. Os fungos filamentosos são os principais produtores de xilanases a nível industrial, devido ao seu fácil cultivo e alta produção de enzimas extracelulares (CRUZ DAVILA *et al.*, 2022). As β -xilosidases são enzimas responsáveis por hidrolisar xilobiose e xilooligossacarídeos obtidos da hidrólise da xilana em xilose, a partir de uma extremidade não redutora (KNOB *et al.*, 2010).

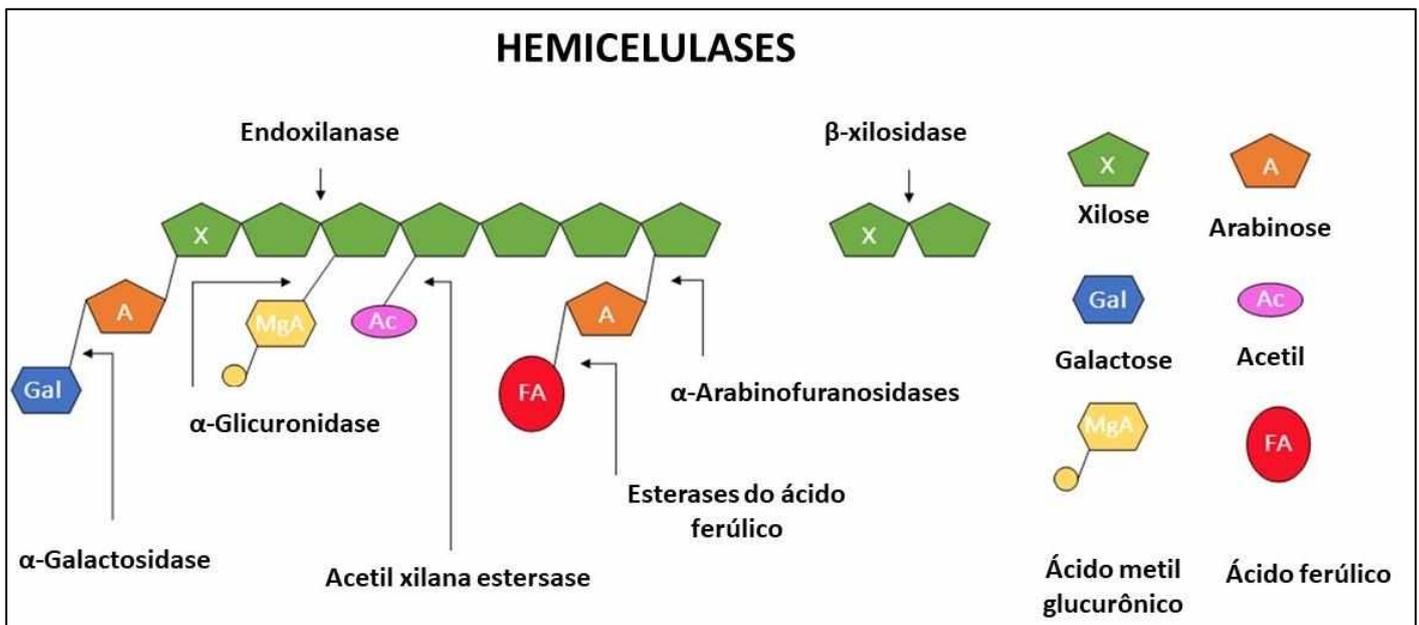


Figura 3: Mecanismo enzimático das hemicelulases.
 Fonte: Adaptado de Ramos *et al.*, (2022).

As lacases (EC1.10.3.2, benzenodiol, p-difenol: dioxigênio oxidoreductase) são oxidases da família multicobre oxidase azuis que catalisam a oxidação de um grande número de compostos aromáticos simultaneamente, com a redução do oxigênio molecular à água (SHARMA *et al.*, 2019). Estas enzimas são as principais responsáveis pela degradação da lignina recalcitrante presente na biomassa lignocelulósica (DEBNATH & SAHA, 2020).

A ação das enzimas lacases ocorre por meio de quatro moléculas de cobre (Cu) em seu sítio ativo: Cu tipo 1 (T1), Cu tipo 2 (T2) e Cu tipo 3 (T3), onde T1 forma um sítio mononuclear, e T2 e junto com T3 formam um aglomerado trinuclear. E a oxidação do substrato ocorre no sítio T1 Cu, pois os elétrons extraídos do substrato são transferidos do local T1 para o local T2/T3 através de ligações tripeptídicas His-Cys-His, e por fim acontece a redução do oxigênio molecular em água (BHARDWAJ *et al.*, 2022).

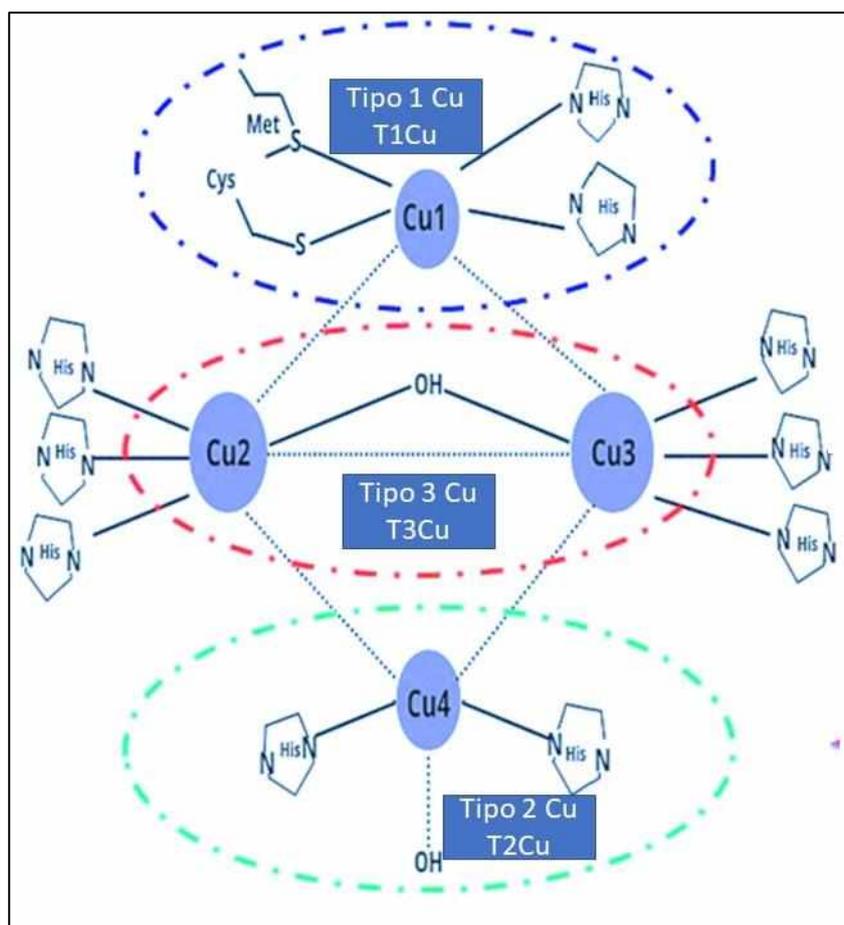


Figura 4: Mecanismo de ação das lacases.
Fonte: BHARDWAJ *et al.*, (2022).

As enzimas lignocelulolíticas representam mais de 20 % das vendas mundiais de enzimas disponíveis (TOUSHIK *et al.*, 2017), comercializadas como coquetéis enzimáticos. Um exemplo é a produção de celulase a nível industrial, que utiliza cepas de fungos geneticamente modificadas para produzir altos níveis de uma única enzima ou em consórcio (HANSEN *et al.*, 2015).

Um grande entrave para o desenvolvimento efetivo do mercado de enzimas está nos altos custos envolvendo a produção, com necessidade de reduzir os custos totais e torná-las acessíveis à indústria, com o avanço da biotecnologia, produzindo coquetéis enzimáticos mais eficientes e com o máximo rendimento (AWASTHI *et al.*, 2022).

Para a produção enzimática em grandes quantidades, com maior estabilidade e alta eficiência, é de extrema importância a escolha de substratos com baixo custo (DEBNATH & SAHA, 2020), em especial quando as enzimas são destinadas para produção de biocombustíveis de segunda geração, hidrolisando hemicelulose e celulose a açúcares simples para obtenção do bioetanol (ZHANG *et al.*, 2020a).

2.9 Bioetanol

Uma forma de minimizar os impactos ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis é aumentar o uso de energias renováveis, como os biocombustíveis. Os quais foram responsáveis por 11 % do fornecimento total de energia primária no mundo em 2020, atingindo 153 bilhões de litros (KEASLING *et al.*, 2021).

Entre eles, o bioetanol possui grande relevância, com o Brasil na segunda posição em relação à produção mundial, com 32 bilhões de litros em 2019, o que equivale a 30 % da produção global, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (SUSMOZAS *et al.*, 2020). A produção de bioetanol possui enorme potencial de diversificar a matriz energética mundial, reduzir a dependência de combustíveis fósseis e diminuir as emissões de GEEs (ABD EL-MALEK *et al.*, 2021).

Atualmente, a produção de etanol está concentrada em três principais grupos de matérias-primas: culturas contendo sacarose, como sorgo doce, cana-de-açúcar e beterraba, de origem amilácea, como trigo, milho e cevada e de biomassas lignocelulósicas, que são em geral resíduos agroindustriais (PANAHI *et al.*, 2020).

A produção de etanol a partir de matérias-primas como a sacarose da cana-de-açúcar, e do amido de milho é conhecida como biocombustíveis de primeira geração (1G) (DEVARAPALLI & ATIYEH, 2015). Os biocombustíveis de segunda geração (2G), são produzidos a partir de biomassa lignocelulósica residual, como bagaço de cana e de sorgo sacarino, palha de milho, trigo e de arroz, casca de arroz, madeira dura e macia, resíduos de celulose, biomassa herbácea e lenhosas (QUINTERO *et al.*, 2013; PRASAD *et al.*, 2019). O bioetanol de terceira (3G) é obtido a partir de micro e macroalgas e cianobactérias, e o de quarta geração (4G) a partir de microrganismos geneticamente modificados (BEZERRA *et al.*, 2021).

Para a produção de bioetanol 2G, utiliza-se como matéria-prima biomassa lignocelulósica presente em resíduos agroindustriais, sendo considerada uma das principais fontes de energia renovável, disponível em todas as regiões (CRUZ DAVILA *et al.*, 2022), colaborando para a valorização energética de material residual e na redução da poluição ambiental (SIROHI *et al.*, 2020). Além disso, o etanol 2G apresenta inúmeras vantagens, como ser produzido com matérias-primas de baixo custo e em abundância na natureza, não competição com a produção agrícola de alimentos, sendo viável tanto economicamente como ambientalmente.

A conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol é complexa, e envolve três etapas. Primeiramente, ocorre a deslignificação, no qual as ligações entre a lignina e a celulose e hemiceluloses são quebradas para aumentar a acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos na próxima etapa de sacarificação. Na segunda etapa, os polímeros de carboidratos são hidrolisados enzimaticamente em açúcares livres, para posterior fermentação alcóolica das pentoses e hexoses em bioetanol, na terceira e última etapa (PANAHI *et al.*, 2022).

O bagaço de uva é considerado uma biomassa adequada para produção de biocombustíveis, pois contém a maioria dos carboidratos solúveis em água, como glicose e frutose, que através de bioprocessos podem ser convertidos em etanol (SIROHI *et al.*, 2020; BHARATHIRAJA *et al.*, 2020). Por exemplo, no estudo realizado por Corbin *et al.* (2015), o bagaço de uva foi utilizado na fermentação alcóolica, resultando na produção de 211 litros de etanol a partir de 100 toneladas de bagaço de uva vermelha e 400 litros com a uva branca, evidenciando ainda que o material resultante da sacarificação, rico em polifenóis pode ser utilizado na alimentação animal, ou aplicado em solos como fertilizante agrícola. E em estudo desenvolvido por Okamoto *et al.* (2011), os autores obtiveram 4,3 g/l de etanol utilizando farelo de trigo, com um rendimento teórico de 78,8 %.

Assim, para o desenvolvimento contínuo da produção e utilização de biocombustíveis, é de extrema importância a escolha adequada da biomassa, identificar suas características, assim como as propriedades do biocombustível, para otimizar sua produção e melhorar a eficiência (LIN & LU, 2021). Além disso, para a escolha do melhor processo para a produção do biocombustível deve-se avaliar parâmetros como concentração, produtividade e rendimento do bioetanol e custos do processo, além dos microrganismos utilizados (BENDER *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a biossíntese enzimática pelas linhagens fúngicas *T. versicolor* e *T. asperellum*, através de fermentação em estado sólido (FES), utilizando bagaço de uva e farelo de trigo como fonte de carbono.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar química e estruturalmente o bagaço de uva e farelo de trigo, quanto aos teores de celulose, lignina, hemicelulose;
- Produzir enzimas lignocelulolíticas pelas espécies fúngicas em monoculturas e em consórcio, bem como em substratos únicos e associados;
- Realizar a análise estatística dos dados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em três etapas, sintetizadas no fluxograma abaixo (Figura 5), detalhadas nos tópicos seguintes. As etapas de caracterização foram desenvolvidas no Laboratório de Reciclagem de Polímeros (LABREPOL), e as de fermentação em estado sólido e dosagem de enzimas no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMIC), ambos na Universidade Federal de Uberlândia.



Figura 5: Fluxograma etapas do projeto.

Fonte: O autor, 2023.

4.1 Preparação da Biomassa

Como biomassa lignocelulósica foram utilizados farelo de trigo (*Triticum aestivum*), adquirido em uma cerealista no município de Uberlândia e o bagaço de uva tinta (*Vitis vinífera*), derivado de processamento de vinhos, contendo as variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Carmenère, fornecido pela Vinícola Nardello (Morro Redondo, RS). O bagaço de uva utilizado no estudo é constituído de casca, talos e semente de uva vermelha, gerados após o processamento da fruta para produção de vinho tinto (Figura 6).



Figura 6: Bagaço de uva.

Fonte: O autor, 2022.

Inicialmente, o bagaço de uva foi seco em estufa por quatro horas a 105°C e após esse período, a biomassa foi resfriada em dessecador por 60 minutos, até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foi aplicado um pré-tratamento físico simples no material residual, que foi triturado em liquidificador por 3 a 5 minutos, para alterar a granulometria da biomassa. O farelo de trigo foi lavado em água corrente várias vezes até que a água de lavagem ficasse incolor, para remoção de todo o resíduo de amido presente, e seco ao ar livre. Após a secagem, foi armazenado em dessecador (Figura 7).

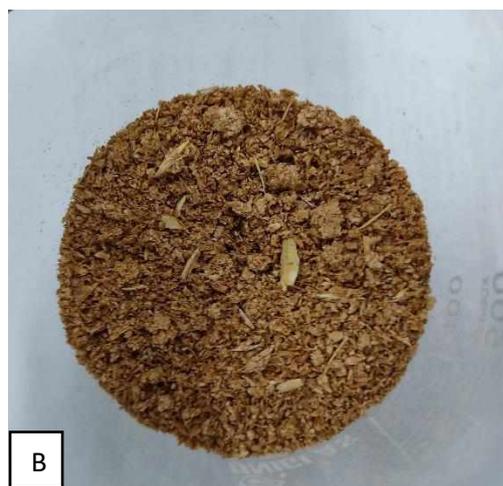


Figura 7: Biomassa triturada: (a) bagaço de uva e (b) farelo de trigo.

