



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Ingrid da Costa Maia

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE
DE CERVEJARIA ARTESANAL E A INFLUÊNCIA DA
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Rio de Janeiro

2020

Ingrid da Costa Maia

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE DE
CERVEJARIA ARTESANAL E A INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. L. Ferreira

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Furtado Dias

Rio de Janeiro

2020

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

M217	<p>Maia, Ingrid da Costa Avaliação de compostos bioativos de bagaço de malte de cervejaria artesanal e a influência da fermentação em estado sólido. / Ingrid da Costa Maia. -- Rio de Janeiro, 2020. 60 f.</p> <p>Orientadora: Mariana Simões Larraz Ferreira. Coorientadora: Juliana Furtado Dias. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2020.</p> <p>1. Compostos fenólicos. 2. Cromatografia líquida. 3. Espectrometria de massas. 4. Metabolômica. 5. Fermentação em estado sólido. I. Ferreira, Mariana Simões Larraz, orient. II. Dias, Juliana Furtado, coorient. III. Título.</p>
------	--

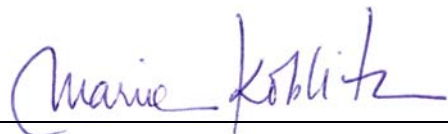
Ingrid da Costa Maia

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE DE
CERVEJARIA ARTESANAL E A INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em 17/06/2020

BANCA EXAMINADORA



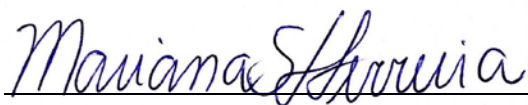
Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Bello Koblitz

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Prof^a. Dr^a. Eveline Lopes Almeida

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Prof^a. Dr^a. Mariana Simões Larraz Ferreira (orientadora)

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e namorado, e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha jornada até os dias de hoje.

AGRADECIMENTOS

Como agradecer a todas as pessoas que contribuíram para essa jornada em uma folha só? Vamos tentar!

Deus é o responsável por tudo, inclusive por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

Agradeço às agências de fomento FAPERJ e CAPES, por financiarem este projeto e pela bolsa de mestrado. Agradeço a querida UNIRIO por me acolher como aluna e ao PPGAN pela oportunidade de fazer parte deste Programa neste país onde atualmente a pesquisa passa por tantas dificuldades.

Gratidão infinita pelas minhas orientadoras, à querida Juliana Dias por ter aberto as portas da UNIRIO e ter me acompanhado e orientado com aquele toque especial de amizade e carinho e à querida Mariana Ferreira por ser essa pessoa tão especial e por ter batalhado por mim, possibilitando a mais enriquecedora experiência de vida, meu estágio na França. Somado ao time, à querida Elisa Cavalcanti que chegou para colaborar com meu projeto e sua orientação se tornou fundamental.

À Denise Freire minha gratidão por abrir as portas do LaBiM (UFRJ) e permitir que eu utilizasse seu banco de microrganismos e a estrutura do lab, e àqueles de lá que me ajudaram. E como eu poderia fazer minha pesquisa sem minhas amostras, obrigada à cervejaria Allegra e ao querido Ricardo por me cederem os bagaços.

Não poderia deixar de citar as minhas orientadoras na França, Sana Raouche e Isabelle Gimbert, que me receberam e ensinaram, e todos que me acolheram no INRA.

Agradeço a minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas, a minha querida mãe Dora que se preocupou com a minha saúde acima de qualquer coisa, ao meu amado pai Admir que está em outro plano espiritual com certeza torcendo por mim, ao meu irmão Wellington, cunhada Mônica e sobrinho Guilherme, que me encheram de amor quando eu mais precisei. Ao meu namorado Fernando que aturou meu mau humor e que sempre me disse “calma, tudo vai dar certo” nos períodos mais difíceis. A todos os meus familiares que estão longe, mas que tenho certeza de que vibram com minhas vitórias. A todos as pessoas próximas a minha família que sempre torceram por mim.

Muito obrigada também a equipe tão querida da *Los Paderos*, por fazer parte da minha vida de forma tão especial.

Não posso deixar de fora minhas amigas “Lulus” tão especiais na pesquisa, de quando eu fui IC nos tempos de faculdade, que me fizeram amar a bancada, vocês também são responsáveis por isso. Incluo aqui minha amiga Manu! Presentes da UFRJ!

E aí vieram os novos amigos do Bioativos, me acolheram com café fresquinho e muitos *helps* na bancada, sou infinitamente grata por essa equipe que tenho, e por aqueles que passaram e seguiram outros caminhos, e aqueles que ainda vou conhecer! A pesquisa nos faz família, e tenho muito orgulho de estar com vocês!

Obrigada à querida amiga Roberta, por ser minha dupla imbatível, e aos alunos da equipe da professora Juliana. Agradeço também aos amigos que dividiram as aulas deste período, e a todos aqueles da UNIRIO que direta ou indiretamente participam disso tudo.

Uma folha não foi suficiente, e nunca será, muitas folhas ainda virão, pois o mundo tem sido absurdamente generoso comigo, e não posso nunca deixar de agradecer. Até a próxima, que venha o doutorado!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

(Martin Luther King)

RESUMO

A cerveja é uma bebida mundialmente apreciada e que apresenta uma variedade de compostos que oferecem tanto características sensoriais quanto propriedades antioxidantes. A produção brasileira de cerveja vem crescendo nos últimos anos e conseqüentemente há um aumento da geração de subprodutos. O bagaço de malte (BM) é o principal subproduto e representa 85% do total gerado, sendo 20 kg de BM úmido a cada 100 litros de cerveja fabricada. Essa elevada geração de resíduo causa impacto negativo dentro das perspectivas de sustentabilidade e há uma crescente pressão para assegurar a reutilização destes subprodutos para atender às preocupações econômicas e ambientais. O BM é um resíduo lignocelulósico e com forte potencial para obtenção de ingredientes funcionais, como antioxidantes e fibras alimentares, além de ser abundante e de baixo custo. Há evidências da valorização de BM utilizando técnicas de fermentação em estado sólido (FES), podendo aumentar o valor nutricional do BM e seu potencial para ser usado em aplicações relacionadas à alimentação e nutrição, agregando valor a esse subproduto. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos por técnicas metabolômicas em diferentes tipos de BM oriundos de cervejaria artesanal e avaliar o efeito da FES na liberação destes compostos para valorização do BM como ingrediente funcional. Foi demonstrado pelo teor de fenólicos totais e atividade antioxidante por DPPH que a FES foi eficiente na liberação de compostos bioativos. A análise metabolômica do perfil de compostos fenólicos por UPLC-ESI-QTOF-MS^E, mostrou que 102 compostos foram tentativamente identificados levando em conta todas as amostras. O tipo de malte influenciou na composição e foram demonstrados pela primeira vez compostos exclusivos nos bagaços antes e após a fermentação, sendo os ácidos hidroxicinâmicos os mais abundantes. Destaca-se, no entanto, que houve redução da abundância de íons nos bagaços fermentados apontando para uma possível degradação de compostos mais sensíveis a extração. As perspectivas futuras são de otimização da fermentação em estado sólido e de técnicas de extração com melhor performance, a fim de potencializar a recuperação de compostos bioativos e apontar futuras utilizações na indústria.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, cromatografia líquida, espectrometria de massas, metabolômica.

ABSTRACT

Beer is a world-renowned beverage that contains a variety of compounds that offer both appreciated sensorial characteristics and antioxidant properties. Brazilian beer production has been increasing in recent years and consequently there is an increase in the generation of by-products. Brewer's spent grain (BSG) is the main by-product and represents 85% of the total generated, in the other words, 20 kg of wet BSG per 100 liters of brewed beer. This high generation of waste has a negative impact on sustainability prospects and there is increasing pressure to ensure the reuse of these by-products to meet economic and environmental concerns. BSG is a lignocellulosic residue with a strong potential for obtaining functional ingredients, such as antioxidants and dietary fibers, besides being abundant and inexpensive. There is evidence of the valorization of BSG using solid-state fermentation (SSF), which may increase the nutritional value of BSG and its potential to be used in applications related to food and nutrition, adding value to this by-product. The objective of this work was to determine the antioxidant activity and the profile of phenolic compounds by metabolomic techniques in different types of BSG from craft beers and to evaluate the effect of SSF on the release of these compounds in a perspective to add value to BSG as a functional ingredient. It was demonstrated through analysis of total phenolic content and antioxidant activity by DPPH that SSF was efficient to release bioactive compounds. Metabolomic analysis of the phenolic profile by UPLC-ESI-QTOF-MS^E showed 102 compounds tentatively identified taking account all samples. The type of malt influences the composition and exclusive compounds were demonstrated for the first time in BSG before and after fermentation, hydroxycinnamic acids were the most abundant. However, the reduction in the abundance of ions in fermented BSG points to a possible degradation of compounds more sensitive to extraction. The future perspectives are of optimization of solid-state fermentation and of extraction techniques with better performance, to enhance the recovery of bioactive compounds and point out future uses in the industry.

Keywords: Phenolic compounds, liquid chromatography, mass spectrometry, metabolomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1: Composição do BM	6
Fig. 2: Representações da estrutura da parede celular primária do material vegetal e ligação cruzada entre componentes estruturais e compostos fenólicos.	8
Fig. 3: Ácido ferúlico ligado a um arabinosilano.....	9
Fig. 4: Exemplos de Ácidos hidroxicinâmicos (a) p-cumárico, (b) cafeico e (c) ferúlico.	9
Fig. 5: Exemplos de flavonoides (a) Catequina e (b) Quercetina.....	11
Fig. 6: Total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (DPPH) of the extracts of brewer's spent grain (BSG) and fermented BSG	23
Fig.7: Metabolomic analysis: number of identifications of each sample in different brewer's spent grain (BSG) types (A); class distribution of identified phenolic compounds in free and bound extracts in BSG (B); number of identifications of each sample in BSG vs SSF (solid state fermented BSG) (C); and total relative ion abundance of phenolic compounds in BSG vs SSF (D).....	25
Fig. 8: Principal component analysis (PCA) biplot between brewer's spent grain (BSG) and solid state fermented (SSF) samples (A) and each BSG and SSF samples (B).	29
Fig. 9: Changes in brewer's spent grain (BSG) after solid state fermentation (SSF) by untargeted metabolomic. S-plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of BSG vs SSF samples.....	31
Fig.10: Fig. supplementary. <i>MS-Base peak chromatograms (BPI) of each Pilsen extract. SSF: solid-state fermentation; and BSG: brewers' spent grain</i>	43
Fig.11: Fig. supplementary. <i>MS-Base peak chromatograms (BPI) of each IPA extract. SSF: solid-state fermentation; and BSG: brewers' spent grain</i>	44
Fig.12: Fig. supplementary. <i>MS-Base peak chromatograms (BPI) of each Witbier extract. SSF: solid-state fermentation; and BSG: brewers' spent grain</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Most abundant phenolic compounds and reference standard compounds identified.	27
Tabela2: Supplementary Table - Phenolic compounds and reference standard compounds identified in free and bound extracts.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Analysis of variance
AXOS	arabino-xilooligossacarídeos
BHA	2,3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	2,6-diterc-butil-p-creso
BM	Bagaço de Malte
BSG	Brewer's Spent Grain
CG	Cromatografia Gasosa
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI	Electro spray ionization
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCA	Hydroxycinnamic Acids
HPLC	Cromatografia Líquida e Alta Eficiência
IPA	Indian Pale Ale
LC	Cromatografia Líquida
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Espectrometria de Massas
<i>m/z</i>	Massa / Carga
NaOH	Hidróxido de Sódio
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PC	Phenolic Compound
PCA	Principal Component Analysis
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
QC	Quality Control
QTOF	Quadropole Time of Flight
SSF	Solid-State Fermentation
TE	Trolox Equivalents

TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TPC	Total Phenolic Content
UPLC-MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
VIP	Variable Importance Projection

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Cerveja: o início de tudo.....	4
2. Bagaço de malte: composição e usos	5
3. Compostos bioativos	7
4. Atividade antioxidante do bagaço de malte.....	10
5. Fermentação em estado sólido.....	11
6. A metabolômica para caracterização dos compostos de interesse	13
CAPÍTULO II – Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer’s spent grain revealed by UPLC-MS ^E	16
1. Introduction	18
2. Material and methods	19
2.1 Brewer’s spent grain.....	19
2.2 Brewer’s spent grain fermentation	19
2.3 Extraction of free and bound phenolic compounds of BSG and fermented BSG..	19
2.4 Total phenolic content and antioxidant activity	20
2.5 UPLC-ESI-QTOF-MS ^E metabolomics data acquisition	20
2.6 Statistical analysis	21
3. Results and discussion.....	21
3.1 Release of BSG antioxidant compounds by solid-state fermentation.....	21
3.2 Identification of non-fermented BSG phenolic compounds by UPLC-MS ^E	23
3.3 Changes after SSF by untargeted metabolomics analysis.....	26
4. Conclusion.....	32
CONCLUSÃO GERAL	34
REFERENCIAS	35

INTRODUÇÃO

O bagaço de malte (BM) é um subproduto da indústria cervejeira obtido após o processo de esmagamento e filtração, onde é extraída a parte líquida, chamada mosto, restando a parte insolúvel, que representa o BM de cevada, constituído principalmente de fibras e proteínas (Lynch, Steffen, & Arendt, 2016). E assim, como a maioria das indústrias alimentícias, é gerado grandes quantidades de subprodutos; o BM representa 85% do total de subprodutos produzidos a partir do processo de fabricação de cerveja, sendo considerado o mais abundante.

Essa elevada geração de BM em uma indústria é vista negativamente dentro das perspectivas de sustentabilidade. Cerca de 20 kg de BM úmido são gerados a cada 100 litros de cerveja fabricada. O BM gerado é geralmente incorporado na alimentação animal ou seu descarte é feito em aterros sanitários, que não são suficientes para drenar a grande quantidade produzida por ano (Stefanello et al., 2018). Além disso, a alta concentração de compostos orgânicos presentes no bagaço conferem uma alta demanda bioquímica de oxigênio para a sua degradação (Socaci et al., 2018). Fatos estes que não corroboram as políticas de sustentabilidade e tratamento de resíduos agroindustriais.

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS, Lei nº 12.305) (BRASIL, 2010) prevê a redução na geração de resíduos, tendo como proposta a prática de hábitos de consumo sustentável e um conjunto de instrumentos para propiciar o aumento da reciclagem e da reutilização dos resíduos sólidos (que tem valor econômico e pode ser reciclado ou reaproveitado) e a destinação ambientalmente adequada dos rejeitos (que não pode ser reciclado ou reutilizado). Institui ainda a responsabilidade compartilhada dos geradores de resíduos: fabricantes, importadores, distribuidores, comerciantes, cidadão e titulares de serviços de manejo dos resíduos sólidos urbanos, na logística reversa dos resíduos e embalagens pós-consumo. Isso demonstra a atual preocupação com a problemática de geração de resíduos, não só considerando questões de sustentabilidade, mas também políticas de saúde pública.

Com uma mudança nos padrões de consumo, busca-se promover a eficiência energética e de recursos, e isso requer mudança de processos também na produção de alimentos, ou seja, na agricultura e no processamento de alimentos, principalmente com a redução de quantidades desperdiçadas. A busca por redução de resíduos potencializa as pesquisas com biotransformação a partir de uma matriz advinda de subprodutos agroindustriais com a geração de ingredientes alimentares funcionais, corroborando o desenvolvimento sustentável (Lange & Meyer, 2018).

O BM é um subproduto lignocelulósico que representa uma potencial fonte de ingredientes funcionais, como antioxidantes e fibras alimentares, além de ser abundante e de baixo custo, portanto não é mais visto como resíduo (Mussatto, 2014; Reis, Coelho, Coimbra, & Abu-Ghannam, 2015). Possui altos níveis de compostos fenólicos, o que pode ser explicado pelo fato de que, durante o desenvolvimento dos grãos de cevada, esses compostos são especificamente acumulados nos seus envelopes externos. Os ácidos ferúlico e o p-cumárico são os principais fenólicos. Além de serem poderosos antioxidantes, esses compostos exibem atividades anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas, apoiando, assim, o uso do BM como matéria-prima para a recuperação de compostos bioativos valiosos (Zuorro, Lannone, & Lavecchia, 2019).

Apesar do subproduto BM ser rico em componentes nutricionalmente interessantes, ainda recebe pouca atenção na indústria. Um dos fatores que desestimula seu uso para outros fins é seu alto teor de umidade (em torno de 70%) que dificulta o armazenamento e o transporte, sendo ainda considerado um material de alto risco a degradação microbiológica, possuindo vida de prateleira de 7 a 10 dias em climas quentes (Ikram, Huang, Zhang, Wang, & Yin, 2017).

Na revisão bibliográfica a seguir, serão relatadas evidências da valorização de subprodutos lignocelulósicos utilizando técnicas de fermentação em estado sólido (FES). O processo de FES pode ser considerado uma alternativa promissora para a geração de diversos produtos de interesse industrial, sendo capaz de produzir metabólitos de forma concentrada devido a menor quantidade de água no meio, além de permitir fácil recuperação dos metabólitos formados (Lio & Wang, 2012). Além disso, por ser um processo conduzido na ausência da fase aquosa livre, resulta no mínimo consumo de água e produção de efluente aquoso, promovendo vantagens ecológicas (Hölker & Lenz, 2005)

Dentro deste contexto, a proposta do presente trabalho é a caracterização dos compostos bioativos de BM provenientes de cervejaria artesanal e a utilização da FES para enriquecimento deste subproduto. Considerando a complexidade da matriz a ser analisada e a diversidade de compostos bioativos potencialmente presentes nessa matriz, foi utilizada uma abordagem metabolômica conduzida por análises de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS) com o intuito de caracterizar de maneira abrangente os compostos presentes nos bagaços.

No primeiro capítulo deste trabalho, será apresentada uma revisão bibliográfica, onde serão abordados o estado da arte e da técnica sobre a composição do bagaço de malte, compostos bioativos e fermentação em estado sólido.