Fonte: O autor, 2023.

4.2 Caracterização das biomassas

A composição química do bagaço de uva bruto e do farelo de trigo foi determinada conforme as normas TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry*): teor de extrativos TAPPI T204 cm – 97 (2007), umidade TAPPI T264 OM-88 (1996), cinzas TAPPI T211 OM-93 (2002) e teor de lignina Klason insolúvel e solúvel TAPPI T13M-54. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em base seca.

4.2.1 Teor de extrativos

A determinação do teor de extrativos polares das amostras brutas foi realizado utilizando 500 mL de água destilada em extrator Soxhlet, que possui um sifão que proporciona o refluxo contínuo do solvente com a amostra dentro de um cartucho de extração de papel filtro por 50 horas (TAPPI T204 cm – 97). Após esse período, o material foi seco em estufa a 105 °C por 12 horas e resfriado em dessecador até temperatura ambiente.

Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento para determinar o teor de extrativos apolares, utilizando 250 mL de uma mistura de etanol/hexano (1:1 v/v). O conteúdo de extrativos solúveis foi determinado pela diferença de massa da amostra antes e após extração, através da Equação 1:

$$\text{Extrativos} = \frac{(W_{ci} - W_{\phi}) - (W_{cf} - W_{\phi})}{(W_{ci} - W_{\phi})} * 100 \quad (1)$$

Onde:

W_{ci} = massa da biomassa inicial com extrativos, antes do processo de extração e massa do papel filtro;

W_{cf} = massa da biomassa livre de extrativos após o processo de extração e massa do papel filtro;

W_{ϕ} = massa do papel filtro.

4.2.2 Teor de Umidade

O teor de umidade foi realizado a partir de 1,0 g de amostra em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado e acondicionou-se em estufa a 105 °C por 2 horas (TAPPI T264 OM-88). Posteriormente, o cadinho foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado.

Em seguida, o conjunto foi colocado novamente na estufa por 1 hora a 105 °C, sendo repetido tal procedimento até que a amostra atingisse massa constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença percentual entre a massa inicial e a massa final da amostra após o processo de secagem, conforme Equação 2:

$$Umidade(\%): \frac{(W - W_c) - (W_f - W_c)}{(W - W_c)} * 100 \quad (2)$$

Onde:

W = conjunto inicial, massa da biomassa com umidade;

W_c = peso do cadinho;

W_f = conjunto final, massa da biomassa após o processo de secagem.

4.2.3 Teor de Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada com cadinho de porcelana previamente seco e tarado, o qual adicionou-se 1,0 g de biomassa e, em seguida, encaminhado para um forno mufla a 800 °C por quatro horas (TAPPI T211 OM-93). Após esse período, o cadinho com a amostra calcinada foi resfriado em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesado. O conteúdo de cinzas foi determinado considerando a porcentagem de massa da amostra após a calcinação com relação a massa inicial de amostra seca, conforme Equação 3:

$$Teor de Cinzas(\%): \frac{(W_c - W)}{(W_b)} * 100 \quad (3)$$

Onde:

W_c = cadinho com as cinzas, massa das cinzas após calcinação;

W = peso do cadinho;

W_b = massa da biomassa antes do processo.

4. 2.4 Lignina Klason Insolúvel

Primeiramente, pesou-se 1,0 g da amostra seca, a qual foi disposta em um almofariz e, em seguida, adicionou-se 15 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72 % (m/m) (d = 1,6338 g mL⁻¹, 20 °C). Posteriormente, macerou-se a amostra por duas horas a temperatura ambiente, até que todas as partículas estivessem esmagadas e misturadas. Após este período, a mistura foi transferida para um balão de fundo chato com capacidade de 1 L e diluída com 550 mL de água destilada para que a concentração de H₂SO₄ fosse de 3 % (m/m), em um sistema de refluxo aquecido a 50°C por quatro horas.

Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em funil de vidro sinterizado n° 4, previamente seco e tarado, e coletou-se o filtrado para análise posterior de lignina klason solúvel. O funil com a lignina insolúvel foi seco em estufa a 105°C por 12 horas, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado pela relação entre a porcentagem da massa de lignina insolúvel em relação à massa inicial de amostra seca, conforme Equação 4 (TAPPI T13M-54).

$$\text{Teor de Lignina Insolúvel (\%)}: \frac{(m_i - m_f)}{(m_f)} * 100 \quad (4)$$

Onde:

m_i = massa de lignina klason insolúvel (g);

m_f = massa inicial da amostra (g).

4. 2.5 Lignina Klason Solúvel

O filtrado na determinação do teor de lignina klason insolúvel foi utilizado para quantificar o teor de lignina klason solúvel. As soluções para as análises foram preparadas através de uma diluição em água até a concentração final de 0,05 mol L⁻¹ de H₂SO₄. Uma solução de referência (branco) de concentração de 0,05 mol L⁻¹ foi preparada, a partir do H₂SO₄ 72 %. A quantificação foi realizada por espectroscopia na região do ultravioleta (UV-VIS), onde mediu-se a absorvância do filtrado nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. A concentração (g L⁻¹) de lignina klason solúvel foi calculada conforme Equação 5:

$$C(gL^{-1}) = \frac{[(4,53 * A_{215}) - A_{280}]}{(300)} \quad (5)$$

Onde,

$C(g, L^{-1})$ = corresponde a concentração de lignina klason solúvel em meio ácido;

A_{215} = o valor da absorvância em 215 nm;

A_{280} = o valor da absorvância em 280 nm.

A absorvância em 280 nm corresponde a uma correção para os compostos de furfural gerados no processo de hidrólise, enquanto que a absorvância em 215 nm é a medida da concentração de lignina solúvel. Dessa forma, a Equação (5) é resultante da resolução simultânea das Equações 6 e 7:

$$A_{280} = 0,68 CD + 18 CL \quad (6)$$

$$A_{215} = 0,15 CD + 70 CL \quad (7)$$

Onde:

A_{280} = representa o valor da absorvância a 280 nm;

A_{215} = é o valor da absorvância a 215 nm;

C_D = a concentração dos carboidratos ($g L^{-1}$);

C_L = a concentração da lignina solúvel ($g L^{-1}$).

Os valores 0,68 e 0,15 correspondem, respectivamente, às absorvâncias molares dos produtos de degradação dos carboidratos em 280 e 215 nm, e os valores 18 e 70 são as respectivas absorvâncias molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm.

4. 2.6 Determinação de holocelulose

A quantificação da holocelulose constitui-se em pesar 5,0 g de amostra seca em um frasco do tipo Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 100 mL de água destilada (BROWNING, 1967). Em seguida, o Erlenmeyer foi colocado em banho maria, a 75 °C e adicionou-se 2,0 mL de ácido acético (CH₃COOH) e 3,0 g de clorito de sódio (NaClO₂), nesta ordem, tampando o frasco para não ocorrer a perda do gás produzido na reação. Após 60 minutos, adicionou-se novamente 2,0 mL de CH₃COOH e 3,0 g de NaClO₂, sendo esse processo repetido por mais duas vezes.

E como próxima etapa, a mistura foi resfriada em banho de gelo até 10 °C, filtrada em funil de vidro sinterizado n° 2, previamente seco e tarado, e lavada com água destilada a 5 °C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído fosse igual ao da água de lavagem. Em seguida, o funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 °C por seis horas, resfriado em dessecador e pesado. O percentual de holocelulose foi calculado pela relação entre a massa de holocelulose obtida e a massa inicial da amostra (Equação 8).

$$\text{Teor de holocelulose (\%)} = \frac{md}{mi} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

md = massa de holocelulose seca (g);

mi = massa de bagaço inicial seca (g).

4. 2.7 Determinação de celulose

Para a determinação de celulose, transferiu-se 3,0 g de holocelulose seca para um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de solução de hidróxido de potássio 5 % (KOH) e borbulhou-se gás nitrogênio durante os primeiros cinco minutos da extração, para evitar a oxidação da celulose (BROWNING, 1967). O frasco foi vedado e mantido em agitação constante por duas horas. A mistura foi então filtrada em funil de vidro sinterizado n° 2, lavada com 50 mL de solução de KOH 5 % e, em seguida, com 100 mL de água destilada. O resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o frasco de 250 mL e o mesmo procedimento de extração foi repetido utilizando solução de KOH 24 %. Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25 mL de solução de KOH 24 %, 50 mL de água destilada, 25 mL de CH₃COOH 10 % e 100 mL de água destilada.

Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de KOH, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. Por fim, o resíduo foi lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 °C por seis horas e pesado. O conteúdo de celulose foi determinado como a porcentagem da massa de resíduo em relação à massa inicial de amostra seca, levando em conta o rendimento calculado na obtenção da holocelulose (Equação 9).

$$\text{Teor de celulose (\%)} = \frac{md}{mi} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

md = massa de celulose seca (g);

mi = massa de holocelulose inicial seca (g).

4. 2.8 Teor de hemiceluloses

O teor de hemiceluloses foi determinado pela diferença percentual entre a holocelulose e a celulose em relação à massa inicial de amostra seca, levando em conta a o rendimento calculado na obtenção da holocelulose (Equação 10).

$$\text{Teor de hemicelulose (\%)} = \text{Teor de holocelulose} - \text{Teor de celulose} \quad (10)$$

4. 2.9 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

Para analisar os grupos funcionais das fibras do bagaço de uva e farelo de trigo, foram obtidos espectros vibracionais na região do infravermelho, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu IRPrestige 21. Seguindo metodologia de Da Silva *et al.* (2018), com modificações, as amostras foram pastilhadas com brometo de potássio (KBr), com concentração de 1:100 (m/m), para posterior leitura na região de 4500 a 350 cm^{-1} , com resolução do equipamento de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4. 2.10 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

Com o intuito de determinar as concentrações químicas do bagaço de uva e farelo de trigo, foi utilizado a técnica Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) integrada a Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios - X (EDS), caracterizada por ser uma análise semi-quantitativa que permite identificar os elementos químicos presentes na amostra. Além disso, vale ressaltar que no presente estudo não será utilizado as imagens que são geradas pela técnica de MEV, apenas os dados dos elementos presentes nas amostras.

Para tanto, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura, modelo Shimadzu SSX-550. Para realização de tal análise, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio, com fita de carbono e metalizadas com ouro, sendo possível obter as concentrações dos principais elementos químicos (MACHADO *et al.*, 2020).

4.3 Fermentação em Estado Sólido (FES)

4.3.1 Substratos

Os substratos utilizados como fonte de carbono na FES foram bagaço de uva e farelo de trigo, triturados e armazenados livres de umidade e qualquer possível contaminação. O bagaço de uva foi submetido à seleção granulométrica, utilizando uma peneira estilo TYLER, da marca Bertel Indústria Metalúrgica Ltda com dimensões de 8"X2" INOX 304 ABNT/ASTM 12 MESH/TYLER 10, com abertura de 1.70 mm, tela em inox, acoplada a um agitador de peneiras da marca Bertel Indústria Metalúrgica Ltda (peneira de malhas 10). Para o farelo de trigo, foi utilizado uma peneira manual com gramatura de 0,6 mm. Os substratos foram utilizados separadamente e em associação.

4.3.2 Microrganismos

A linhagem fúngica *Trametes versicolor* 561 foi isolada de madeira em decomposição e obtida da coleção do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC- UFU), onde a pesquisa foi desenvolvida.

A linhagem *Trichoderma asperellum* foi cedida gentilmente pela empresa Biosag (Comércio e Serviços Agrícolas Ltda, Brasil). As linhagens fúngicas foram cultivadas

individualmente em placas de Petri em meio *Ágar Potato Dextrose* (PDA) e incubadas por sete dias a 28°C, tempo necessário para crescerem por toda a placa e para a retirada de discos miceliais de cerca de 6 mm de diâmetro (Figura 8 e 9). As linhagens fúngicas foram também cultivadas no mesmo meio, a fim de observar seu comportamento quando em consórcio (Figura 10).



Figura 8: Pré-inóculo em placa da espécie fúngica *Trichoderma asperellum*.

Fonte: O autor, 2023.



Figura 9: Pré-inóculo em placa da espécie fúngica *Trametes versicolor* 561.

Fonte: O autor, 2023.



Figura 10: Pré-inóculo em placa das espécies fúngicas *T. versicolor* e *T. asperellum* cultivadas em consórcio.

Fonte: O autor, 2023.

4.3.3 Produção de enzimas

Foram realizadas nove fermentações em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de substrato e 60 % de umidade, estabelecido em análises prévias. Cada fungo foi cultivado individualmente em bagaço de uva, farelo de trigo e em combinação na proporção de 1:1 (m/m) (2,5 g de bagaço de uva e 2,5 g de farelo de trigo), e foram realizadas fermentações com as duas linhagens fúngicas em consórcio nas mesmas condições (Figura 11). Os substratos foram suplementados com 5 mL de solução nutriente, contendo 0,35 % de sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄), 0,3 % de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 0,05 % de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg₂SO₄.7H₂O) e 0,05 % de cloreto de cálcio (CaCl₂) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Em seguida, os frascos foram vedados e autoclavados.

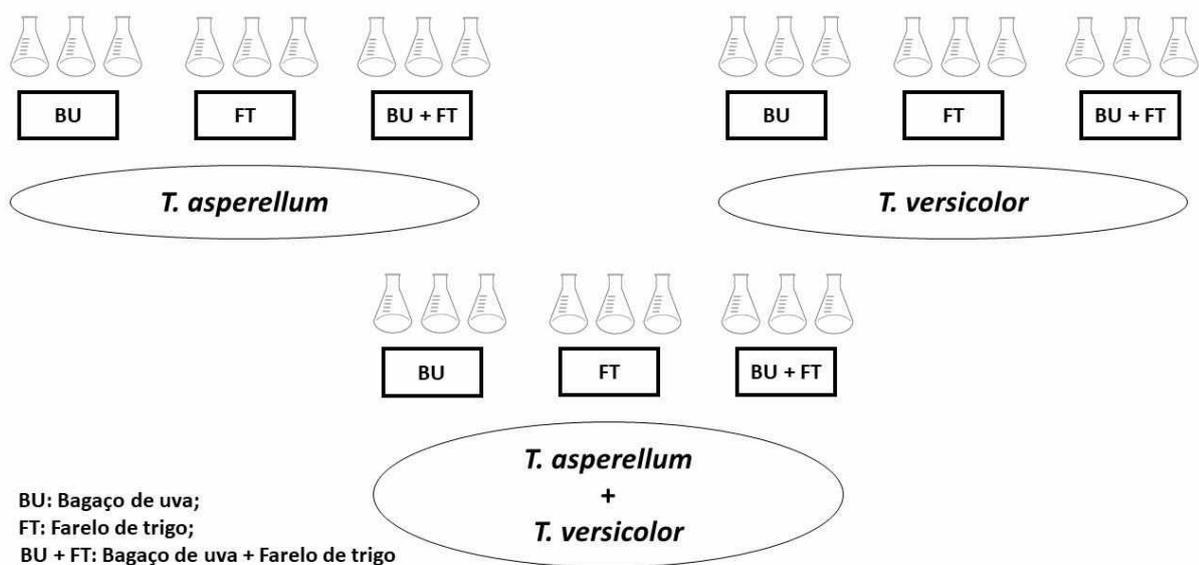


Figura 11: Fermentação em estado sólido realizadas no presente estudo.