No segundo capítulo, será apresentado um artigo original submetido para publicação à revista *LWT – Food Science and Technology*. O artigo é intitulado *Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MS^E*. Nele são apresentados os resultados experimentais obtidos neste trabalho onde foram selecionados microrganismo de 5 linhagens aplicados na fermentação do bagaço pilsen, e após seleção do fungo mais eficiente foi realizada a cinética de fermentação de 3 tipos diferentes de bagaço. Por fim avaliou-se o teor de compostos fenólicos total, atividade antioxidante, e o perfil de compostos fenólicos caracterizado por meio de UPLC-MS^E.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Cerveja: o início de tudo

Produzida desde 7.000 A.C., a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, feita de água, malte ou grãos, lúpulo e leveduras como componentes básicos que, assim como a tecnologia cervejeira, praticamente não mudou ao longo do tempo, exceto pela diversificação dos componentes nos últimos séculos (Albanese, Ciriminna, Meneguzzo, & Pagliaro, 2017).

A cerveja é uma bebida muito apreciada mundialmente e a produção brasileira vem crescendo com grande destaque nos últimos anos. O ano de 2019 encerrou-se mostrando a consolidação do crescimento deste mercado no país, chegando a cerca de 1.209 estabelecimentos com cervejarias legalmente instaladas, e cerveja é o produto com maior número de registros no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com 27.329 produtos registrados (Marcusso & Müller, 2020).

Cerveja é definida como a bebida resultante da fermentação, mediante levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou do extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo. Uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros (MAPA, 2001).

Cervejas de diferentes estilos, tais como *pilsen* (*lager* padrão americano), *bock*, *weizen*, *pale* e *ale* marrom, *rauchbier* e muitos outros originam-se de variações em processamento, formulações e composição de ingredientes; os maltes entram na produção como *blends*, geralmente com um malte base do tipo pilsen, malte com melhor rendimento em termos de amido e enzimas, e outros maltes que adicionam aroma, cor e sabor característicos de cada cerveja. A classificação adicional de cervejas é baseada em mudanças nos processos da fabricação, como a produção de cervejas de pressão, que não são pasteurizadas, e cervejas não alcoólicas, que são fabricadas com uma fermentação parcial. Estilos de cerveja também podem variar entre as regiões produtoras, de acordo com aspectos culturais e disponibilidade de ingredientes (Moura-Nunes et al., 2016).

Sabe-se que essa bebida tem um alto poder antioxidante e pode ser considerada fonte de vários compostos bioativos. Contém diversos compostos fenólicos, a maioria proveniente do malte, o restante vindo do lúpulo. Para pessoas que consomem vinho, café, chá e cerveja regularmente, essas bebidas provavelmente são as principais fontes de compostos fenólicos (Nardini, Natella, Scaccini, & Ghiselli, 2006).

Sendo assim, uma porção desses compostos bioativos presentes nestes maltes são transferidos para a cerveja, enquanto a outra parte continua contida neste subproduto, principalmente presa a matriz lignocelulósica do bagaço.

2. Bagaço de malte: composição e usos

Na etapa de fabricação da cerveja chamada de esmagamento, ocorre a conversão enzimática do amido da cevada em açúcares fermentáveis (principalmente maltose e maltotriose) e açúcares não fermentáveis (dextrinas), as proteínas também são parcialmente degradadas em polipeptídeos e aminoácidos. Após este processo hidrolítico, um líquido doce (mosto) é filtrado através da parte insolúvel e não degradada do grão de cevada maltada. O mosto contém os açúcares fermentáveis que serão convertidos em etanol no estágio de fermentação. Após a filtração do mosto, sobra o bagaço do malte que é descartado do processo de fabricação da cerveja (Xiros & Christakopoulos, 2012).

O BM é o principal subproduto da fabricação de cerveja, composto principalmente de restos de grãos de cevada, isto é, o pericarpo, o revestimento da semente, a casca e a camada de aleurona do grão original (Mussatto, 2014). A composição do BM pode variar (Fig. 1) dependendo de fatores como tipo de cevada, tempo de colheita, malte e condições de esmagamento e uso de enzimas nesta etapa (Szwajgier, Waśko, Targoński, Niedźwiadek, & Bancarzewska, 2010). Uma das diferenças entre as cervejas são os *blends* de maltes mais claros e mais escuros, dependendo da variação de tempo e temperatura no processo da malteação. BMs claros contém maiores quantidades de compostos fenólicos quando comparado com o malte escuro e já foi demonstrado que a atividade antioxidante diminuiu com o aumento da temperatura de torra (Lynch et al., 2016), provavelmente pela degradação térmica.

Os principais componentes dos tecidos fibrosos do BM são arabinosilano, lignina e celulose. O bagaço também contém quantidades consideráveis de componentes polifenólicos originalmente presentes nas camadas mais externas do grão de cevada. Os elementos minerais incluem cálcio, cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, selênio, sódio e enxofre, todos em concentrações abaixo de 0,5%. Durante o processo de maltagem, as proteínas da cevada são parcialmente degradadas em aminoácidos solúveis e peptídeos, pelas peptidases endógenas do grão, porém a maior parte deste conteúdo proteico (74-78%) permanece insolúvel no BM. A composição de proteínas do BM é principalmente de

hordeínas e glutelinas, enquanto as albuminas e globulinas correspondem 10% do teor proteico (Rommi, Niemi, Kemppainen, & Kruus, 2018).

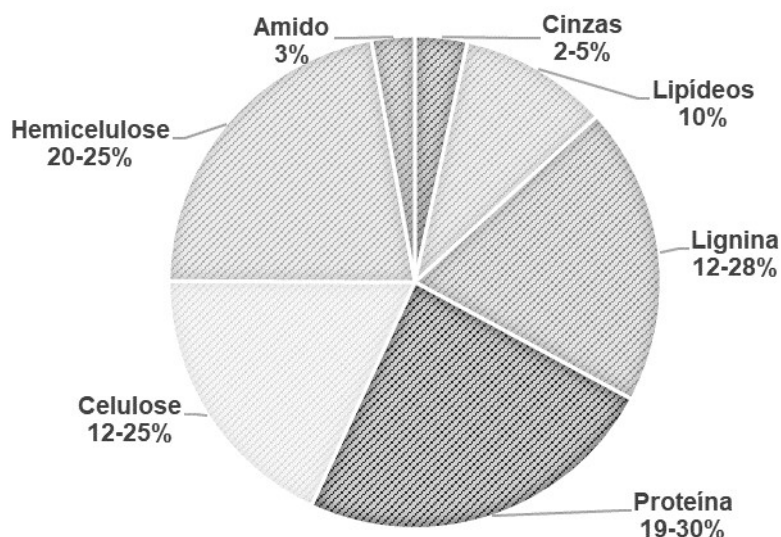


Fig. 1: Composição do BM (Lynch et al., 2016; Szwajgier et al., 2010)

Alguns estudos buscam alternativas para a recuperação de compostos de interesse no BM. A produção de biodiesel a partir de BM já foi relatada com um estudo que propõe uma valorização alternativa do bagaço das cervejarias e mostra que os triglicerídeos presentes no BM podem ser convertidos em biodiesel em uma única etapa usando ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador (Mallen & Najdanovic-Visak, 2018).

Para aplicação em alimentos, diversos trabalhos foram desenvolvidos visando alimentos funcionais enriquecidos em fibras e em compostos antioxidantes. Estudos com massa alimentícia demonstraram que a adição de BM resulta em produtos com maiores teores de fibras sem comprometimento do perfil sensorial, sendo uma alternativa que contribui na associação do conceito de sustentabilidade ao processo de fabricação de cerveja (Cappa & Alamprese, 2017; Nocente, Taddei, Galassi, & Gazza, 2019).

BM também pode ser adicionado até o nível de 30% em formulação de pão, juntamente com enzimas apropriadas, resultando no melhor volume, textura e vida de prateleira do produto (Stojceska & Ainsworth, 2008). A adição de BM em biscoitos tipo “snacks” provocou uma alteração de aroma quando formulações com diferentes percentuais de BM foram avaliadas, devido à complexidade dos compostos presentes em níveis elevados na farinha de BM. No entanto, biscoitos contendo 10% de BM obtiveram alto grau de aceitação, sendo que gosto e textura foram os atributos mais importantes para a aceitabilidade

do produto. Os resultados indicaram a possibilidade da aplicação de BM como ingrediente na formulação de biscoitos ricos em fibra, uma vez que a adição de 10% quase duplicou o teor de fibra dos biscoitos assados sem alterar a preferência dos consumidores. Embora muito promissor, os autores concluíram que mais pesquisas são necessárias para melhorar a qualidade dos produtos assados incorporados de níveis mais elevados de BM (Ktenioudaki et al., 2013). Em hambúrgueres de peixe, os resultados corroboram o potencial do BM como ingrediente alimentício, pois ao adicionar o bagaço nos hambúrgueres os mesmos tornaram-se mais ricos em polifenóis (30%) e flavonoides (50%) e com uma melhor atividade antioxidante do que a amostra controle (Spinelli, Conte, & Del Nobile, 2016).

A obtenção de compostos fenólicos por extração assistida por micro-ondas em diferentes tipos de malte (claro e escuro) obtidos por diferentes processos de fabricação (*pilsen*, *melano*, *melano 80* e *caroon*) também foi investigada. Maltes claros revelaram maior teor ($19,5 \pm 0,6$ mg equivalentes de ác. gálico/g BM, peso seco) em relação aos maltes escuros ($16,2 \pm 0,6$ mg EAG/g BM), com destaque para o malte tipo *pilsen*. O tipo de malte (diferenças genéticas de cada grão) e o processo de maltagem (binômio tempo/temperaturas de torra) podem ter um impacto importante em termos de composição e características antioxidantes no BM (Moreira et al., 2013).

Os resultados destes estudos apresentados destacam o potencial do BM como fonte de compostos valiosos, e podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para a exploração integral do BM, reduzindo o impacto ambiental das indústrias cervejeiras. Os resultados evidenciam ainda que o BM pode ser usado como fonte natural e econômica de compostos bioativos e funcionais para a saúde humana e para a indústria alimentícia.

3. Compostos bioativos

Nas últimas décadas, estudos no campo de compostos bioativos têm avançado tecnologicamente principalmente devido a uma crescente preocupação do consumidor com a saúde humana. Estudos envolvendo esses compostos (por exemplo, fenólicos, carotenoides, betalaínas e vitaminas) revelaram que seu consumo diário melhora a saúde com redução de níveis plasmáticos de colesterol, fatores de risco cardiovascular, agregação de placas e tendência da lesão de reperfusão isquêmica, dentre outros efeitos (Sant'Anna et al, 2013).

Os compostos fenólicos são compostos bioativos classificados principalmente de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem, como por exemplo, ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, lignanas e taninos. Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um

anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais. Consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmicos (Angelo & Jorge, 2007).

Predominantes do BM (Almeida et al., 2017), os ácidos fenólicos são os compostos fenólicos mais comuns e geralmente ocorrem como formas solúveis conjugadas (glicosídeos) e insolúveis, sendo estes últimos ligados covalentemente a componentes estruturais da parede celular (Fig.s 2 e 3), tais como celulose, hemicelulose (por exemplo, arabinoxilanos), lignina, pectina e proteínas estruturais. Os ácidos fenólicos formam ligações éter com a lignina através dos seus grupos hidroxila no anel aromático e ligações éster com hidratos de carbono e proteínas estruturais através do seu grupo carboxílico (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2014).

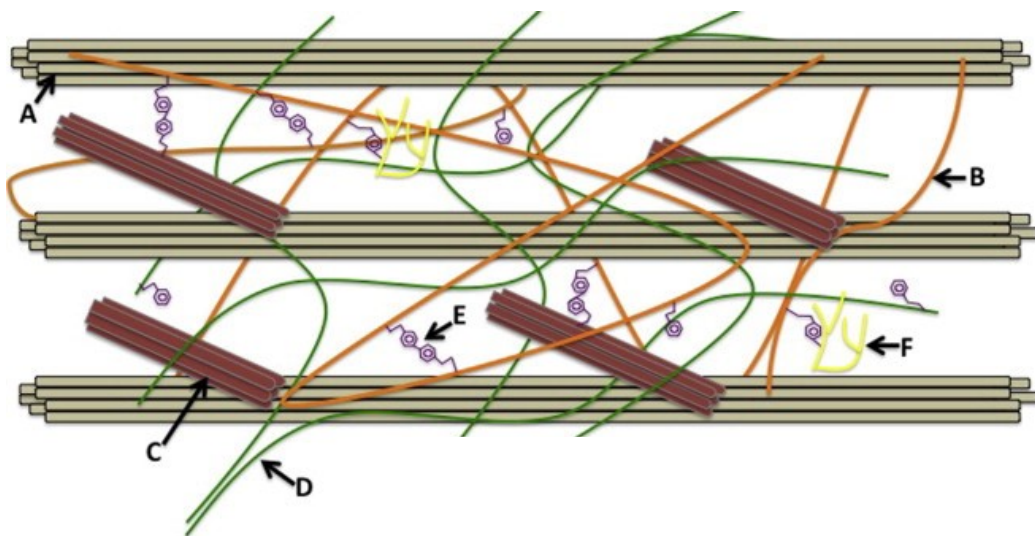


Fig. 2: Representações da estrutura da parede celular primária do material vegetal e ligação cruzada entre componentes estruturais e compostos fenólicos. (A) celulose. (B) Hemicelulose. (C) proteínas estruturais. (D) pectina. (E) Ácidos fenólicos. (F) Lignina (Acosta-Estrada et al., 2014).

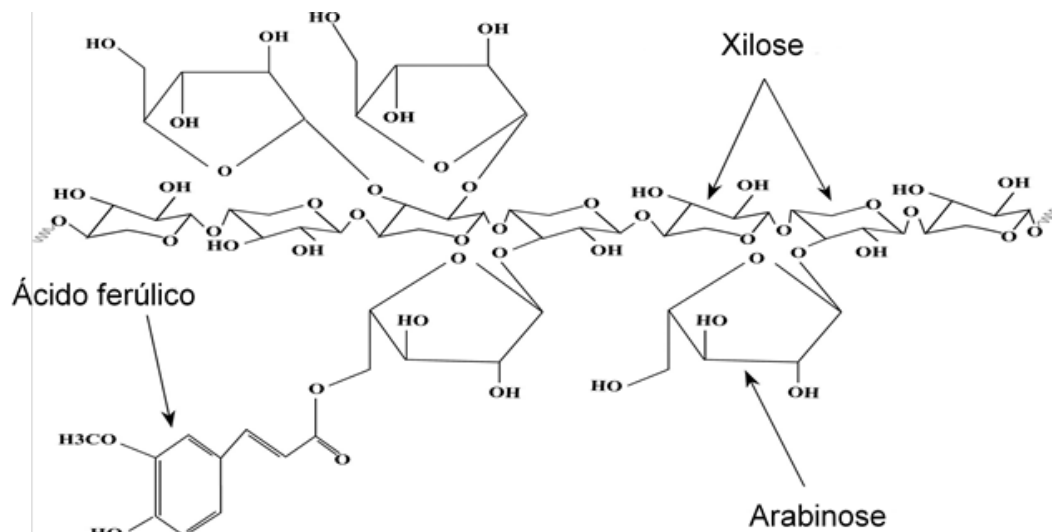


Fig. 3: Ácido ferúlico ligado a um arabinoxilano.

Como na maioria dos cereais, no grão de cevada eles são encontrados principalmente na casca, como por exemplo, os ácidos hidroxicinâmicos que se acumulam nas paredes das células. São produzidos pela via dos fenilpropanoides e são a classe primária de compostos fenólicos. Os ácidos hidroxicinâmicos têm um esqueleto C_6-C_3 e as diferenças nos substituintes do anel aromático produzem diferentes ácidos fenólicos, incluindo os ácidos p-cumárico, caféico e ferúlico (Fig. 4), estes presentes na cevada, cerveja e BM (McCarthy et al., 2013).

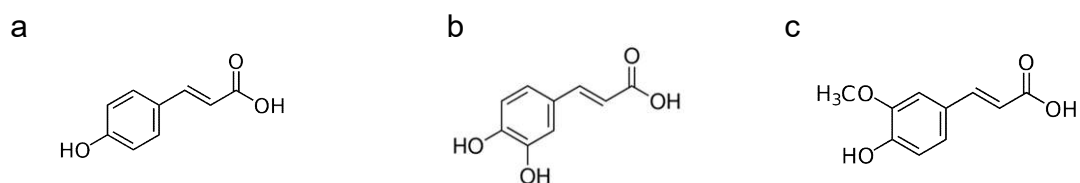


Fig. 4: Exemplos de Ácidos hidroxicinâmicos (a) p-cumárico, (b) cafeico e (c) ferúlico.

Os compostos fenólicos em geral são de grande interesse para cientistas, indústria de alimentos e consumidores devido à sua influência na qualidade dos alimentos, atuando no aumento do tempo de prateleira por exemplo, e papéis protetores e preventivos na patogênese de certos tipos de câncer e várias outras doenças crônicas. O ácido ferúlico é considerado um dos mais importantes ácidos fenólicos, tendo muitas funções fisiológicas, incluindo

antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, antitrombose e anticâncer. Também protege contra doenças coronarianas, reduz o colesterol no soro e no fígado e aumenta a viabilidade espermática (Bento-Silva, Vaz Patto, & do Rosário Bronze, 2018).

O BM é uma potencialmente fonte de ácidos fenólicos, sendo o ácido ferúlico e p-cumárico os mais abundantes no BM (Szwajgier et al., 2010). Existem processos alimentares que aumentam a liberação de fenólicos ligados em cereais. Estes incluem fermentação e maltagem, bem como processos termomecânicos, como cozimento por extrusão e hidrólise alcalina (Acosta-Estrada et al., 2014).

4. Atividade antioxidante do bagaço de malte

Os antioxidantes são compostos bioativos que oferecem proteção contra o efeito nocivo dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, oferecendo benefícios à saúde humana e aumentando a preservação dos alimentos (Quirós-Sauceda, Ayala-Zavala, Olivas, & González-Aguilar, 2014).

São amplamente utilizados em produtos alimentícios para prevenir ou retardar a oxidação. A recente tendência mundial de evitar ou pelo menos reduzir o uso de aditivos sintéticos, como BHT e BHA, criou a necessidade de identificar fontes alternativas naturais (e possivelmente mais seguras) de antioxidantes alimentares. Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no uso de antioxidantes naturais na indústria alimentícia, não apenas para a aplicação como preservativos, mas também por conta de seus benefícios para a saúde humana (Barbosa-Pereira, Pocheville, Angulo, Paseiro-Losada, & Cruz, 2013).