Fonte: O autor, 2022.

Após o processo de esterilização, cada frasco contendo os substratos foi inoculado com seis discos miceliais (± 6 mm) de cada linhagem fúngica, separadamente e, quando em consórcio, três discos miceliais de cada espécie. Em seguida, os frascos foram incubados em BOD, a 28°C por sete dias (Figura 12). Todas as fermentações foram conduzidas em triplicatas. A cada 24 horas, três frascos foram retirados da incubadora, acrescentados de 50 mL de água destilada, homogeneizados e submetidos à agitação orbital por 60 minutos a 150 rpm para a extração de enzimas. Em seguida, o material foi filtrado em tecido *voil* e centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm ou 8760 G. Os sobrenadantes contendo os extratos enzimáticos foram aliquotados e congelados a -20 °C.

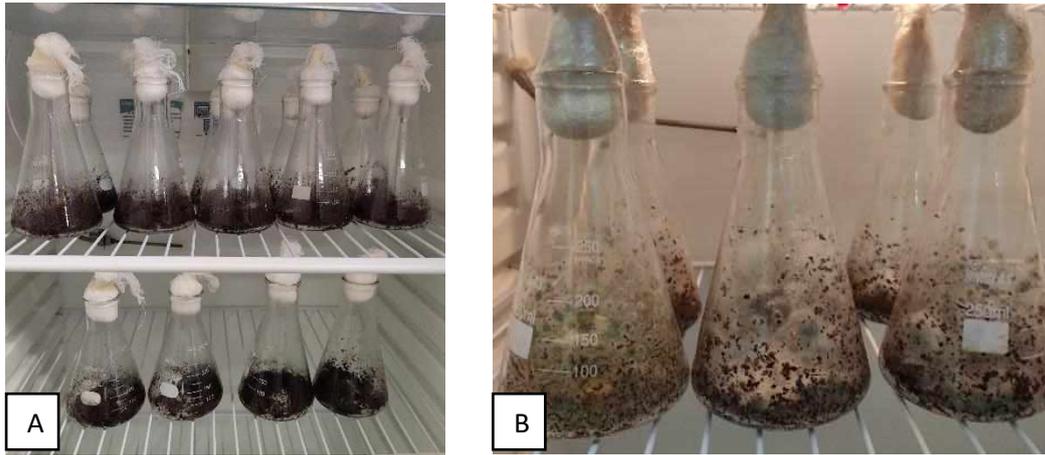


Figura 12: Frascos de Erlenmeyer no processo de FES (a) e (b).

Fonte: O autor, 2022.

4.4 Quantificação Enzimática

4.4.1 β -Glicosidase

A determinação de β -glicosidase foi realizada em uma mistura de reação contendo 50 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de solução tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, *Sigma*) como substrato a 40°C por 10 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2 M e a concentração de p-nitrofenol (pNP) liberado foi determinada por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de pNP por minuto de reação a partir de uma curva padrão de pNP (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

4.4.2 β -Xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi determinada pelo mesmo procedimento e nas mesmas condições para β -glicosidase, porém, utilizando-se p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo 4 mM (PNPX, *Sigma*) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de pNP por minuto de reação, a partir da curva padrão de pNP (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

4.4.3 Xilanase

A dosagem de xilanase foi realizada pelo método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), utilizando xilana (*Sigma*) 1% como substrato em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 por 10 minutos a 50°C (MILLER, 1959; DOS SANTOS *et al.* 2015). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose por minuto de reação, a partir de uma curva padrão de xilose.

4.4.4 Lacase

A atividade de lacase (La) foi determinada pelo monitoramento da oxidação do substrato ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS) a 50°C, por 10 minutos em uma mistura de reação contendo 400 μL tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 50 μL de solução de ABTS 0,01 M e 50 μL de extrato enzimático bruto (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015). A absorbância foi medida a 420 nm. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. O cálculo da atividade foi realizado utilizando coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon_{420\text{ nm}} = 3,6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.5 Análise estatística

O desvio padrão foi calculado a partir dos resultados obtidos para cada produção enzimática (dados em triplicata), e a análise estatística foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk, o qual foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Para os dados normais, foi feita a análise de variância (ANOVA), seguida de um teste Tukey, para identificar se houve ou não diferença significativa entre os extratos enzimáticos na produção de enzimas, com nível de significância de 5 %. Para os dados não normais ($p < 0,05$) será aplicado o teste de Kruskal-Wallis. As análises foram executadas no Action 2.9 e Sisvar 5.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das biomassas

Os valores percentuais da composição química do bagaço de uva e do farelo de trigo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química dos substratos lignocelulósicos utilizados no presente trabalho.

Composição Química (%)	Bagaço de uva	Farelo de trigo
Cinzas	2,46 ± 0,16	3,75 ± 0,56
Extrativos	26,85 ± 2,7	8,9 ± 3,06
Lignina Klason total	53,80 ± 1,38	19,3 ± 7,02
Celulose	30,76 ± 3,43	45,2 ± 2,68
Hemicelulose	19,55 ± 7,3	28,8 ± 5,60
Balanço de massa	133,35	105,95

A composição de materiais lignocelulósicos pode variar e depender de uma série de fatores, mas em geral, possuem entre 10–25 % de lignina, 40–50 % de celulose e 5–30 % de hemicelulose (ANWAR *et al.*, 2014). No entanto, o bagaço de uva, difere de outros resíduos lignocelulósicos, apresentando elevado percentual de lignina. No presente estudo, observou-se 53,80 % de lignina, resultado em consonância com o valor encontrado por outros autores, como FERREIRA *et al.* (2021), que observaram 49,62%, MORTARI *et al.* (2021) após caracterização do bagaço encontraram 42,4 % de lignina e FILIPPI *et al.* (2021) obtiveram 34,79 % deste componente na biomassa de bagaço de uva analisada.

A composição mássica dessa biomassa depende de uma série de fatores, principalmente ao tipo de processo de vinificação do vinho tinto, pois o bagaço de uva permanece com o mosto por vários dias para atingir as características desejadas, e esse alto valor de lignina pode estar relacionado à presença de taninos condensados e também a proteínas resistentes presentes nesse material (CORBIN *et al.*, 2015), além da presença de sementes, que possuem uma quantidade comparativamente maior de lignina do que nas cascas (PEDRAS *et al.*, 2020) e talos, devido ao desengace (separação dos grãos da uva do engaço) incompleto (FILIPPI *et al.*, 2021).

No presente estudo, o bagaço de uva utilizado sofreu apenas o processo de trituração, não foi submetido a qualquer tipo de pré-tratamento para alterar sua composição química. No entanto, para facilitar o acesso das enzimas à fração de celulose na hidrólise enzimática, é

necessário o emprego de pré-tratamentos de deslignificação para remoção de parte da lignina. Por exemplo, Dávila *et al.* (2019) observaram que o pré-tratamento alcalino com micro-ondas no bagaço de uva pode atingir até 89 % de deslignificação, alterando as características da elevada parcela recalcitrante presente nessa biomassa.

Com relação à celulose e hemicelulose presentes no bagaço de uva, foram obtidos 30,76 e 19,55 %, respectivamente. Em estudo realizado por Madadian *et al.* (2022), os autores encontraram 19 % de celulose e 26 % de hemicelulose na composição do bagaço de uva. Pedras *et al.* (2020), obtiveram 15, 11,3 e 30,3 % para celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente, além de outros componentes presentes no material, como 2,8 % de glicose, 4,1 % de xilose e 2,7 % de arabinose.

A concentração das frações lignocelulósicas do bagaço de uva depende de uma série de fatores, desde a colheita, até o tipo de vinho produzido, mas geralmente se encontra entre 22,9 – 49,6 % de lignina, celulose entre 12,19 – 36,3 % e hemicelulose entre 12,5 – 35,3 % (AMENDOLA *et al.*, 2012; PING *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2021).

Em relação à composição do farelo de trigo, este resíduo mostrou ser uma boa fonte de polissacarídeos, com 45,2 % de celulose, 28,8 % hemiceluloses e 19,3 % de lignina. Estes valores estão em consonância com os encontrados por Xiao *et al.* (2019), nos quais observaram 31,1 % de celulose, 34,3 % de hemicelulose e 16,3 % de lignina neste resíduo. Entretanto, Cingoz *et al.* (2022) obtiveram aproximadamente 30 % de celulose, 25 % de hemicelulose, e apenas 8 % de lignina, mostrando que a caracterização das biomassas lignocelulósicas podem divergir, mesmo se tratando do mesmo tipo de resíduo.

Teles *et al.* (2021) caracterizaram bagaço de uva e farelo de trigo e também observaram alto teor de lignina e baixos valores para celulose e hemicelulose no bagaço de uva em relação ao farelo de trigo, corroborando com os dados do presente estudo, e enfatizando que o bagaço de uva é uma biomassa com característica recalcitrante e de difícil degradação.

Além disso, os percentuais mássicos encontrado no farelo de trigo seguem o percentual das biomassas lignocelulósicas convencionais, como o bagaço de cana-de-açúcar, que apresentou 52 % de celulose, 28 % de hemicelulose e 22 % de lignina, valores esses analisados em estudo desenvolvido por DE OLIVEIRA *et al.* (2020). Com esse resultado, pode-se afirmar que o farelo de trigo apresenta elevadas concentrações de celulose e hemicelulose, resultado positivo por serem mais acessíveis e de fácil degradação quando aplicados a processos bioquímicos. Além disso, o farelo de trigo apresenta monossacarídeos na sua composição, como

xilose, em torno de 13,7 %, arabinose 8,1 % e 15,9 % de proteínas (PIHLAJANIEMI *et al.*, 2020).

5.2 Análise estrutural

Com relação aos espectros obtidos por FTIR para o bagaço de uva e farelo de trigo, foi possível verificar algumas diferenças na composição química desses dois materiais através desta técnica (Figura 13).

O pico em torno de 3400 cm^{-1} corresponde às vibrações dos grupos hidroxila (O - H) dos compostos fenólicos da biomassa ou da umidade fisicamente adsorvida, sendo maior com a biomassa farelo de trigo (Tabela 2). As bandas de vibrações das ligações C - H nos espectros de compostos orgânicos aparecem na faixa de 3.000 a 2.850 cm^{-1} , apresentando valores iguais para ambas biomassas de 2924 cm^{-1} . Além disso, é atribuído aos picos entre 2920 e 2850 cm^{-1} , vibrações de alongamento C - H de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$. Os picos entre 1745 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} são atribuídas à vibração das ligações C = O e C - O das unidades acetil éster presentes na hemicelulose. O pico em 1515 cm^{-1} é atribuído às vibrações dos anéis aromáticos de lignina, apresentado na biomassa de bagaço de uva, 1572 cm^{-1} (IOANNIDOU *et al.*, 2022).

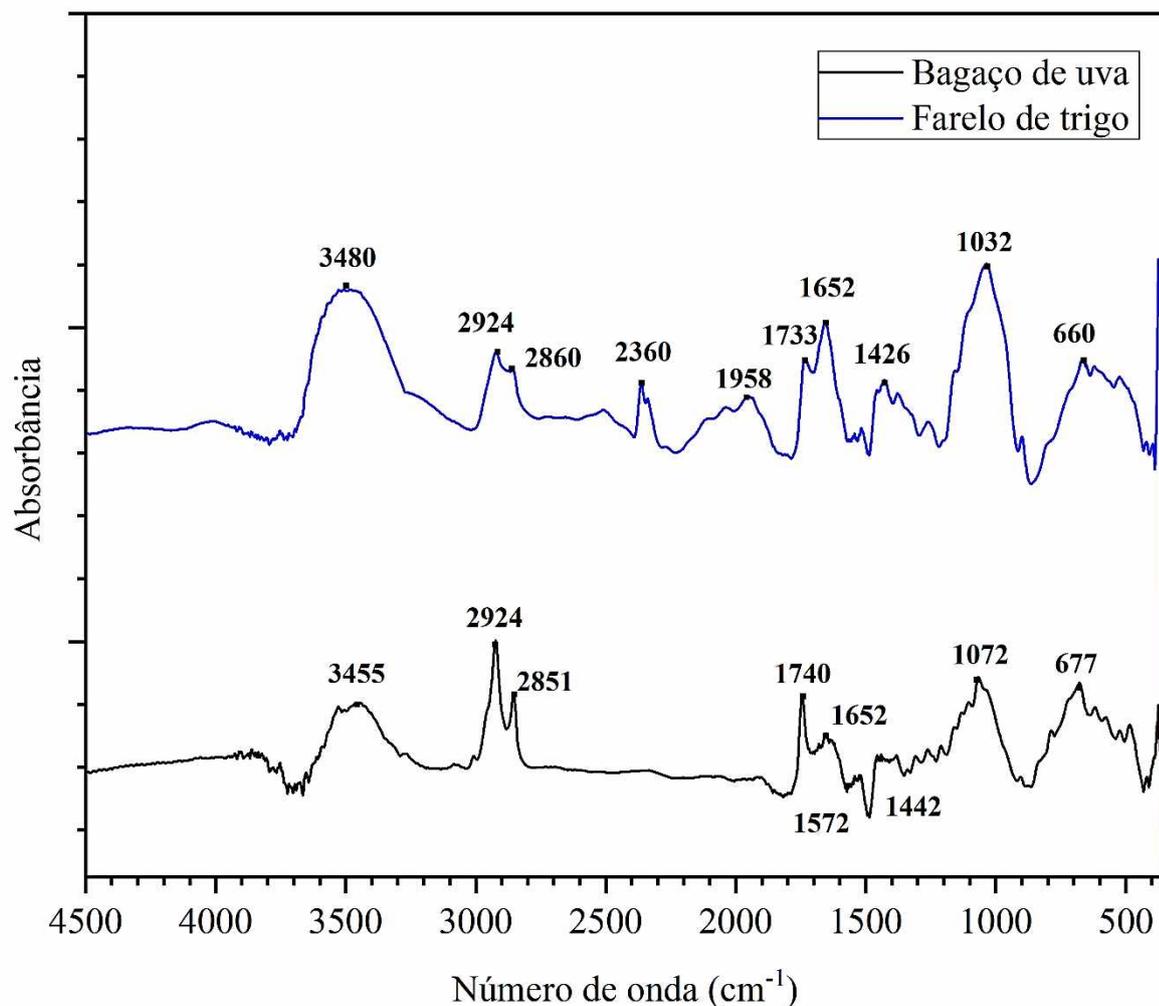


Figura 13: FTIR bagaço de uva e farelo de trigo.
 Fonte: O autor, 2022.