Flavonoides (Fig. 5), uns dos principais compostos bioativos com potente ação antioxidante, são compostos por dois anéis aromáticos unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (Fig. 4) (Angelo & Jorge, 2007). Tanto flavonoides ($C_6-C_3-C_6$) quanto ácidos hidroxicinâmicos (C_6-C_3), predominantes no BM, possuem efeito antioxidante *in vitro* semelhante ao de compostos bioativos bem conhecidos como antioxidantes, tais como o α -tocoferol e ácido ascórbico (Moreira et al., 2013). Também já foi relatada alta atividade antioxidante em BM com ensaio de DPPH e ORAC (Almeida et al., 2017).

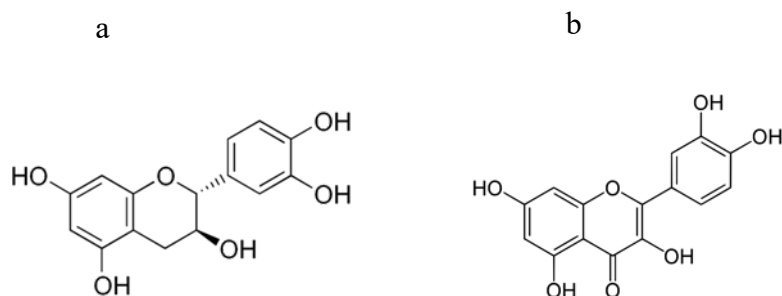


Fig. 5: Exemplos de flavonoides (a) Catequina e (b) Quercetina

Há diversos métodos de avaliação da atividade antioxidante total, porém o que determina a escolha é a natureza dos compostos presentes no alimento, assim, existem métodos mais apropriados para compostos hidrofílicos e outros para compostos lipofílicos. Os métodos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* são métodos espectrofotométricos como o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), por meio da redução dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazil) ou ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e também o método de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).

Estudos demonstraram uma variação de 5,33 a 12,62% de inibição do DPPH com BM claro e escuro com diferentes tipos de extração (McCarthy et al., 2013) e valores de 12 e 15% de inibição do DPPH com BM escuro e claro, respectivamente com extração assistida por micro-ondas (Moreira et al., 2013), quanto maior a inibição do DPPH, maior é a capacidade antioxidante. Extratos fenólicos preparados a partir de BM, a partir de procedimentos enzimáticos, já foram testados como protetor de DNA em células por possuir boa atividade antioxidante (Crowley et al., 2015; McCarthy et al., 2014), além proteger contra o estresse oxidativo celular, também têm a capacidade de reduzir a produção de citocinas.

Apesar da existência de pesquisas que apontam o potencial de aplicação do BM, há a necessidade de uma investigação do perfil destes compostos e de contribuições que bagaços de diferentes tipos de cerveja podem oferecer, diante da diversidade de cervejas artesanais no Brasil.

5. Fermentação em estado sólido

A FES é definida como o processo de fermentação em que microrganismos crescem em matriz sólida sem a presença de água livre, e nos últimos anos tem se mostrado como um

processo promissor no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado a partir de resíduos agroindustriais (Ghoshal, Basu, & Shivhare, 2012).

Devido ao baixo conteúdo de umidade, a FES pode ser conduzida somente por um limitado número de microrganismos, principalmente levedura e fungos. A fermentação em estado sólido é utilizada para a produção de alimentos, enzimas, flavorizantes, ácidos orgânicos, ácido cítrico, goma xantana e outros compostos (Couto & Sanroman, 2006; Gupta, Lee, & Chen, 2018). Os microrganismos mais utilizados nesse tipo de sistema são fungos filamentosos, que inclui várias espécies usadas industrialmente para produção de enzimas (glicoamilases, celulasas, tanases), ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido fumárico), bem como produção de alimentos tradicionais como *tempeh* (Indonésia), *peka* (Croácia), *ragi* (Índia) e *loog-pang* (Tailândia). Fungos filamentosos são empregados industrialmente por sua capacidade de consumir uma grande variedade de fontes de carbono. A penetração de suas hifas no interior das partículas do substrato permite uma maior acessibilidade aos nutrientes, quando comparado ao crescimento de microrganismos unicelulares (Londoño-Hernández et al., 2017). É importante destacar que os microrganismos utilizados na indústria de alimentos precisam ser reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), pois estes, não produzem toxinas ou causam nenhum outro dano à saúde.

Os fungos são conhecidos pela eficiente degradação da biomassa vegetal, composta principalmente de polissacarídeos e lignina. No entanto, os fungos não podem absorver compostos poliméricos complexos, o que faz com que produzam enzimas extracelulares para degradar os polímeros em oligômeros (Bhanja Dey & Kuhad, 2014; Cooray & Chen, 2018). Os subprodutos do processamento de grãos contêm uma grande quantidade de hemiceluloses, celulose, lignina, minerais e compostos bioativos (Kaprelyants, 2017), que somados a sua abundância e ao baixo custo, tornam-se interessantes como matriz para FES.

Foram observados níveis aumentados de aminoácidos, ácido cítrico, vitaminas e antioxidantes em BM após fermentação, enquanto os níveis de carboidratos, gorduras e fibras foram reduzidos. Sendo assim, a fermentação parece liberar nutrientes do BM e aumentar seu potencial uso para aplicações em alimentos, agregando valor a esse subproduto (Cooray & Chen, 2018). A FES de subprodutos de cereais é capaz de aumentar o teor de compostos fenólicos devido à clivagem de compostos complexados com a lignina através de enzimas extracelulares produzidas pelo microrganismo. Fungos filamentosos mostram elevado potencial para melhorar as propriedades antioxidantes dos cereais, através da liberação e consequente aumento de conteúdo fenólico total e do potencial antioxidante (Londoño-

Hernández et al., 2017). Na utilização com farelo de arroz, a FES com *R. oryzae* foi um método efetivo para intensificar as propriedades antioxidantes deste subproduto. O farelo fermentado por 24 h apresentou um conteúdo de compostos fenólicos totais de 2.200 µg ác. ferúlico/g de farelo (Oliveira, Cipolatti, Furlong, & Soares, 2012).

No BM fermentado com *Rhizopus oligosporus* foi observado níveis aumentados de aminoácidos, ácido cítrico, vitaminas e antioxidantes, enquanto os níveis de carboidratos, gorduras e fibras alimentares foram reduzidos (Cooray & Chen, 2018). Quando fermentado com o microrganismo *Trichoderma reesei*, o BM libera arabino-xilooligossacarídeos (AXOS) com grande potencial prebiótico demonstrando que a fermentação é uma opção atraente e vantajosa para hidrolisar este bagaço lignocelulósico (Amorim, Silvério, & Rodrigues, 2019).

Os ácidos fenólicos de cereais podem estar ligados por ligações éster ou éter a outros componentes da parede celular, essas ligações podem ser quebradas por hidrólise alcalina a temperatura ambiente que quebra as ligações éster ou por concentrados a quente (NaOH 4 M a 170 °C) que quebram as ligações éter. As enzimas produzidas durante a fermentação poderiam enfraquecer as ligações éter entre fenólicos e ligados e componentes da parede celular, o os tornaria mais fáceis de extrair (Bei, Liu, Wang, Chen, & Wu, 2017).

É importante destacar que o perfil de compostos pode variar conforme a cinética da fermentação. Em farelo de arroz preto, o teor de ácido ferúlico, detectado por HPLC, atingiu seu máximo no terceiro dia de fermentação (566,5 µg / g) e diminuiu substancialmente no quarto dia de fermentação; a hipótese do autor é que o ácido fenólico se decompôs ou se ligou de volta aos polissacarídeos insolúveis (Shin, Kim, Lee, & Lim, 2019).

Assim, mais estudos precisam ser realizados para avaliar a utilização do BM como matriz para FES, a fim de obter diversos compostos de valor agregado a partir de um material de baixo custo, visto o crescimento deste mercado, necessidade de se buscar alternativas de obtenção de extratos com benefícios nutricionais, e atender às demandas de sustentabilidade. Devido a gama de microrganismo, há a necessidade de se buscar cepas com melhor desempenho, duração da fermentação que traga melhores resultados, e qual perfil de compostos seria mais interessante a partir da manipulação das variáveis.

6. A metabolômica para caracterização dos compostos de interesse

A metabolômica pode ser definida como o uso de plataformas analíticas avançadas para caracterizar a composição dos metabólitos (tipicamente compostos com massa molecular inferior a 1.500 Da) de um sistema ou organismo particular (Bijttebier et al., 2016). Para

detecção dos metabólitos presentes em um determinado organismo, como por exemplo, os compostos bioativos, diferentes plataformas analíticas devem ser combinadas, em virtude de suas propriedades químicas diferentes. Assim, em complemento às metodologias baseadas na espectrofotometria, que são muito úteis para estimativa da atividade antioxidante de alguns grupos de compostos bioativos, as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas aparecem como técnicas fundamentais para caracterizar o perfil abrangente de compostos bioativos em misturas complexas.

Então, a cromatografia surgiu como uma técnica para separação de compostos e, com isso, uma vez separados, consegue-se analisar cada composto diferente de forma individual, o que não acontece na espectrofotometria, por exemplo. A cromatografia consiste na interação da fase móvel que carrega a amostra por dentro de uma coluna que contém a fase estacionária, ou seja, os compostos que interagem fortemente com a fase estacionária ficam retidos por mais tempo (Jandera, 2011). Entre as principais técnicas cromatográficas empregadas para análise de compostos bioativos como compostos fenólicos, ácidos graxos e fitoesteróis, destacam-se a cromatografia líquida (do inglês, LC) e cromatografia gasosa (do inglês, GC) (Rodríguez-Pérez, 2016).

Na LC, a fase móvel consiste em um solvente ou uma mistura de solventes no qual o pH é geralmente alterado dependendo do composto para separar. A fase móvel é bombeada dentro da coluna cromatográfica que contém fase estacionária necessária para a separação dos compostos. A coluna mais utilizada é a de fase reversa (do inglês, RP) na qual a fase estacionária é apolar enquanto a fase móvel é uma mistura polar de um ou mais solventes orgânicos e água (Jandera, 2011). Após a separação, faz-se a detecção da mistura eluída da coluna cromatográfica (Rodríguez-Pérez, 2016).

A cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês, UPLC) desenvolveu-se com a introdução das fases estacionárias porosas (colunas) com partículas menores que 2 μm que suportam pressões bastante elevadas (por exemplo acima de 15.000 psi). Essa técnica permite assim altas velocidades lineares da fase móvel, provocando um aumento da resolução e da detectabilidade, além de diminuir o tempo das análises. A UPLC abre possibilidades para aprimorar os métodos analíticos destinados a matrizes complexas, que requerem maior resolução e menor tempo de análise, análises de alto desempenho (Borges, 2013).

A espectrometria de massas (do inglês, MS) é uma técnica em que os compostos são ionizados e separados com base na razão massa/carga (m/z) e o número de íons correspondente a cada unidade de m/z é registrado na forma de um espectro. A análise permite identificar os compostos de uma mistura complexa e pode fornecer a pureza e a estrutura dos

analitos (El-Aneed, Cohen, & Banoub, 2009). A UPLC acoplada à um detector de MS possibilita obter maior qualidade das análises e dos dados ao viabilizar uma maior caracterização e quantificação de substâncias devido à maior sensibilidade e seletividade (Jiménez-Sánchez et al., 2015). Sendo assim, a utilização de técnicas de UPLC-MS tem como principais vantagens a capacidade de separar e identificar uma variedade de analitos, com boa resolução e sensibilidade, redução no tempo de análise, necessidade de pequeno volume de amostra, menor geração de resíduos, além da economia das fases estacionária e móvel (Maldaner & Jardim, 2012).

Ferramentas modernas de metabolômica têm sido aplicadas com sucesso para caracterizar, identificar e quantificar relativamente compostos fenólicos e outros metabólitos secundários em matrizes alimentícias complexas e por isso revelam-se como importantes aliadas para investigação de compostos de interesse biotecnológico para indústria alimentícia e de produtos naturais (Gonçalves et al., 2018; Sá Mendes et al., 2020; Santos et al., 2019). Neste trabalho, a aplicação de ferramentas metabolômicas e da biotecnologia aparecem como questão central aliadas ao aproveitamento de resíduos como fontes não convencionais de compostos bioativos.

CAPÍTULO II – Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer’s spent grain revealed by UPLC-MS^E

Ingrid da Costa Maia^a, Carolina Thomaz dos Santos D’Almeida^a, Denise Maria Guimarães Freire^b, Elisa d’Avila Costa Cavalcanti^b, Luiz Claudio Cameron^c, Juliana Furtado Dias^d, Mariana Simões Larraz Ferreira^{a,c*}

^aLaboratory of Bioactives, Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN), Department of Food Science, Nutrition School, Federal University of State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Brazil

^bDepartment of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

^cLaboratory of Protein Biochemistry-Center of Innovation in Mass Spectrometry (LBP-IMasS), UNIRIO, Brazil

^dLaboratory of Nutritional Investigation and Chronic Degenerative Diseases, Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN), Department of Applied Nutrition, Nutrition School, UNIRIO, Brazil

*Corresponding author: mariana.ferreira@unirio.br

Abstract

Brewers' spent grain (BSG) is the major by-product of the brewing industry and presents a rich chemical composition as substrate for fermentation, besides a valuable source of bioactive compounds. Solid-state fermentation (SSF) was applied using five strains of filamentous fungi in different types of BSG to evaluate the release of phenolic compounds characterized by UPLC-ESI-QTOF-MSE. *Aspergillus oryzae* after 3 days of fermentation was the most effective in the release of antioxidant compounds based on Folin-Ciocalteu and DPPH results. Globally, a total of 102 compounds were tentatively identified. Ferulic, p-coumaric and caffeic acids were the most abundant PC in BSG. Metabolomic approach was essential to reveal distinct phenolic compounds when SSF was applied to BSG, the ratio bound to free was strongly reduced, probably due to the release of compounds from the lignocellulosic matrix by the fungi β -glucosidase. The malt types also significantly impacted the fermentation behavior, resulting in different phenolic profiles. Unlike the number of identifications, the total abundance was 50% reduced after fermentation, probably due to the biotransformation/degradation of hydroxycinnamic acids into their derivatives. SSF effectively increased the release of bound PC leading to a more complex and distinguished profile according to type of malt.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, beer, bioactive compounds, metabolomics, UPLC-MS-MS.

1. Introduction

The brewing industry has gained much prominence in recent years, with an increase in beer consumption observed worldwide. Therefore, there is an increase in the generation of brewer's spent grain (BSG), a by-product with estimated annual world production of approximately 38.6×10^6 tons (Mussatto, 2014) used primarily as animal feed. However, the value of this by-product has also been sought for human consumption, and the rich composition of this product has already been demonstrated, especially considering the composition of bioactive compounds (Ravindran & Jaiswal, 2016), being a potentially valuable source of phenolic acids, especially hydroxycinnamic acids (HCA) (Szwajgier et al., 2010). The valorization of BSG as a source of bioactive compounds has been recently demonstrated, especially due to the great composition of phenolic compounds (PC) (Almeida et al., 2017; Stefanello et al., 2018). Among other bioactivities, PC in food is associated with the prevention of reducing plasma cholesterol levels, cardiovascular risk factors, platelet aggregation and ischemic reperfusion injury tendency, among others diseases (Sant'Anna, Gurak, Marczak, & Tessaro, 2013).

The solid-state fermentation (SSF) process can be considered as a promising alternative for the biotransformation of several products of industrial interest. Since low amount of water is used in this process, it is possible to produce metabolites in a concentrated manner, besides the easy recovery of the formed metabolites. SSF has been shown to be efficient in releasing bioactive compounds from complex food matrices as cereal by-products. SSF is able to increase the content of previously bound phenolic compounds due to the breakdown of compounds complexed with lignin by extracellular enzymes produced by microorganisms (Cooray & Chen, 2018; Gupta et al., 2018; Shin et al., 2019).

In this context, SSF can be considered as a bioeconomic process and suitable for application and transformation of BSG aiming to add value to this abundant by-product converting it to a renewable and low-cost source of bioactive compounds. In this study, SSF was applied to different types of BSG to evaluate the release of phenolic compounds further characterize according to the antioxidant activity and metabolomics approach.

2. Material and methods

2.1 Brewer's spent grain

Wet BSG were kindly provided by the craft brewery Allegra located in the city of Rio de Janeiro (Brazil). Three types of BSG from different beers were used: *Pilsen* (96% pilsen malt and 4% cara light), *IPA* (77% pilsen malt and 23% melanoidine malt) and *Witbier* (67% pilsen malt, 30% wheat malt, and 3% flaked oats). The wet BSG (75% of moisture) were freshly collected on the same day of production and were dried in a ventilated oven (Marconi, Brazil) at 65 °C/8 h. The BSG dried samples (4% of moisture) were ground and homogenized by sieving (tyler mesh 12, 1.70 mm) and stored at -80°C until use. These samples were here after called “BSG”.

2.2 Brewer's spent grain fermentation

Fungi of five strains were used in this study: *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* and *Rizhopus oryzae*, all from the culture collection of the Laboratório de Biotecnologia Microbiana (UFRJ, Brazil). The fungi spores used to start the fermentations were produced by cultivating the microorganism at Potato Dextrose Agar medium at 30 °C/7 days and were recovered by the addition of PBS (pH 7 and 0.1 M) with 1% Tween 80 and agitated with glass beads.

Fermentation experiments were conducted in duplicate in 125 mL erlenmeyer flasks with 5g of BSG (previously autoclaved to guarantee the sterile environment, this sample was called “autoclaved”) and water content up to the water absorption limit of the materials in the medium: 70% for Pilsen and IPA; 60% for Witbier. The samples were inoculated with 10⁷ spores/g of BSG and incubated at 30 °C. At the determined fermentation intervals (0, 1, 2, 4, 7 days), two flasks were collected and the remaining fermented solids were dried in a ventilated oven at 65 °C/6 h and stored at -80 °C until analyses. These samples were here after called “fermented BSG”.