Tabela 2: Principais atribuições dos grupos funcionais presentes nas amostras.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuições das absorções
Bagaço de uva	Farelo de trigo	
3455	3480	Estiramento O–H em ligações de hidrogênio
2924	2924	Estiramento assimétrico C–H alifático
2851	2860	Estiramento simétrico C–H alifático
-	2360	C-H de aldeídos
-	1958	C=C=C (alenos)

1740	1733	C=O de aldeídos
1652	1652	Estiramento C=O da carbonila
1572	-	C=C de aromáticos
1442	1426	CH ₂
1072	1032	Deformação C-H aromática no plano e deformação C-O de álcool primário
677	660	-CH=CH

Da Silva *et al.* (2022), também realizaram análise no espectro do bagaço de uva e identificaram alguns picos como: 2928 cm⁻¹ (ligações C-H saturadas), 1617 cm⁻¹ (C ligação dupla C), 1617 cm⁻¹ (C ligação dupla O no sistema de ligações conjugadas), 1400–1452 cm⁻¹ (C ligação dupla C-C em anéis aromáticos) e 1041 cm⁻¹ (C-O), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Li *et al.* (2022) observaram que as bandas de absorção características do farelo de trigo, incluem ligação simples de alongamento vibracional de OH em torno de 3400 cm⁻¹, ligação simples CH em torno de 2926 cm⁻¹ e ligação dupla vibração de estiramento de CO em torno de 1652 cm⁻¹, valores próximos ou iguais aqui apresentados.

Por meio da análise composicional por EDS, foi possível observar as porcentagens mássicas da Tabela 3. Nesta técnica, verifica-se a composição mineralógica das amostras através da geração de espectros de energia e mapas elementares, observando que o elemento presente em maior quantidade foi o carbono (C), com 61,02 % no bagaço de uva e 51,06 % no farelo de trigo, seguido do oxigênio (O), com 30,75 % no bagaço de uva e 48,08 % no farelo de trigo, sendo essa uma característica representativa das biomassas lignocelulósicas.

Tabela 3: Porcentagem mássica bagaço de uva e farelo de trigo.

	C %	O %	S %	Na %	Mg %
Bagaço de Uva	61,02	30,75	0,41	0	0
Farelo de trigo	51,06	48,08	0	0	0,21

Foi ainda possível observar a presença de uma pequena parcela de enxofre (S) e magnésio (Mg), mas essas podem estar relacionadas a resíduos, sendo desprezadas na

quantificação dos elementos totais. Nas Figuras 13 e 14, estão descritas as concentrações dos elementos presentes em cada amostra.

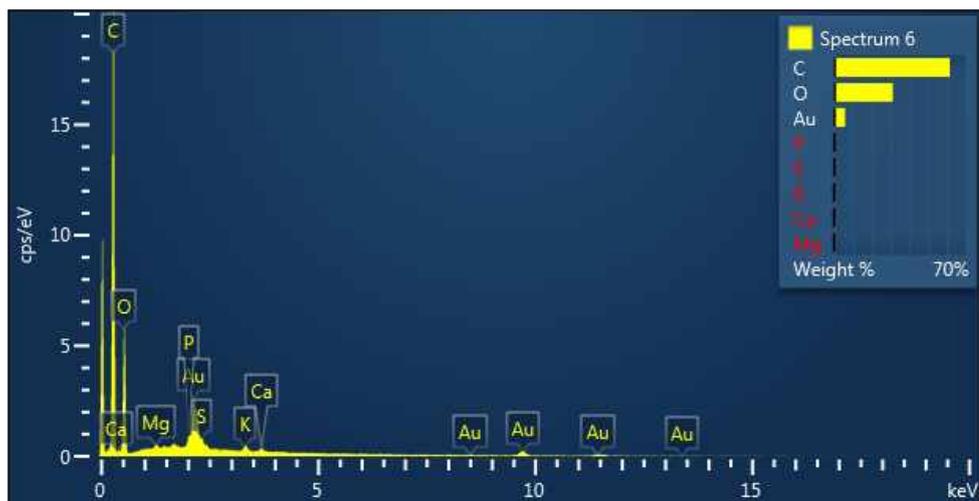


Figura 14: EDS bagaço de uva.
Fonte: O autor, 2023.

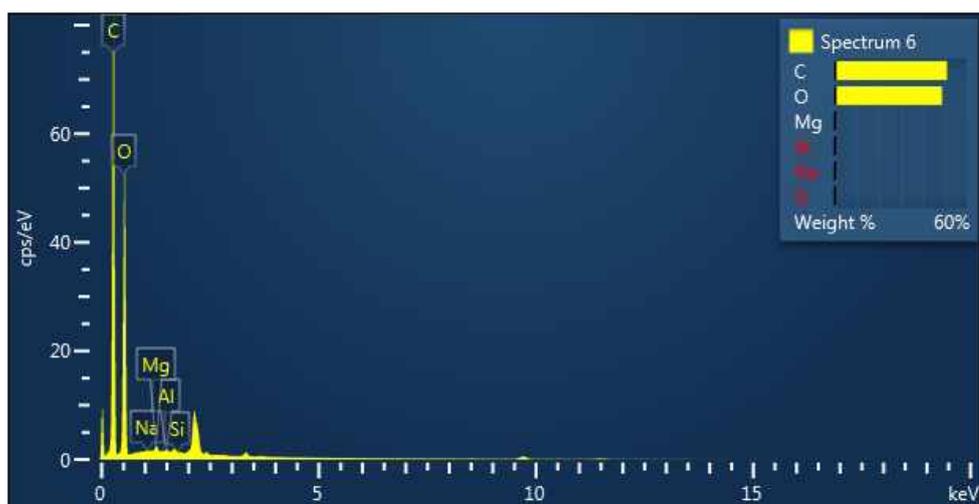


Figura 15: EDS farelo de trigo.
Fonte: O autor, 2023.

5.3 Produção de Enzimas por FES

Através do processo de FES em diversas condições de composição de substratos, como de microrganismos, foi possível avaliar a produção de ligno(hemi)celulases. A curva de produção das enzimas em função do tempo foi avaliada para cada fermentação, sendo o pico máximo de síntese para cada enzima estabelecido a partir desses dados.

Dentre os vários fatores que interferem na FES, o teor de umidade tem influência direta no crescimento microbiano, na síntese e secreção de enzimas. No presente estudo, foi utilizado teor de umidade de 60 %, mesmo teor empregado nas fermentações desenvolvidas por Verma *et al.* (2018), que observaram decaimento na atividade enzimática quando os teores de umidade foram maiores ou menores que 60 % nas fermentações utilizando como substrato farelo de trigo.

Outro fator determinante de tal processo é a temperatura, dependendo da espécie fúngica mesofílica ou termofílica, mas em geral, sua faixa ideal para processos fermentativos é entre 25 e 30 °C, pois altas temperaturas podem comprometer o desenvolvimento dos microrganismos, através da desnaturação de proteínas, afetando a atividade enzimática (YOON *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2015). Seguindo o apresentado por diversos estudos envolvendo microrganismos a temperatura utilizada no processo de FES foi de 28 °C, considerada ótima para fermentação utilizando fungos filamentosos mesófilos.

5.3.1 Produção de β -Glicosidase

A Figura 16A apresenta a curva de produção de β -glicosidase em função do tempo nas fermentações com farelo de trigo, bagaço de uva e bagaço de uva com farelo de trigo, pelo fungo *T. asperellum*. A máxima produção desta enzima foi observada utilizando o substrato farelo de trigo, no 7º dia de fermentação, com 15,2 U/g. Tanto na fermentação com bagaço de uva separado ou combinado com farelo de trigo, as atividades enzimáticas foram baixas.

Ezeilo *et al.* (2019) utilizaram a espécie fúngica *T. asperellum* e obtiveram o pico de 132,95 U/g de atividade enzimática para β -glicosidase no 5º dia de FES, com substrato de folhas de dendezeiro, e parâmetros otimizados, com temperatura de 30 °C, e umidade 60 %. Esse resultado foi superior ao encontrado no presente estudo, podendo ser explicado pela otimização do processo, bem como as características do substrato utilizado.

Dhillon *et al.* (2011) obtiveram 13,58 U/g de β -glicosidase na FES com farelo de trigo, utilizando o fungo *T. reesei*, no 4º dia de fermentação. Tal produção enzimática foi menor do que o estudo em questão, porém, o pico de produção foi observado no 7º dia de fermentação. Teles *et al.* (2021) avaliaram o efeito do ácido tânico em concentrações de 0 % – 12 % e farelo de trigo 8 % – 92 %, na FES utilizando uma cepa mutante do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, e obtiveram atividade de β -glicosidase entre 13,16 a 92,96 U/g, com o intuito de aumentar a síntese enzimática, a mutação genética de microrganismos resulta em positivos resultados da ação fúngica.

A produção de β -glicosidase nas mesmas condições de substrato, mas utilizando o fungo *T. versicolor*, observou-se baixa produção, com picos de atividades após o 5º dia, com apenas o farelo de trigo. O destaque na produção foi no 7º dia, o qual apresentou atividade enzimática de 218,9 U/g (Figura 16 B). Nas fermentações com bagaço de uva e bagaço de uva com farelo de trigo, a produção máxima dessa enzima não passou de 20 U/g, evidenciando que a biomassa de farelo de trigo, com suas características químicas foi o principal agente de produção de β -glicosidase.

Essa alta produção de β -glicosidase por *T. versicolor* no farelo de trigo pode ser justificada pelo fato dessa biomassa ser uma boa fonte de nitrogênio e carbono, que são essenciais para induzir a síntese das enzimas (BRIJWANI *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2018a). Além disso, vale ressaltar o alto conteúdo nutricional e à grande área superficial dessa biomassa, que contribuem para que este subproduto seja uma excelente fonte de carbono, não necessitando de fonte de carbono suplementar para a produção de enzimas (VERMA & KUMAR, 2020).

A excelente produção de β -glicosidase utilizando farelo de trigo e a espécie fúngica *T. versicolor* devem-se pelos altos teores de celulose e hemicelulose presentes neste resíduo, muito maior quando comparado ao bagaço de uva, e pelo conteúdo de proteínas, em torno de 20 % (TEIGISEROVA *et al.*, 2021).

O uso de farelo de trigo como substrato em FES foi também positivo no estudo realizado por Mao *et al.* (2020) inserido como suplementação à palha de trigo, resultando em uma colonização fúngica mais rápida. No presente estudo, tal efeito também favoreceu a FES, visto que o crescimento de micélios é um fator primordial, impulsionando a atividade enzimática desde o 3º dia de fermentação.

Comparando dados encontrados com estudos prévios envolvendo os gêneros *Trametes* e *Trichoderma*, foi observado valores de biossíntese de β -glicosidase inferiores ao presente trabalho. Rodrigues *et al.* (2020), por exemplo, encontram 80,31 U/g de β -glicosidase no 5º dia de fermentação com *T. versicolor* em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos. Pirota *et al.* (2014) obtiveram apenas 1,20 U/g de β -glicosidase com a espécie fúngica *T. reesei*, via FES utilizando farelo de trigo como substrato. Santos *et al.* (2021) encontraram o valor máximo de 8,72 U/g no 9º dia de fermentação de produção de β -glicosidase utilizando mesmo substrato, porém, com o fungo *Penicillium sp.* Logo, conclui-se que os resultados encontrados foram elevados e superiores a estes estudos.

Com o consórcio fúngico, a produção de β -glicosidase apresentou valores intermediários, com o pico de produção no 3º dia de 60,2 U/g, utilizando o farelo de trigo como

substrato, e valores mantendo-se entre 55 e 60 U/g do 3° ao 7° dia (Figura 16 C). Estes resultados sugerem que o uso das linhagens fúngicas em consórcio não influenciou na melhora da produção de β -glicosidase, pois os melhores valores encontrados foi utilizando apenas o fungo *T. versicolor*.

Os resultados indicam que em todas as fermentações contendo bagaço de uva a biossíntese enzimática foi inferior às que utilizaram apenas farelo de trigo. Além disso, o uso do consórcio fúngico não resultou no aumento da biossíntese enzimática, possivelmente por competição interespecífica por alimento entre as espécies investigadas no mesmo habitat.

Dhillon *et al.* (2011) obtiveram 24,54 U/g de β -glicosidase no 4° dia de FES utilizando farelo de trigo e cultura mista de *T. reesei* e *A. niger*. Este valor foi inferior ao encontrado no presente estudo. Implicando que a produção enzimática via FES, mesmo que em consórcio, necessita de microrganismos que tenham sinergia, e que sejam adaptados a diversos substratos.

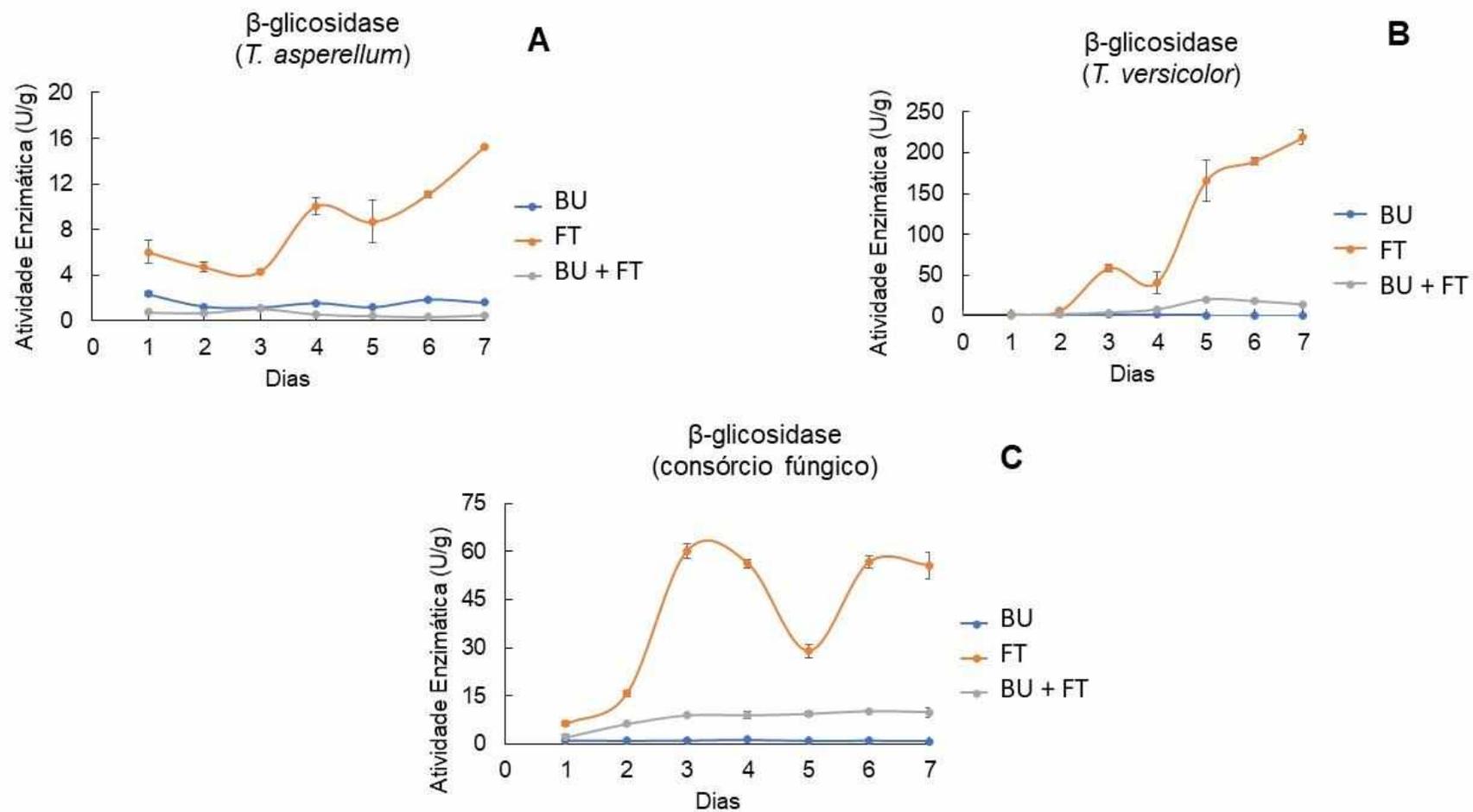


Figura 16: Atividade Enzimática β -glicosidase (A – *T. Asperellum*, B – *T. Versicolor*, C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).
 Fonte: O autor, 2023.