2.3 Extraction of free and bound phenolic compounds of BSG and fermented BSG

The extractions were performed in triplicate according to Santos et al. (2019) with modifications. The free phenolic compounds were extracted with 300 mg of sample macerated with 50 mg of celite and 4 mL of ethanol solution (80% v/v water), the extraction

was carried out during 30 min with ultrasound probe sonication (Desruptor 500 W, Eco-sonics, Brazil) at 20 kHz and 375 W on ice bath. The pellets resulting from extraction were submitted to alkaline hydrolysis followed by acid hydrolysis according to the protocol to extraction of bound compounds. After evaporation, the samples were resuspended in 2 mL of a mixture of methanol (2%), acetonitrile (5%) and water (93%). A set of quality control (QC) samples was produced in order to track metabolomic analysis by pooling equal volume aliquots from all samples.

2.4 Total phenolic content and antioxidant activity

The total phenolic content (TPC) and antioxidant activity were determined in free extracts to assess the action of the different fungi tested in the release of antioxidant compounds. TPC was estimated in triplicate by Folin-Ciocalteu reducing capacity according to Singleton, Orthofer, e Lamuela-Raventós (1999) adapted to microplates (Flex Station III, Molecular Devices) at 750 nm. The TPC was expressed in equivalent milligrams of gallic acid per gram of BSG in dry basis (mg GAE/g). The antioxidant activity against the radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was determined in triplicate (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995) at 517 nm with modifications using a microplate reader. The results were expressed in mg Trolox equivalent per 100g of BSG in dry basis (mg TE/100 g).

2.5 UPLC-ESI-QTOF-MS^E metabolomics data acquisition

The phenolic profile was determined in the different types of BSG and in the selected fermented BSG 3 days samples based on the antioxidant results. The QC samples were positioned after every sixth injections to monitor the stability of the instrument. Five μL of each sample were injected into UPLC Acquity system (Waters Co., USA) coupled with Xevo G2S Q-ToF (Waters Co., England), according to Santos et al. (2019) with modifications. An UPLC HSS T3 C18 column (100 x 2.1 mm, 1.8 μm particle diameter; Waters) at 30 °C and flow rate of 0.5 mL/min of the mobile phases was used according to the following gradient: 0 min (97% A); 11.80 min (50% A); 12.38 min (15% A); 14.23 min (15% A); 14.70 min (97% A). Acquisitions were performed in negative and centroid mode between m/z 50 and 1200, collision energy ramp from 20 to 45 V; cone voltage 30 V; capillary voltage 3.0 kV; desolvation gas (N_2) 1,000 L/h at 500 °C; cone gas 50 L/h; source at 150 °C; and using leucine enkephalin (Leu-Enk, m/z 554.2615, [M-H]⁻) for calibration. A mix containing 33

analytical standards of PCs (10 ppm) was injected to ensure the reproducibility of the instrument and to confirm the PCs identified.

Data processing was performed with the software Progenesis QI (Waters) and the non-targeted identification was carried out using PubChem and Phenol Explorer database following the parameters in descending order of importance: exact mass (< 10 ppm); isotopic similarity (>80%); score (>30), highest score of fragmentation, generated by the software. Data from the literature and chemical features of the molecules were also used as criteria to determine the possible identification of unknown compounds. Only compounds found in the three technical replicates (3/3) with CV <30% were considered as tentatively identified.

2.6 Statistical analysis

The statistical analysis was performed with two-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) and, using the Graphpad Prism 5 software. The metabolomics data were exported to EZinfo 3.0 (Waters) where the principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed.

3. Results and discussion

3.1 Release of BSG antioxidant compounds by solid-state fermentation

To evaluate the effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from BSG, five strains of filamentous fungi (strains already reported in the literature on food production that were available in the microorganism bank) were initially tested over the Pilsen BSG. Firstly, the fermentations were conducted during 3 days and TPC and DPPH tests were performed to select the strain (Fig. 6A and 6B). The best results were obtained with *A. oryzae* (8.45 ± 0.66 mg GAE/g and 15.84 ± 1.21 mg TE/100 g) and *A. terreus* (7.90 ± 0.47 mg GAE/g and 14.33 ± 1.31 mg TE/100 g) without statistically significant difference between them. Compared to non-fermented pilsen BSG, both microorganisms showed results 7 times higher for TPC and 5 times for DPPH.

It has already been reported TPC in BSG with ethanolic extraction of free PC is around 1.00 mg GAE/g (Socaci et al., 2018) and 0.98 mg GAE/g with methanol, while bound extracts after NaOH reaches 17.5 mg GAE/g (Stefanello et al., 2018), and 19.5 mg/g (Moreira et al., 2013) showing the clear difference in the amount of free versus bound phenolic. These results corroborated our TPC data in free extracts (1.01 ± 0.09 mg GAE/g pilsen BSG).

A. oryzae was then selected to continue the work according to previous results on the release of antioxidant compounds from agro-industrial by-products, such as black rice bran (Shin et al., 2019) and corn bagasse (Nejayote) (Acosta-Estrada, Villela-Castrejón, Perez-Carrillo, Gómez-Sánchez, & Gutiérrez-Urbe, 2019). A kinetic of the SSF with *A. oryzae* was performed for the three types of BSG: Pilsen, IPA and Witbier. An upward curve was observed at the results of TPC and DPPH confirming the release of antioxidant compounds through SSF (Fig. 6C and 6D). For all BSG, the TPC values after 3 days were similar, but after that point the Pilsen and IPA showed a downward behavior while the Witbier rises 35% until day 7. This behavior corroborates with the DPPH analysis, while Pilsen and IPA were equal at days 2, 3 and 4, Witbier BSG rises being 70% higher on day 4 compared to the others and reaching the double the value on day 7, in relation to the Pilsen and IPA that decreased. It was also observed a slightly increase of TPC and DPPH after BSG autoclaving. This process is necessary to ensure that samples will undergo action only by the desired microorganism. The obtained results showed that fermentation with *A. oryzae* was efficient for the 3 types of bagasse evaluated; showing the versatility of this fungus, indicating this process can be applied in other types of BSG. The valorization of agro-industrial by-products by applying SSF has been showed to be efficient in the release of antioxidant compounds in cereal co-products such as corn bagasse, wheat bran and rice bran (Abd Razak, Abd Rashid, Jamaluddin, Sharifudin, & Long, 2015; Acosta-Estrada et al., 2019; Shin et al., 2019).

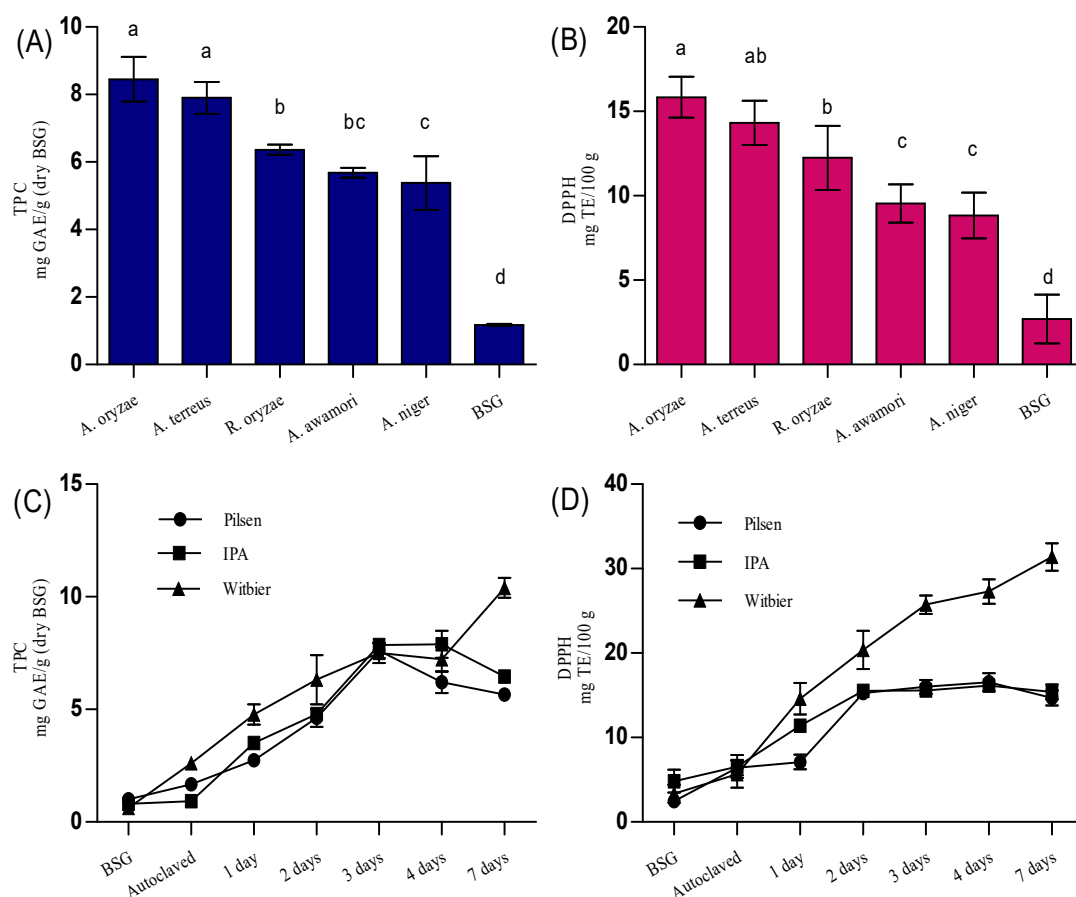


Fig. 6: Total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (DPPH) of the extracts of brewer's spent grain (BSG) and fermented BSG. Pilsen BSG fermented by different fungi during 3 days: TPC (A) and DPPH (B). Pilsen, IPA and Witbier BSG fermented by *Aspergillus oryzae*: TPC (C) and DPPH (D). The data mean averages of biological duplicates and analytical triplicates. Different letters mean significant difference ($p < 0.05$, Tukey test) and bars represent standard deviation.