5.3.2 Produção de β -Xilosidase

A produção de β -xilosidase pelo fungo *T. asperellum*, obteve-se pouca produção desta enzima nos três meios fermentativos, com pico de 3,8 U/g, com o farelo de trigo utilizado como substrato único (Figura 17 A).

Com o fungo *T. versicolor*, a biossíntese máxima de β -xilosidase também foi obtida no extrato contendo farelo de trigo, com pico de 6,85 U/g no 7º dia de cultivo. Nas outras duas condições, com apenas o bagaço de uva ou combinado com farelo de trigo, a produção desta enzima atingiu máximo de 2,5 U/g (Figura 17 B).

Por outro lado, quando as linhagens *T. versicolor* e *T. asperellum* foram cultivadas em consórcio, a síntese de β -xilosidase aumentou, com pico de atividade de 19,3 U/g no 2º dia de FES, utilizando farelo de trigo como substrato (Figura 17 C). Observou-se também na fermentação com os substratos combinados, a produção desta enzima se manteve constante após o 2º dia, variando de 6,2 a 7,5 U/g.

Não há dados sobre a produção destas enzimas por estes fungos até o presente momento na literatura, portanto, o presente estudo apresenta dados inéditos, ainda que a produção não seja significativa para β -xilosidase nas condições aqui apresentadas. Estes resultados sugerem que sejam realizadas novas fermentações com otimização das condições, a fim de potencializar a produção desta enzima por estes microrganismos em consórcio. Variações de temperatura, de tipos e concentrações de substratos, entre outros fatores, podem ser investigados em um estudo futuro.

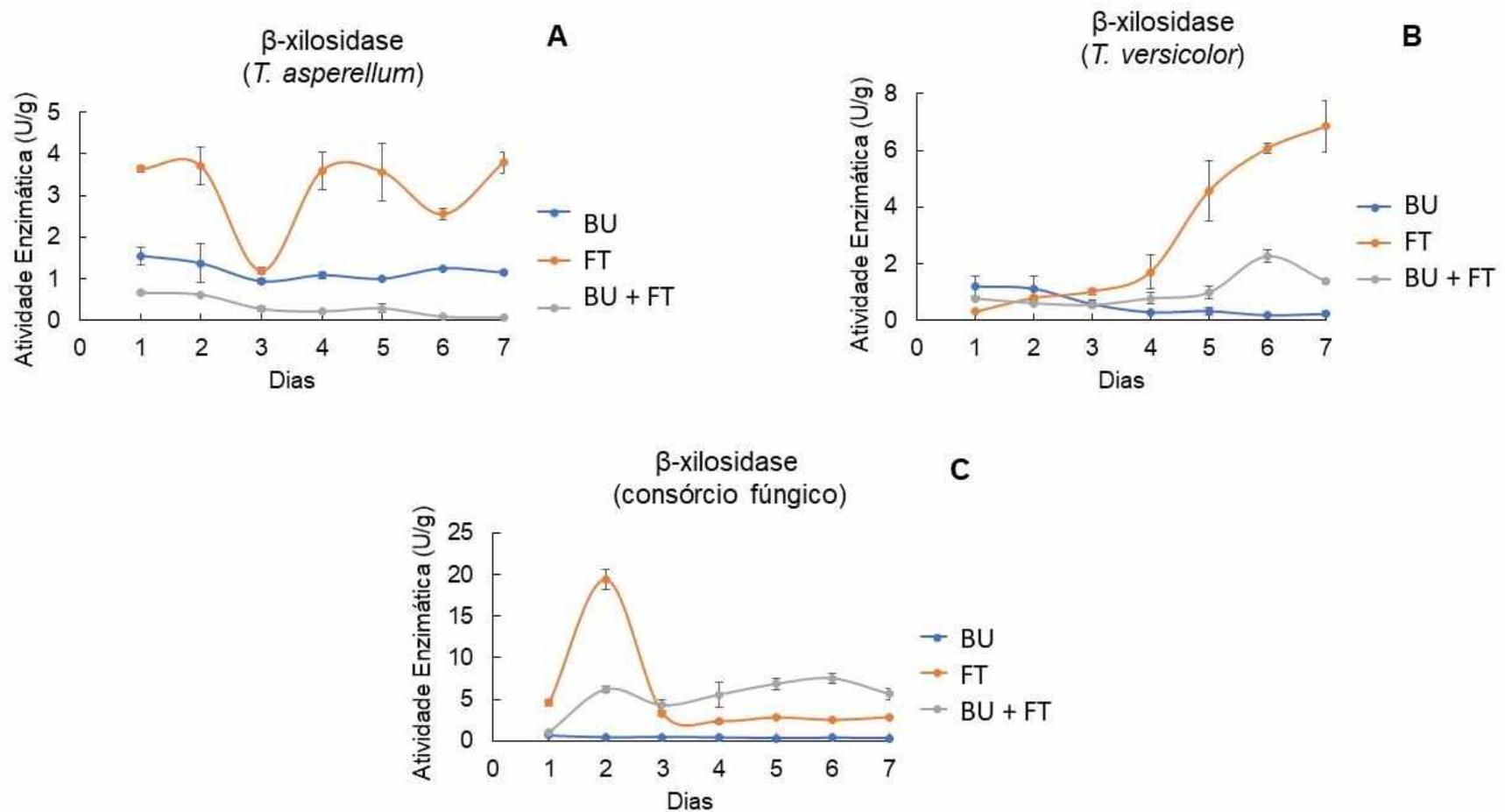


Figura 17: Atividade Enzimática β -xilosidase (A – *T. Asperellum*, B – *T. Versicolor*, C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).

Fonte: O autor, 2023.

5.3.3 Produção de xilanase

A maior produção de xilanase utilizando o fungo *T. asperellum* foi observada na fermentação com substratos combinados, com pico de 109,4 U/g no 3º dia de cultivo (Figura 18 A). Quando o fungo foi cultivado nos substratos separados, a atividade enzimática caiu, indicando que a combinação de bagaço de uva e farelo de trigo favoreceu a produção desta enzima por essa espécie. A produção de xilanase por *T. versicolor* na FES com os substratos combinados apresentou valores similares, com pico de 111,6 U/g, também no 3º dia de fermentação (Figura 18 B).

Os dados obtidos demonstram que a adição de farelo de trigo ao bagaço de uva favoreceu a produção de xilanase, mostrando que a combinação destas biomassas como co-substratos favoreceu a atividade enzimática. Irbe *et al.* (2014), também cultivaram *T. versicolor* para produção de xilanase com farelo de trigo e obtiveram pico de atividade de 40 U/g no 14º dia. Esse tempo longo de cultivo para atingir o pico de síntese de enzimas não é interessante em termos de produção industrial. No presente estudo, observou-se maior produção de xilanase, em menor tempo, com atividade xilanásica aproximadamente três vezes superior, em menor tempo, no 3º dia de fermentação.

Utilizando a mesma espécie fúngica (*T. asperellum*), Ezeilo *et al.* (2019) obtiveram 255,01 U/g de xilanase no 5º dia de FES, com folhas de dendezeiro como substrato e parâmetros otimizados para temperatura, de 30 °C e umidade 80 %. Nota-se que a temperatura e umidade foram maiores do que as utilizadas no respectivo trabalho, esse pequeno aumento pode ter favorecido a atividade enzimática, se atentando que o substrato utilizado pelos autores possui características diferentes.

Irfan *et al.* (2014) avaliaram diversos resíduos agrícolas, como farelo de trigo, resíduos de arroz, farelo de soja e de girassol, bagaço de cana e sabugo de milho para produção de xilanase via FES com *T. viridae* e obtiveram pico de 56,6 U/g com bagaço de cana como substrato, 50,0 U/g utilizando espiga de milho e com farelo de trigo, 29,3 U/g no 7º dia de fermentação. Botella *et al.* (2005) observaram o máximo de produção de xilanase de 40,4 U/g por *A. niger* no primeiro dia de FES com bagaço de uva, o qual atingiu redução de atividade após esse período. Os resultados do presente trabalho foram comparados com outras espécies fúngicas, pois até o presente momento, não foram descritos na literatura estudos com as mesmas espécies e substratos para comparação e discussão.

A produção máxima de xilanase foi observada na FES com o consórcio fúngico, com pico de atividade no 2º dia, tanto para as fermentações com os substratos combinados, como apenas com farelo de trigo, com 101, e 170,3 U/g, respectivamente, indicando a ocorrência de sinergia entre os microrganismos (Figura 18 C).

O emprego de consórcio fúngico pode aumentar a biossíntese enzimática, com duas ou mais espécies fúngicas vivendo simbioticamente e, não havendo competição, pode contribuir para maior produtividade, adaptabilidade e aproveitamento do substrato em relação ao monocultivo (DASHTBAN *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2019). Esse ponto positivo pode ser observado na produção de xilanase, utilizando o consórcio fúngico, com aumento na produção enzimática nas fermentações, tanto com bagaço de uva como farelo de trigo, como somente com farelo de trigo. Novamente, observa-se a contribuição significativa do farelo de trigo para a produção de enzimas. Esta produção superior de xilanase com esse substrato pode ser devida a maior concentração de hemiceluloses (Tabela 1) e ao elevado conteúdo nutricional e proteico do farelo de trigo, como mencionado e evidenciado em estudo de TEIGISEROVA *et al.*, 2021.

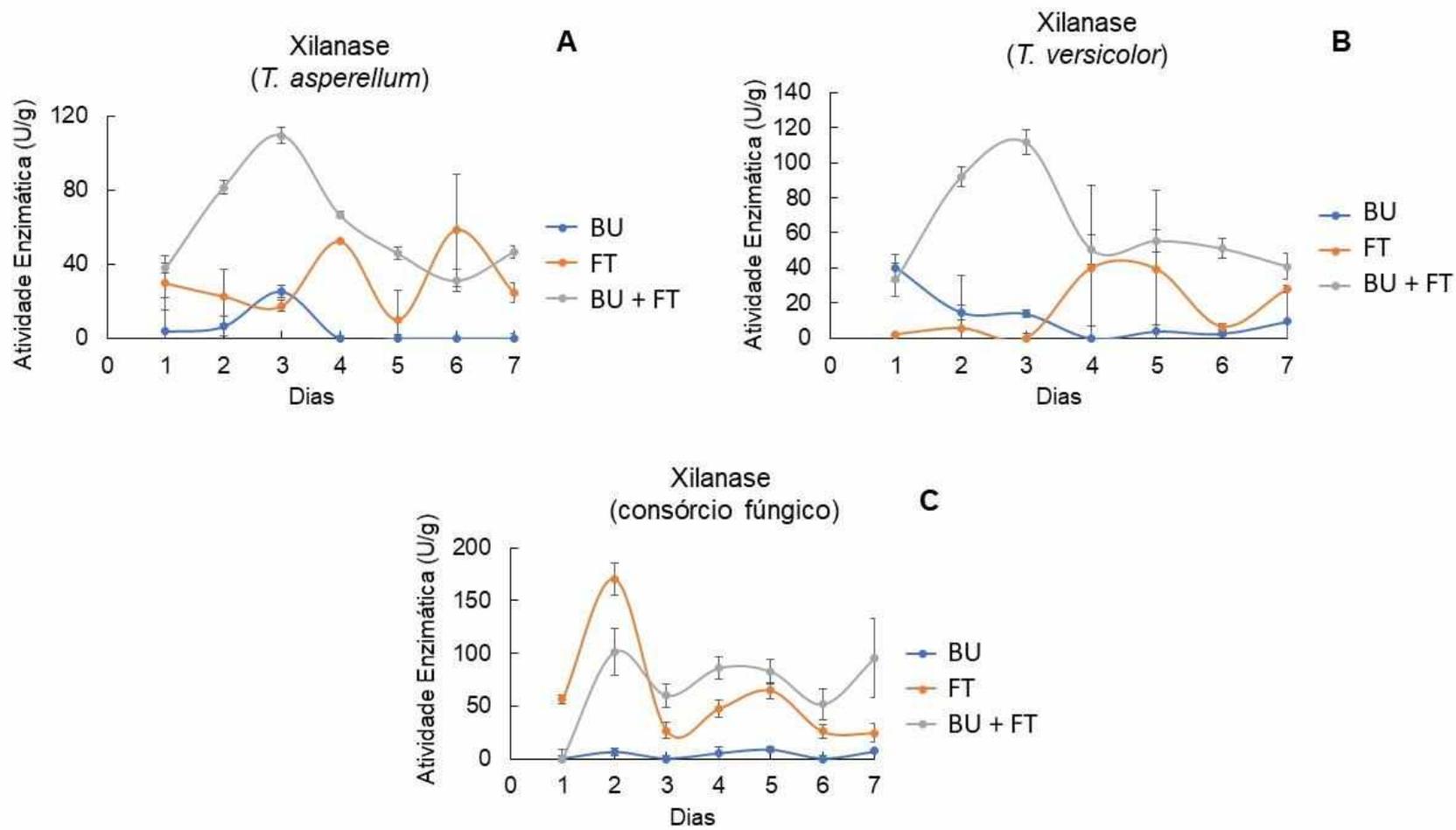


Figura 18: Atividade Enzimática Xilanase (A – *T. Asperellum*, B – *T. Versicolor*, C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).
 Fonte: O autor, 2023.

5.3.4 Produção de Lacase

A produção de Lacase utilizando a linhagem *T. asperellum* isolado apresentou valores abaixo de 1,5 U/g (Figura 19 A). Um dos fatores que pode melhorar a produção enzimática é que o substrato seja adequado e possua relação C/N ideal durante todo processo fermentativo. Caso isso não ocorra, uma baixa atividade enzimática será observada, sendo necessária a suplementação do meio fermentativo para melhorar tal relação (DEBNATH & SAHA, 2020).

Por exemplo, no trabalho de Levin *et al.* (2008), os autores adicionaram extrato de malte e peptona no substrato (serragem e maravalha), como fontes facilmente disponíveis de carbono e nitrogênio no meio de cultura e observaram aumento da produção de lacase e manganês peroxidase, com o microrganismo *T. trogii*.

E para a espécie *T. versicolor*, a produção de lacase melhorou, com pico de atividade no 5º dia com os substratos bagaço de uva e farelo de trigo combinados (16,5 U/g). Quando somente farelo de trigo foi utilizado, obteve-se um pico próximo de produção de 16,2 U/g no 6º dia (Figura 19 B). Estes dados sugerem que a adição de bagaço de uva na fermentação contribuiu para melhorar a produção e diminuir em um dia o pico máximo da biossíntese enzimática, visto que possui maior teor de lignina, que pode influenciar diretamente na produção de lacase.

Utilizando a espécie *T. pubescens*, VELÁSQUEZ-QUINTERO *et al.*, (2022) observaram atividade enzimática de 3,3 U/g para lacase no 7º dia de fermentação, utilizando farelo de trigo e espiga de milho como substratos. Valores menores que os encontrados no presente estudo, utilizando somente farelo de trigo, mas com outra espécie fúngica.

Quando as linhagens fúngicas foram cultivadas em consórcio, a produção de lacase foi baixa, tanto para farelo de trigo e substratos combinados, com pico de 1,5 U/g, no 3º dia de fermentação contendo bagaço de uva e farelo de trigo, e quando apenas bagaço de uva foi utilizado como substrato, não observou-se produção desta enzima (Figura 19 C).

Os substratos em questão utilizados foram importantes para produção de enzimas lignocelulolíticas, pois não só forneceram nutrientes aos microrganismos, como também atuaram na transferência de oxigênio e dispersão de calor, que acarretam em maior assimilação do substrato e, conseqüentemente, aumento da atividade enzimática (PAL & KHANUM, 2010).

Dois importantes nutrientes presentes nos substratos são o carbono, que atua no crescimento celular e como fonte de energia, e o nitrogênio, que é o segundo composto mais

abundante no meio de fermentação, e atua na síntese anabólica de compostos celulares contendo nitrogênio, como aminoácidos e purinas (SURYADI *et al.*, 2022).

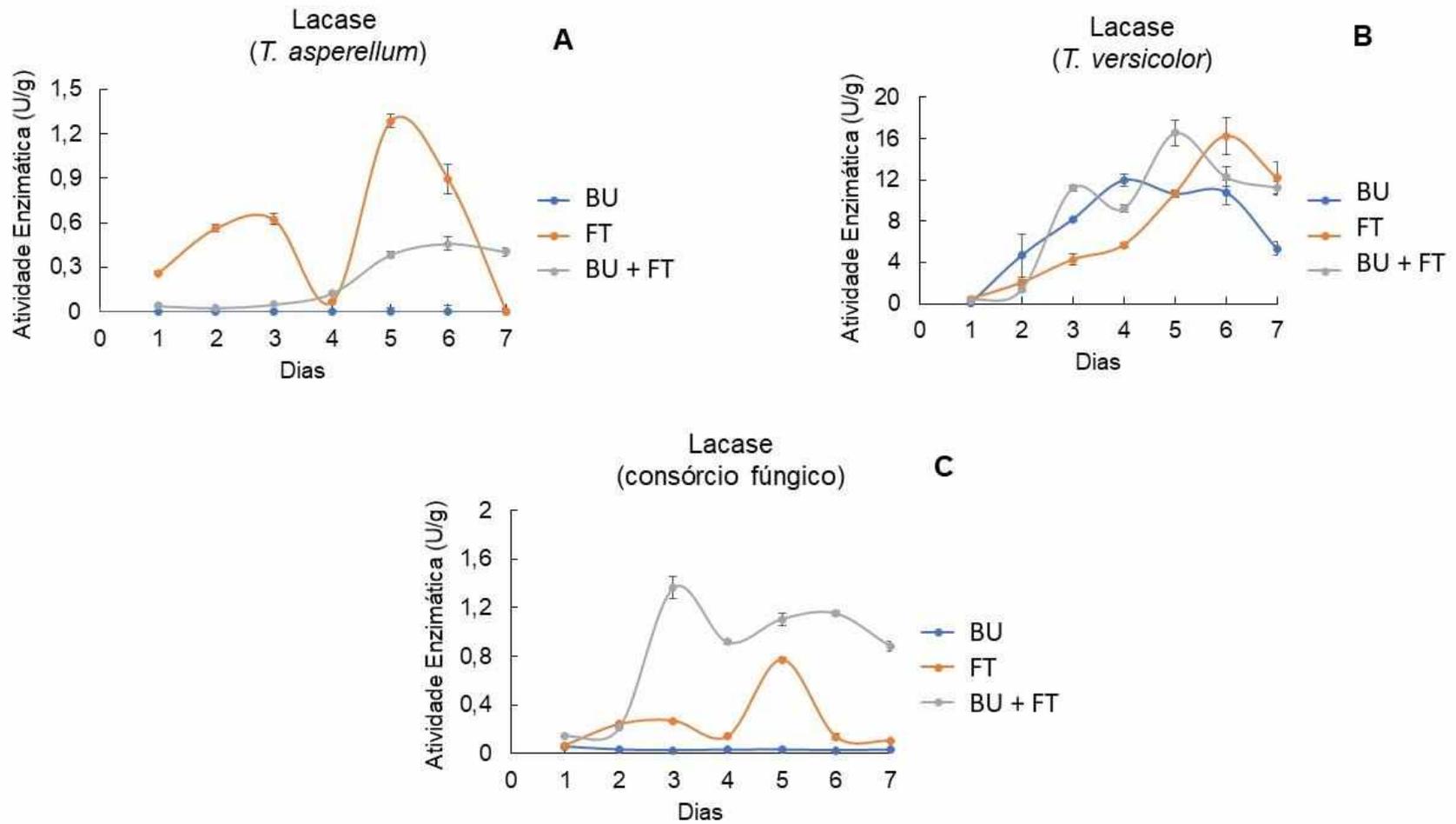


Figura 19: Atividade Enzimática Lacase (A – *T. Asperellum*, B – *T. Versicolor*, C – Consórcio fúngico). Legenda: BU (Bagaço de uva), FT (Farelo de trigo), BU + FT (Bagaço de uva com farelo de trigo).

Fonte: O autor, 2023.

Foi possível observar com esses resultados, desde produções enzimáticas ótimas, como fermentações sem produções das enzimas investigadas, pelos fungos *T. versicolor* e *T. asperellum*, e com os substratos bagaço de uva e farelo de trigo, evidenciando que uma série de fatores podem influenciar na FES, mas que estudos com esse enfoque são de extrema importância, visto que na literatura pouco foi encontrado utilizando mesma espécie fúngica e substratos, pois é a partir deles que pode-se otimizar os processos envolvendo a produção enzimática, resultando em consórcios enzimáticos eficientes, de baixo custo, e de material residual.

5.4 Análise estatística

A Tabela 2 apresenta os dados da SSF das duas espécies fúngicas isoladas e em consórcio, com os diferentes substratos utilizados. Após a aplicação do teste de normalidade de Shapiro Wilk, os dados de β -glicosidase, B-xilosidase e lacase deram p menor que 0,05 (não normal). Os dados foram então transformados e normalizados. Posteriormente, foi aplicado ANOVA, seguido do Teste Tukey para comparação das médias. Os valores discriminados na tabela referem-se aos dados originais. Para lacase que apresentou dados não normais, mesmo após os dados serem transformados, aplicou-se o teste de Kruskal Wallis, apresentando p = 0,45, não havendo diferença estatística entre os dados.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), houve uma diferença significativa entre os extratos para a produção de enzimas. Para β -glicosidase, o melhor resultado encontrado na análise foi de 218,91 U/g, com o fungo *T. versicolor* no substrato farelo de trigo, e para β -xilosidase, na FES com o consórcio fúngico, também utilizando apenas farelo de trigo como substrato, de 19,4 U/g. Na produção de xilanase, o destaque ficou na configuração, trigo farelo com o consórcio fúngico, 170,3 U/g. Para a lacase, os resultados encontrados não representam diferença significativa nos dados, 16,24 U/g para farelo de trigo usando a espécie *T. versicolor* e 16,54 U/g com substratos combinados, e até microrganismos. Dados estatísticos que corroboram os resultados apresentados no presente estudo.

Tabela 4: Dados estatísticos que corroboram os resultados apresentados no presente estudo.

Fermentação	β-glicosidase	β-xilosidase	Xilanase	Lacase
BU <i>T.</i> <i>Asperillum</i>	2,34 f	1,55 be	25,1 f	0,00
BU <i>T.</i> <i>Versicolor</i>	1,70 fg	1,19 ef	40,14 e	11,93
BU consórcio fúngico	1,31 g	0,70 f	9,13 g	0,056
FT <i>T.</i> <i>Asperillum</i>	15,25 d	3,71 c	58,25 cd	1,46
FT <i>T. Versicolor</i>	218,91 a	6,85 b	39,89 e	16,24
FT consórcio fúngico	60,27 b	19,40 a	170,30 a	0,78
BU + FT <i>T.</i> <i>Asperillum</i>	1,03 g	0,66 f	109,40 b	0,46
BU + FT <i>T.</i> <i>Versicolor</i>	20,27 c	2,29 d	111,6 b	16,54
BU + FT consórcio fúngico	10,09 e	7,53 b	101,66 c	1,36
CV (%)	2,76	6,06	16,01	16,63

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- o bagaço de uva e o farelo de trigo foram consideradas biomassas lignocelulósicas com características químicas favoráveis para produção de enzimas lignocelulolíticas;
- a FES resultados satisfatórios para a produção de enzimas, de baixo custo e com meio de operação simples;
- o substrato farelo de trigo foi destaque na produção enzimática, devido a sua característica composicional;
- as produções enzimáticas que se destacaram foram: β -glicosidase utilizando o fungo *T. versicolor* (218,91 U/g) e farelo de trigo, e a atividade enzimática lacase com máximo alcançado de 16,5 U/g, com mesmo microrganismo, empregando substrato misto (bagaço de uva e farelo de trigo). Para a enzima xilanase, a produção ótima foi na fermentação com o consórcio fúngico, de 170,3 U/g, com farelo de trigo como substrato.
- o cultivo das linhagens fúngicas em consórcio proporcionou aumento na produção de β -xilosidase e xilanase, quando comparados com os cultivos isolados, ambas com farelo de trigo.

7. REFERÊNCIAS

ABD EL-MALEK, F., ROFEAL, M., ZABED, H. M., NIZAMI, A. S., REHAN, M., & QI, X. Microorganism-mediated algal biomass processing for clean products manufacturing: Current status, challenges and future outlook. *Fuel*, p. 122612, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122612>

AHMAD, B., YADAV, V., YADAV, A., RAHMAN, M. U., YUAN, W. Z., LI, Z., & WANG, X. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives. *Science of The Total Environment*, v. 719, p. 137315, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137315>

ALHOMODI, A. F., GIBBONS, W. R., & KARKI, B. Estimation of cellulase production by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* during solid and submerged state fermentation of raw and processed canola meal. *Bioresource Technology Reports*, v. 18, p. 101063, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101063>

ALLISON, B. J., & SIMMONS, C. W. Obtaining multiple coproducts from red grape pomace via anthocyanin extraction and biogas production. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 66, n. 30, p. 8045-8053, 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02250>

ALONSO, E. The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat bran-based biorefinery. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 133, p. 603-614, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.010>

AMENDOLA, D., DE FAVERI, D. M., EGÜES, I., SERRANO, L., LABIDI, J., & SPIGNO, G. Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 267-274, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.108>

AMIENYO, D., CAMILLERI, C., & AZAPAGIC, A. Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK. *Journal of Cleaner Production*, v. 72, p. 110-119, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.02.044>

ANDRIANI, A., MAHARANI, A., YANTO, D. H. Y., PRATIWI, H., ASTUTI, D., NURYANA, I., ... & NINGRUM, R. A. Sequential production of ligninolytic, xylanolytic, and cellulolytic enzymes by *Trametes hirsuta* AA-017 under different biomass of Indonesian sorghum accessions-induced cultures. *Bioresource Technology Reports*, v. 12, p. 100562, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100562>

APPRICH, S., TIRPANALAN, Ö., HELL, J., REISINGER, M., BÖHMDORFER, S., SIEBENHANDL-EHN, S., ... & KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT-Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 222-231, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.003>

ARYA, P. S., YAGNIK, S. M., RAJPUT, K. N., PANCHAL, R. R., & RAVAL, V. H. Valorization of agro-food wastes: ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. *Bioresource Technology*, p. 127738, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127738>

ASHOKKUMAR, V., VENKATKARTHICK, R., JAYASHREE, S., CHUETOR, S., DHARMARAJ, S., KUMAR, G., ... & NGAMCHARUSSRIVICHAI, C. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts-A critical review. *Bioresource technology*, v. 344, p. 126195, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>

AWASTHI, M. K., HARIRCHI, S., SAR, T., VIGNESWARAN, V. S., RAJENDRAN, K., GÓMEZ-GARCÍA, R., ... & TAHERZADEH, M. J. Myco-biorefinery approaches for food waste valorization: Present Status and Future Prospects. *Bioresource Technology*, p. 127592, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127592>

BASSO, D., PATUZZI, F., CASTELLO, D., BARATIERI, M., RADA, E. C., WEISS-HORTALA, E., & FIORI, L. Agro-industrial waste to solid biofuel through hydrothermal carbonization. *Waste management*, v. 47, p. 114-121, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.05.013>

BEDŐ, S., ANTAL, B., ROZBACH, M., FEHER, A., & FEHER, C. Optimised fractionation of wheat bran for arabinose biopurification and xylitol fermentation by *Ogataea zsolzii* within a biorefinery process. *Industrial Crops and Products*, v. 139, p. 111504, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111504>

BEHERA, S. S., & RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. *International journal of biological macromolecules*, v. 86, p. 656-669, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>

BEHNAM, S., KARIMI, K., KHANAHMADI, M., & SALIMIAN, Z. Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. 2016.

BENDER, L. E., LOPES, S. T., GOMES, K. S., DEVOS, R. J. B., & COLLA, L. M. Challenges in bioethanol production from food residues. *Bioresource Technology Reports*, p. 101171, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101171>

BERES, C., COSTA, G. N., CABEZUDO, I., DA SILVA-JAMES, N. K., TELES, A. S., CRUZ, A. P., ... & FREITAS, S. P. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management*, v. 68, p. 581-594, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>

BEZERRA, P. X. O., DE FARIAS SILVA, C. E., SOLETTI, J. I., & DE CARVALHO, S. H. V. Cellulosic ethanol from sugarcane straw: a discussion based on industrial experience in the northeast of Brazil. *BioEnergy Research*, v. 14, n. 3, p. 761-773, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s12155-020-10169-w>

BHARATHIRAJA, B., IYYAPPAN, J., JAYAMUTHUNAGAI, J., KUMAR, R. P., SIROHI, R., GNANSOUNOU, E., & PANDEY, A. Critical review on bioconversion of winery wastes into value-added products. *Industrial Crops and Products*, v. 158, p. 112954, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112954>

BHARDWAJ, P., KAUR, N., SELVARAJ, M., GHRAMH, H. A., AL-SHEHRI, B. M., SINGH, G., ... & AWASTHI, M. K. Laccase-assisted degradation of emerging recalcitrant compounds-A review. *Bioresource Technology*, p. 128031, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128031>

BHATIA, S. K., JAGTAP, S. S., BEDEKAR, A. A., BHATIA, R. K., PATEL, A. K., PANT, D., ... & YANG, Y. H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource technology*, v. 300, p. 122724, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>

BILAL, M., & IQBAL, H. M. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities-A review. *Food Research International*, v. 123, p. 226-240, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.066>

BISCHOF, R. H., RAMONI, J., & SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial cell factories*, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016.
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>

BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., CANTERO, D., & BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.020>

BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., CANTERO, D., & BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.020>

BRAIDE, W., KANU, I. A., ORANUSI, U. S., & ADELEYE, S. A. Production of bioethanol from agricultural waste. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, v. 8, n. 2, p. 372-386, 2016.
<https://doi.org/10.4314/jfas.v8i2.14>

BRENES, A., VIVEROS, A., CHAMORRO, S., & ARIJA, I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 211, p. 1-17, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>

BROWNING, B. L. *Methods of wood chemistry*. New York: Interscience Publishers. v.2. p. 561-587, 1967

- CHAPMAN, J., ISMAIL, A. E., & DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, v. 8, n. 6, p. 238, 2018.
<https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- CHEAH, W. Y., SANKARAN, R., SHOW, P. L., IBRAHIM, T. N. B. T., CHEW, K. W., CULABA, A., & JO-SHU, C. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*, v. 7, n. 1, p. 1115, 2020.
<https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.1.4>
- CHILAKAMARRY, C. R., SAKINAH, A. M., ZULARISAM, A. W., SIROHI, R., KHILJI, I. A., AHMAD, N., & PANDEY, A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource technology*, v. 343, p. 126065, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>
- CHOWDHARY, P., GUPTA, A., GNANSOUNOU, E., PANDEY, A., & CHATURVEDI, P. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environmental Pollution*, v. 278, p. 116796, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116796>
- CINGÖZ, A., AKPINAR, Ö., & SAYASLAN, A. Rheological properties of dough by addition of wheat bran hydrolysates obtained at different temperatures. *Journal of Cereal Science*, p. 103612, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103612>
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Série Histórica das Safras. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Acesso em: 7 de nov 2022.
- CORBIN, K. R., HSIEH, Y. S., BETTS, N. S., BYRT, C. S., HENDERSON, M., STORK, J., ... & BURTON, R. A. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology*, v. 193, p. 76-83, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.030>
- COUTO, S. R., ROSALES, E., GUNDIN, M., & SANROMÁN, M. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *Journal of food Engineering*, v. 64, n. 4, p. 423-428, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.11.009>
- CRUZ DAVILA, J., PEREZ, J. V., DEL CASTILLO, D. S., & DIEZ, N. *Fusarium graminearum* as a producer of xylanases with low cellulases when grown on wheat bran. *Biotechnology Reports*, p. e00738, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00738>
- CURRAN, L. M. L. K., SALE, K. L., & SIMMONS, B. A. Review of advances in the development of laccases for the valorization of lignin to enable the production of lignocellulosic biofuels and bioproducts. *Biotechnology Advances*, p. 107809, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107809>

DA ROS, C., CAVINATO, C., BOLZONELLA, D., & PAVAN, P. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy*, v. 91, p. 150-159, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.017>

DA ROSA-GARZON, N. G., LAURE, H. J., ROSA, J. C., & CABRAL, H. Valorization of agricultural residues using *Myceliophthora thermophila* as a platform for production of lignocellulolytic enzymes for cellulose saccharification. *Biomass and Bioenergy*, v. 161, p. 106452, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106452>

DA SILVA, D. J., DE OLIVEIRA, M. M., WANG, S. H., CARASTAN, D. J., & ROSA, D. S. Designing antimicrobial polypropylene films with grape pomace extract for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 34, p. 100929, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.100929>

DA SILVA, I. S. V., DE SOUSA, R. M. F., DE OLIVEIRA, A., DE OLIVEIRA, W. J., MOTTA, L. A. C., PASQUINI, D., & OTAGURO, H. Polymeric blends of hydrocolloid from chia seeds/apple pectin with potential antioxidant for food packaging applications. *Carbohydrate polymers*, v. 202, p. 203-210, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.061>

DAI, Y., SUN, Q., WANG, W., LU, L., LIU, M., LI, J., ... & ZHANG, Y. Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review. *Chemosphere*, v. 211, p. 235-253, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.179>

DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., & QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International journal of biological sciences*, v. 5, n. 6, p. 578, 2009.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>

DÁVILA, I., REMÓN, J., GULLÓN, P., LABIDI, J., & BUDARIN, V. Production and characterization of lignin and cellulose fractions obtained from pretreated vine shoots by microwave assisted alkali treatment. *Bioresource technology*, v. 289, p. 121726, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121726>

DE ISEPPI, A., LOMOLINO, G., MARANGON, M., & CURIONI, A. Current and future strategies for wine yeast lees valorization. *Food Research International*, v. 137, p. 109352, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109352>

DE OLIVEIRA R, P., DA SILVA BARRETO, E., BRANDÃO, R. L., GURGEL, L. V. A., PASQUINI, D., & BAFFI, M. A. On-site produced enzyme cocktails for saccharification and ethanol production from sugarcane bagasse fractionated by hydrothermal and alkaline pretreatments. *Waste and Biomass Valorization*, v. 13, n. 1, p. 95-106, 2022 (c).
<https://doi.org/10.1007/s12649-021-01499-7>

DE OLIVEIRA R, P., DOS SANTOS, B. V., COSTA, L., HENRIQUE, M. A., PASQUINI, D., & BAFFI, M. A. Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. *Industrial crops and products*, v. 95, p. 453-459, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.055>

DE OLIVEIRA R, P., GURGEL, L. V. A., PASQUINI, D., BADOTTI, F., GÓES-NETO, A., & BAFFI, M. A. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2683-2693, 2020 (a).
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>

DE OLIVEIRA R, P., MOREIRA, F. S., CARDOSO, V. L., SANTOS, L. D., GURGEL, L. V. A., PASQUINI, D., & BAFFI, M. A. Combination of High Solid Load, On-site Enzyme Cocktails and Surfactant in the hydrolysis of Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse and Ethanol Production. *Waste and Biomass Valorization*, v. 13, n. 6, p. 3085-3094, 2022(b).
<https://doi.org/10.1007/s12649-022-01685-1>

DEBNATH, R; SAHA, T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 26, p. 101645, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101645>

DEL MAR CONTRERAS, M., ROMERO-GARCÍA, J. M., LÓPEZ-LINARES, J. C., ROMERO, I., & CASTRO, E. Residues from grapevine and wine production as feedstock for a biorefinery. *Food and Bioproducts Processing*, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.05.005>

DEMIR, H., & TARI, C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 106, p. 60-66, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.011>

DEVARAPALLI, M., & ATIYEH, H. K. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. *Biofuel Research Journal*, v. 2, n. 3, p. 268-280, 2015.
<https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.3.5>

DHILLON, G. S., OBEROI, H. S., KAUR, S., BANSAL, S., & BRAR, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>

DIAS, A. A., FERNANDES, J., SOUSA, R. M. O. Fungal conversion and valorization of winery wastes. *Mycoremediation and environmental sustainability*, p. 239-252, 2018.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5_9

DIAS, L., DOS SANTOS, B., ALBUQUERQUE, C., BAETA, B., PASQUINI, D. AND BAFFI, MBiomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production

of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. *J Appl Microbiol*, 124: 708-718, 2018a.
<https://doi.org/10.1111/jam.13672>

DONG, X., ZHU, C. P., HUANG, G. Q., & XIAO, J. X. Fractionation and structural characterization of polysaccharides derived from red grape pomace. *Process Biochemistry*, v. 109, p. 37-45, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.022>

DREVELEGKA, I; GOULA, A. M. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, v. 149, p. 107845, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107845>

DWYER, K., HOSSEINIAN, F., & ROD, M. R. The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research*, v. 3, n. 2, p. 91-91, 2014.
<https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91>

EJAZ, U., SOHAIL, M., & GHANEMI, A. Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, v. 6, n. 3, p. 44, 2021.
<https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

EZEILO, U. R., LEE, C. T., HUYOP, F., ZAKARIA, I. I., & WAHAB, R. A. Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, v. 243, p. 206-217, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.113>

FANG, D., XUE, D., LIU, X., CAO, L., ZHANG, J., & GONG, C. Concurrent production of ferulic acid and glucose from wheat bran by catalysis of a putative bifunctional enzyme. *Bioresource Technology*, p. 128393, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128393>

FARINAS, Cristiane S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 52, p. 179-188, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>

FERREIRA, A. F., RIBAU, J. P., & COSTA, M. A. decision support method for biochars characterization from carbonization of grape pomace. *Biomass and Bioenergy*, v. 145, p. 105946, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105946>

FILIPPI, K., GEORGAKA, N., ALEXANDRI, M., PAPAPOSTOULOU, H., & KOUTINAS, A. Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Industrial Crops and Products*, v. 168, p. 113578, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113578>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022. FAOSTAT Crops. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Acesso em nov. 2022).

GARCÍA-LOMILLO, J., & GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehens Rev Food Sci Food Saf* 16: 3-22. 2017.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>

GERMEC, M., OZCAN, A., & TURHAN, I. Bioconversion of wheat bran into high value-added products and modelling of fermentations. *Industrial Crops and Products*, v. 139, p. 111565, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111565>

GÓMEZ-BRANDÓN, M., LORES, M., INSAM, H., & DOMÍNGUEZ, J. Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Critical reviews in biotechnology*, v. 39, n. 4, p. 437-450, 2019.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1555514>

HANSEN, G. H., LÜBECK, M., FRISVAD, J. C., LÜBECK, P. S., & ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>

HOANG, A. T., ONG, H. C., FATTAH, I. R., CHONG, C. T., CHENG, C. K., SAKTHIVEL, R., & OK, Y. S. Progress on the lignocellulosic biomass pyrolysis for biofuel production toward environmental sustainability. *Fuel Processing Technology*, v. 223, p. 106997, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2021.106997>

HU, J., CHEN, K., LI, J., WEI, Y., WANG, Y., WU, Y., ... & DENTON, M. D. Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. *Environmental Microbiology*, v. 22, n. 3, p. 1011-1024, 2020.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14798>

HYDE, K. D., XU, J., RAPIOR, S., JEEWON, R., LUMYONG, S., NIEGO, A. G. T., ... & STADLER, M. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019.
<https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>

ILYAS, T., CHOWDHARY, P., CHAURASIA, D., GNANSOUNOU, E., PANDEY, A., & CHATURVEDI, P. Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. *Environmental Technology & Innovation*, v. 23, p. 101592, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101592>

INTASIT, R., CHEIRSILP, B., SUYOTHA, W., & BOONSAWANG, P. Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, v. 173, p. 108086, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108086>

International Organisation of Vine and Wine (OIV) Statistical Report on World Vitiviniculture (2019), p. 23 doi:64/19/6835 [pii]\n10.1158/0008-5472.CAN-04-1678

IOANNIDOU, S. M., FILIPPI, K., KOOKOS, I. K., KOUTINAS, A., & LADAKIS, D. Techno-economic evaluation and life cycle assessment of a biorefinery using winery waste streams for the production of succinic acid and value-added co-products. *Bioresource Technology*, v. 348, p. 126295, 2022(b).
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126295>

IOANNIDOU, S. P., MARGELLOU, A. G., PETALA, M. D., & TRIANTAFYLLIDIS, K. S. Pretreatment/fractionation and characterization of winery waste streams within an integrated biorefinery concept. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 27, p. 100670, 2022(a).
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100670>

IRBE, I., ELISASHVILI, V., ASATIANI, M. D., JANBERGA, A., ANDERSONE, I., ANDERSONS, B., ... & GRININS, J. Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 86, p. 71-78, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.027>

IRFAN, M., NADEEM, M., & SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *Journal of radiation research and applied sciences*, v. 7, n. 3, p. 317-326, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>

KALLI, E., LAPPAS, I., BOUCHAGIER, P., TARANTILIS, P. A., & SKOTTI, E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 5, n. 1, p. 1-21, 2018.
<https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>

KEASLING, J., GARCIA MARTIN, H., LEE, T. S., MUKHOPADHYAY, A., SINGER, S. W., & SUNDSTROM, E. Microbial production of advanced biofuels. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 11, p. 701-715, 2021.
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00577-w>

KNOB, A., TERRASAN, C. F., & CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 389-407, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>

- KUMAR, V., AHLUWALIA, V., SARAN, S., KUMAR, J., PATEL, A. K., & SINGHANIA, R. R. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, v. 323, p. 124566, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- KUMAR, V., SHARMA, N., UMESH, M., SELVARAJ, M., AL-SHEHRI, B. M., CHAKRABORTY, P., ... & MAITRA, S. S. Emerging challenges for the agro-industrial food waste utilization: A review on food waste biorefinery. *Bioresource Technology*, p. 127790, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127790>
- KUMARI, D., & SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 90, p. 877-891, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>
- LAURICHESSE, S., & AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in polymer science*, v. 39, n. 7, p. 1266-1290, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>
- LEITE, P., SOUSA, D., FERNANDES, H., FERREIRA, M., COSTA, A. R., FILIPE, D., ... & SALGADO, J. M. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 27, p. 100407, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>
- LEVIN, L., HERRMANN, C., & PAPINUTTI, V. L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 1, p. 207-214, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.004>
- LI, Y., WANG, L., WANG, H., LI, Z., QIU, J., & WANG, L. Correlation of microstructure, pore characteristics and hydration properties of wheat bran modified by airflow impact mill. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 77, p. 102977, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102977>
- LI, Y., XING, B., DING, Y., HAN, X., & WANG, S. A critical review of the production and advanced utilization of biochar via selective pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 312, p. 123614, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123614>
- LIN, C. Y., & LU, C. Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for production of advanced generation biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 136, p. 110445, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110445>
- LIU, H., XU, T., LIU, K., ZHANG, M., LIU, W., LI, H., ... & SI, C. Lignin-based electrodes for energy storage application. *Industrial Crops and Products*, v. 165, p. 113425, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113425>

LIU, X., YAN, X., BI, J., WU, X., LIU, J., & ZHOU, M. Identification of phenolic compounds and antioxidant activity of guava dehydrated by different drying methods. *Drying technology*, v. 38, n. 8, p. 987-1000, 2020.

<https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1607872>

LV, Q. Q., CAO, J. J., LIU, R., & CHEN, H. Q. Structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*, v. 341, p. 128218, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128218>

MACHADO, P. J. C., DOS REIS FERREIRA, R. A., DE CASTRO MOTTA, L. A., & PASQUINI. Characterization and properties of cementitious composites with cellulose fiber, silica fume and latex. *Construction and Building Materials*, v. 257, p. 119602, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119602>

MADADIAN, E., RAHIMI, J., MOHEBBI, M., & SIMAKOV, D. S. Grape pomace as an energy source for the food industry: A thermochemical and kinetic analysis. *Food and Bioproducts Processing*, v. 132, p. 177-187, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.01.006>

MANAN, M. A.; WEBB, C. Modern microbial solid state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products. *Biofuel Res J.*; 4 (4): 730-40, 2017.

<https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.4.5>

MAO, L., CONE, J. W., HENDRIKS, W. H., & SONNENBERG, A. S. Wheat bran addition improves *Ceriporiopsis subvermispora* and *Lentinula edodes* growth on wheat straw, but not delignification. *Animal Feed Science and Technology*, v. 259, p. 114361, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114361>

MATEO, J. J., & MAICAS, S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Research International*, v. 73, p. 13-25, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.007>

MEINI, M. R., CABEZUDO, I., GALETTO, C. S., & ROMANINI, D. Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Food Bioscience*, v. 42, p. 101168, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101168>

MENDES, J. A., XAVIER, A. M., EVTUGUIN, D. V., & LOPES, L. P. Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial crops and products*, v. 49, p. 286-291, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.003>

MOHANTY, S. S., KOUL, Y., VARJANI, S., PANDEY, A., NGO, H. H., CHANG, J. S., ... & BUI, X. T. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial cell factories*, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2021.

<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>

NCUBE, A., FIORENTINO, G., COLELLA, M., & ULGIATI, S. Upgrading wineries to biorefineries within a Circular Economy perspective: An Italian case study. *Science of the Total Environment*, v. 775, p. 145809, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145809>

NOGUCHI, T., NISHIYAMA, R., SHIMOKAWA, T., YAMADA, K., & KAGAWA, Y. Simultaneous production of cellobiose and xylobiose from alkali-treated bagasse using cellulase secreted by Fe-ion-irradiated *Trichoderma reesei* mutant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.09.002>

OKAMOTO, K., NITTA, Y., MAEKAWA, N., & YANASE, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and microbial technology*, v. 48, n. 3, p. 273-277, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.12.001>

ONIPE, O. O., JIDEANI, A. I., & BESWA, D. Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 50, n. 12, p. 2509-2518, 2015.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12935>

PAL, A., & KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource technology*, v. 101, n. 19, p. 7563-7569, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.033>

PANAHI, H. K. S., DEHHAGHI, M., AGHBASHLO, M., KARIMI, K., & TABATABAEI, M. Conversion of residues from agro-food industry into bioethanol in Iran: An under-valued biofuel additive to phase out MTBE in gasoline. *Renewable energy*, v. 145, p. 699-710, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.081>

PANAHI, H. K. S., DEHHAGHI, M., GUILLEMIN, G. J., GUPTA, V. K., LAM, S. S., AGHBASHLO, M., & TABATABAEI, M. Bioethanol production from food wastes rich in carbohydrates. *Current Opinion in Food Science*, v. 43, p. 71-81, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.001>

PAUL, M., MOHAPATRA, S., MOHAPATRA, P. K. D., & THATOI, H. Microbial cellulases-An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*, v. 340, p. 125710, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710>

PEDRAS, B. M., REGALIN, G., SÁ-NOGUEIRA, I., SIMÕES, P., PAIVA, A., & BARREIROS, S. Fractionation of red wine grape pomace by subcritical water extraction/hydrolysis. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 160, p. 104793, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104793>

PING, L., BROSSE, N., SANNIGRAHI, P., & RAGAUSKAS, A. Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial crops and products*, v. 33, n. 1, p. 200-204, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.009>

PIROTA, R. D., DELABONA, P. S., & FARINAS, C. S. Simplification of the biomass to ethanol conversion process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation. *BioEnergy Research*, v. 7, n. 2, p. 744-752, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s12155-013-9406-4>

PRASAD, R. K., CHATTERJEE, S., MAZUMDER, P. B., GUPTA, S. K., SHARMA, S., VAIRALE, M. G., ... & GUPTA, D. K. Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. *Chemosphere*, v. 231, p. 588-606, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.142>

PRUECKLER, M., SIEBENHANDL-EHN, S., APPRICH, S., HOELTINGER, S., HAAS, C., SCHMID, E., & KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT-Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.004>

RAHMAN, A., ULVEN, C. A., DURANT, C., JOHNSON, M. A., FEHRENBACH, J., & HOSSAIN, K. G. Selection, pretreatment, and use of wheat bran for making thermoplastic composite. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 2017.
<https://doi.org/10.13031/aim.201701090>

RESHMY, R., PHILIP, E., MADHAVAN, A., SIROHI, R., PUGAZHENDHI, A., BINOD, P., ... & SINDHU, R. Lignocellulose in future biorefineries: Strategies for cost-effective production of biomaterials and bioenergy. *Bioresource Technology*, v. 344, p. 126241, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126241>

ROSENFELDER, P.; EKLUND, M.; MOSENTHIN, R. Nutritive value of wheat and wheat by-products in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 185, n. 3-4, p. 107-125, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.07.011>

SADEGHIAN-ABADI, S., REZAEI, S., YOUSEFI-MOKRI, M., & FARAMARZI, M. A. Enhanced production, one-step affinity purification, and characterization of laccase from solid-state culture of *Lentinus tigrinus* and delignification of pistachio shell by free and immobilized enzyme. *Journal of environmental management*, v. 244, p. 235-246, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.058>

SADH, P. K., DUHAN, S., & DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2018.
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>

SALEHI, B., VLAISAVLJEVIC, S., ADETUNJI, C. O., ADETUNJI, J. B., KREGIEL, D., ANTOLAK, H., ... & DEL MAR CONTRERAS, M. Plants of the genus *Vitis*: Phenolic compounds, anticancer properties and clinical relevance. *Trends in Food Science & Technology*, v. 91, p. 362-379, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.042>.

SANGUINE, I. S., CAVALHEIRO, G. F., GARCIA, N. F. L., DOS SANTOS, M. V., GANDRA, J. R., E BUSCHINELLI, R. H. D. T., ... & LEITE, R. S. R. Xylanases of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma pseudokoningii*: Production, characterization and application as additives in the digestibility of forage for cattle. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 44, p. 102482, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102482>

SANTOS, F. A., DE CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T., DE CARVALHO CARDOSO-SIMÕES, A. L., & DE MELO SANTOS, S. F. Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates. *Bioresource Technology Reports*, v. 14, p. 100648, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100648>

SARAVANAN, A., KUMAR, P. S., JEEVANANTHAM, S., KARISHMA, S., & VO, D. V. N. Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 344, p. 126203, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126203>

SARKAR, O., BUTTI, S. K., & MOHAN, S. V. Acidogenic biorefinery: food waste valorization to biogas and platform chemicals. *Waste Biorefinery*, p. 203-218, 2018.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00006-9>

SCHUSTER, A., & SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>

SHARMA, A., JAIN, K. K., SRIVASTAVA, A., SHRIVASTAVA, B., THAKUR, V. V., JAIN, R. K., & KUHAD, R. C. Potential of in situ SSF laccase produced from *Ganoderma lucidum* RCK 2011 in biobleaching of paper pulp. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 42, n. 3, p. 367-377, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s00449-018-2041-x>

SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 103, n. 21, p. 8763-8784, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10108-6>

SINGH, R., LANGYAN, S., ROHTAGI, B., DARJEE, S., KHANDELWAL, A., SHRIVASTAVA, M., ... & SINGH, A. Production of biofuels options by contribution of effective and suitable enzymes: technological developments and challenges. *Materials Science for Energy Technologies*, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.mset.2022.05.001>

SIROHI, R., TARAFDAR, A., SINGH, S., NEGI, T., GAUR, V. K., GNANSOUNOU, E., & BHARATHIRAJA, B. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, v. 314, p. 123771, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>

SLOMINSKI, B. A., BOROS, D., CAMPBELL, L. D., GUENTER, W., & JONES, O. Wheat by-products in poultry nutrition. Part I. Chemical and nutritive composition of wheat screenings, bakery by-products and wheat mill run. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 84, n. 3, p. 421-428, 2004.
<https://doi.org/10.4141/A03-112>

SOCCOL, C. R., DA COSTA, E. S. F., LETTI, L. A. J., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., & DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>

SPARROW, A. M., DAMBERGS, R. G., & CLOSE, D. C. Grape skins as supplements for color development in Pinot noir wine. *Food Research International*, v. 133, p. 108707, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108707>

SURYADI, H., JUDONO, J. J., PUTRI, M. R., ECLESSIA, A. D., ULHAQ, J. M., AGUSTINA, D. N., & SUMIATI, T. Bidelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*, p. e08865, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865>

SUSMOZAS, A., MARTÍN-SAMPEDRO, R., IBARRA, D., EUGENIO, M. E., IGLESIAS, R., MANZANARES, P., & MORENO, A. D. Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. *Processes*, v. 8, n. 10, p. 1310, 2020.
<https://doi.org/10.3390/pr8101310>

TAPIA-QUIRÓS, P., MONTENEGRO-LANDÍVAR, M. F., VECINO, X., ALVARINO, T., CORTINA, J. L., SAURINA, J., ... & REIG, M. A green approach to phenolic compounds recovery from olive mill and winery wastes. *Science of The Total Environment*, v. 835, p. 155552, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155552>

TEIGISEROVA, D. A., BOURGINE, J., & THOMSEN, M. Closing the loop of cereal waste and residues with sustainable technologies: An overview of enzyme production via fungal solid-state fermentation. *Sustainable Production and Consumption*, v. 27, p. 845-857, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.02.010>

TEIXEIRA, N., MATEUS, N., DE FREITAS, V., & OLIVEIRA, J. Wine industry by-product: Full polyphenolic characterization of grape stalks. *Food Chemistry*, v. 268, p. 110-117, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.070>

TELES, A. S. C., CHÁVEZ, D. W. H., DE ARAÚJO SANTIAGO, M. C. P., GOTTSCHALK, L. M. F., & TONON, R. V. Composition of different media for enzyme production and its effect on the recovery of phenolic compounds from grape pomace. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 35, p. 102067, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102067>

TIŠMA, M., ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P., ŠELO, G., TOLJ, I., ŠPERANDA, M., BUCIĆ-KOJIĆ, A., & PLANINIĆ, M. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 330, p. 124997, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124997>

TOUSHIK, S. H., LEE, K. T., LEE, J. S., & KIM, K. S. Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *Journal of food science*, v. 82, n. 3, p. 585-593, 2017.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>

TROIANO, D., ORSAT, V., & DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 117, p. 109472, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109472>

TULY, J. A., ZABED, H. M., NIZAMI, A. S., HASSAN, M. M., AZAM, S. R., AWASTHI, M. K., ... & MA, H. Bioconversion of agro-food industrial wastes into value-added peptides by a *Bacillus* sp. Mutant through solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 346, p. 126513, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126513>

UPADHYAYA, S., TIWARI, S. H. A. S. H. A. N. K., ARORA, N., & SINGH, D. P. Microbial protein: a valuable component for future food security. *Microbes and environmental management*. Studium Press, New Delhi, v. 8, p. 259, 2016.

VELÁSQUEZ-QUINTERO, C., MERINO-RESTREPO, A., & HORMAZA-ANAGUANO, A. Production, extraction, and quantification of laccase obtained from an optimized solid-state fermentation of corncob with white-rot fungi. *Journal of Cleaner Production*, v. 370, p. 133598, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133598>

VERMA, N., & KUMAR, V. Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates in cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran based solid state fermentation. *Biotechnology reports*, v. 25, p. e00416, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00416>

VERMA, N., KUMAR, V., & BANSAL, M. C. Utility of *Luffa cylindrica* and *Litchi chinensis* peel, an agricultural waste biomass in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 16, p. 483-492, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.021>

VOLYNETS, B., EIN-MOZAFFARI, F., & DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2017.
<https://doi.org/10.1515/gps-2016-0017>

VU, V., FARKAS, C., RIYAD, O., BUJNA, E., KILIN, A., SIPICZKI, G., ... & NGUYEN, Q. D. Enhancement of the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat bran using the *Bacillus* strains and their consortium. *Bioresource Technology*, v. 343, p. 126092, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126092>

WANG, H., MA, S., XIA, Q., ZHAO, Z., CHEN, X., SHEN, X., ... & MAO, Z. The interaction of the pathogen *Fusarium proliferatum* with *Trichoderma asperellum* characterized by transcriptome changes in apple rootstock roots. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 121, p. 101894, 2022a.

<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101894>

WANG, L., LIN, X., ZHOU, Y., & CHEN, H. Porous inert material as promising carrier enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 122, p. 316-322, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.007>

WANZENBÖCK, E., APPRICH, S., TIRPANALAN, Ö., ZITZ, U., KRACHER, D., SCHEDLE, K., & KNEIFEL, W. Wheat bran biodegradation by edible *Pleurotus* fungi-A sustainable perspective for food and feed. *LWT*, v. 86, p. 123-131, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.051>

WIKANDARI, R., HASNIAH, N., & TAHERZADEH, M. J. The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, p. 126531, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126531>

WOICIECHOWSKI, A. L., NETO, C. J. D., DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P., DE CARVALHO NETO, D. P., SYDNEY, A. C. N., LETTI, L. A. J., ... & SOCCOL, C. R. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance-Conventional processing and recent advances. *Bioresource technology*, v. 304, p. 122848, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>

XIAO, Y., LIU, Y., WANG, X., LI, M., LEI, H., & XU, H. Cellulose nanocrystals prepared from wheat bran: Characterization and cytotoxicity assessment. *International journal of biological macromolecules*, v. 140, p. 225-233, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.160>

XU, L., SUN, K., WANG, F., ZHAO, L., HU, J., MA, H., & DING, Z. Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. *Journal of Environmental Management*, v. 270, p. 110904, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110904>

YAASHIKAA, P. R., KUMAR, P. S., & VARJANI, S. Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. *Bioresource Technology*, v. 343, p. 126126, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126126>

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, p. 09173, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

YAZID, N. A., BARRENA, R., KOMILIS, D., & SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. *Sustain*, 9, 2017.

<https://doi.org/10.3390/su9020224>

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

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>

ZABANIOTOU, A., KAMATEROU, P., PAVLOU, A., & PANAYIOTOU, C. Sustainable bioeconomy transitions: Targeting value capture by integrating pyrolysis in a winery waste biorefinery. *Journal of Cleaner Production*, v. 172, p. 3387-3397, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.077>

ZACHAROF, Myrto-Panagiota. Grape winery waste as feedstock for bioconversions: applying the biorefinery concept. *Waste and biomass valorization*, v. 8, n. 4, p. 1011-1025, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s12649-016-9674-2>

ZACHOW, C., BERG, C., MÜLLER, H., MONK, J., & BERG, G. Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *Journal of Biotechnology*, v. 235, p. 162-170, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.049>

ZHANG, Y., PITKÄNEN, L., DOUGLADE, J., TENKANEN, M., REMOND, C., & JOLY, C. Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, n. 2, p. 852-859, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.036>

ZHANG, Y., YANG, J., LUO, L., WANG, E., WANG, R., LIU, L., ... & YUAN, H. Low-cost cellulase-hemicellulase mixture secreted by *Trichoderma harzianum* EM0925 with complete saccharification efficacy of lignocellulose. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 2, p. 371, 2020a.

<https://doi.org/10.3390/ijms21020371>

ZIETSMAN, A. J., MOORE, J. P., FANGEL, J. U., WILLATS, W. G., & VIVIER, M. A. Combining hydrothermal pretreatment with enzymes de-pectinates and exposes the innermost xyloglucan-rich hemicellulose layers of wine grape pomace. *Food chemistry*, v. 232, p. 340-350, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.015>