3.2 Identification of non-fermented BSG phenolic compounds by UPLC-MS^E

Firstly, the comprehensive profile of PC was determined in the three BSG types in both extracts (free and bound) and the identified PC were also relatively quantified by the

UPLC-MS^E method, based on the analysis of their molecular structure by classes. Globally, a total of 93 PC were tentatively identified, which 29 (31%) were commonly in both extracts, 15 (16%) were exclusive to free extract and 49 (53%) to bound extract (Fig. 7A). Thirteen (13) compounds were fully confirmed by reference standards and are indicated in bold (Supplementary table). Typically, the most part of PC in cereals are in the bound form, in wheat grains 75-60% are found in bound form (Santos et al., 2019) while 80-95% of phenolic acids are found bound in cereals (Irakli, Samanidou, Biliaderis, & Papadoyannis, 2012). However, the enzymatic action during malting favors the breaking of ester bonds between PC and cell wall of the cereal matrix (Dvořáková et al., 2008). In this work, the ratio bound to free was similar between the different BSG samples averaging 2, indicating that 65-68% of these compounds were in bound form.

The main class of the identified compounds belonged to flavonoids (57%), followed by phenolic acids (25%), other polyphenols (6.5%), lignans (6.5%) and stilbenes (2%). The abundance of these classes also changes according to the extract, as shown in Fig. 7B. Phenolic acids and flavonoids are the most abundant classes in the free extract and together they are responsible for 94% of the total abundance; while in the bound compounds the phenolic acid class corresponds approximately to 4/5 of the total abundance, followed by flavonoids, lignans and other polyphenols. Remarkably, the stilbene class was unique to the bound extract, present in IPA and Pilsen BSG types.

The predominance of phenolic acids and their main presence in the bound form in BSG are already reported in literature (Carvalho, Gonçalves, & Guido, 2016; Ikram et al., 2017). In the present study, phenolic acids contributed similarly (79-81%) of the total abundance of compounds in the three types of BSG. The impact of phenolic acids in the total abundance can be easily seen among the ten most abundant PC (Table 1). The hydroxycinnamic acids (HCAs), as ferulic, p-coumaric and caffeic acids, are typically the most abundant PCs in BSG (Ikram et al., 2017), corroborating our results where all three BSG contained these phenolic acids that together accounted for 75% of the total abundance, mainly in bound form.

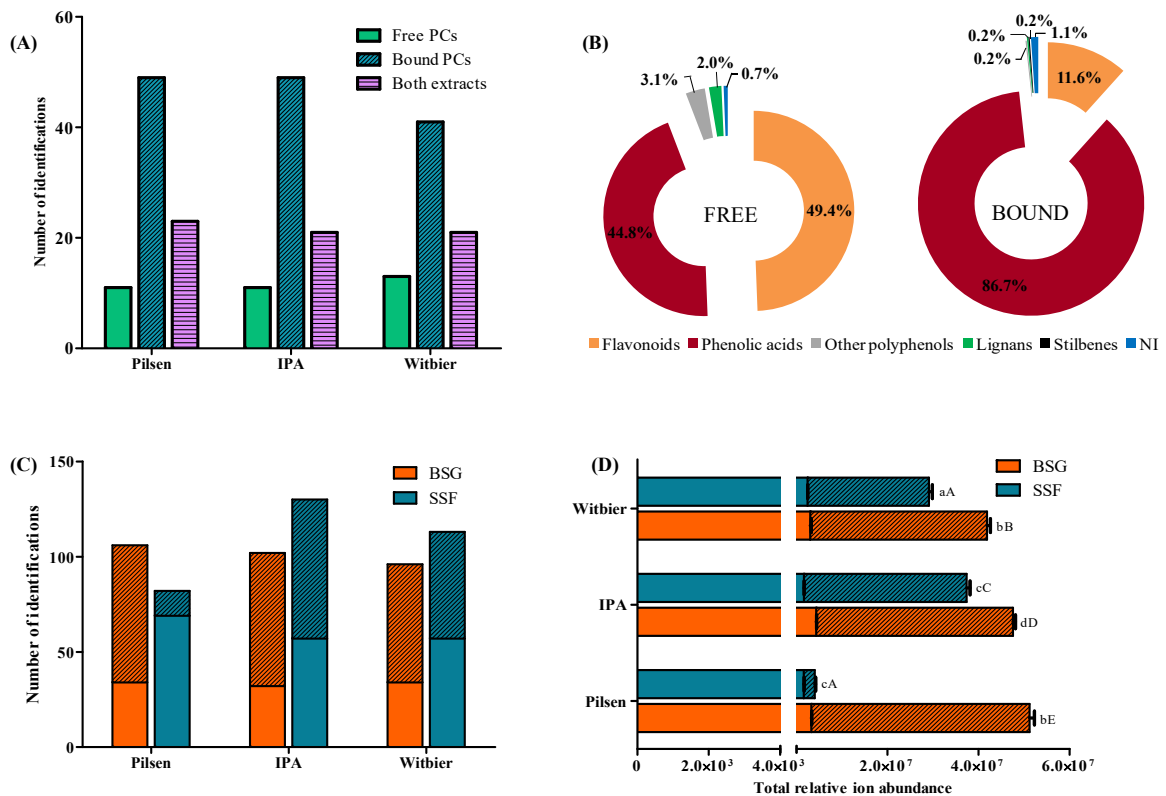


Fig.7: Metabolomic analysis: number of identifications of each sample in different brewer's spent grain (BSG) types (A); Average abundance distributed by classes of compounds in free and bound extracts in BSG (B); number of identifications of each sample in BSG vs SSF (solid state fermented BSG) (C); and total relative ion abundance of phenolic compounds in BSG vs SSF (D). Full-colored columns represent free extracts and the hatched represent bound extracts. Different lowercase and uppercase letters mean a significant difference ($p < 0.05$) between free and bound extracts, respectively. Bars represent standard deviation ($n=3$).

It is interesting to note that in foods, once ingested, the majority part of HCAs are absorbed in the colon, while only a small part are absorbed in the upper gastrointestinal tract (Martini et al., 2019). These compounds and their metabolites, such as dihydrocaffeic and dihydroferulic acids (Supplementary table, #62 and #84), have been associated with a wide range of biological activities, as prevention of Crowley age-associated chronic diseases, such as cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, diabetes (types I and II), and certain types of cancers (Boz, 2015; Ikram et al., 2017). This bioactive potential further encourages the integration of BSG as an ingredient in human food.

3.3 Changes after SSF by untargeted metabolomics analysis

Due to the high variety of enzymes produced by *A. oryzae* during SSF (such as α -amylase, β -glucosidase and cellulase), compounds previously bound to the cell wall can be released in soluble extract and change the phenolic content and profile present in BSG in its natural form (Bhanja Dey & Kuhad, 2014; Rashid et al., 2019)

For an overview of these changes after SSF, the principal component analysis (PCA biplot) was applied to explore the variation in the data set by distributing scores (samples) and loadings (phenolic compounds). The two main components (PC1 and PC2) can be used to detect outliers and to identify biologically interpretable patterns (Yamamoto et al., 2014). First, PC1 and PC2 can explain 99.03% of the total variance between BSG and fermented BSGs (Fig. 8A). This high value indicates a clear distinction and shows that several changes occurred after bioprocessing. This difference between BSGs and fermented BSGs may be due to the fact that, although 86 PCs are common to both set of samples, the abundance of these compounds was differentially intense in one and less intense in the other (Supplementary table). In addition, 7 PC were identified exclusively in the BSG: procyanidin dimer B-type 4, hesperetin, apigenin 7-O-glucoside isomer 2, apigenin 6,8-di-C-glucoside/luteolin-7-O-beta-rutinoside/chrysoeriol-7-O-apiosyl-glucoside, cyanidin 3-O-rutinoside, (-)-epicatechin and (+)-catechin; and 12 PC exclusively in the fermented BSG: irisolidone, schisandrin C, jaceosidin, avenanthramide 2p, rosmarinic acid, salvianolic acid D, 3-O-methylgallic acid, 4-O-methylgallic acid, esculin, 6''-O-acetyldaidzin, 3'-O-methylviolanonone and ligstroside.

Tabela1: Most abundant phenolic compounds and reference standard compounds identified.

Name	Molecular formula	m/z	RT (min)	Score (%)	FS (%)	Fragments	Mass Error (ppm)	IS (%)	Classes	AB
Trans-ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0492	8.03	47.2	46.1	106.0408 (2.31%); 109.0278 (2.18%); 117.0330 (2.64%); 123.0435 (2.19%); 134.0358 (100%); 136.0150 (0.68%); 161.0589 (2.11%); 175.0382 (1.02%); 177.0178 (0.70%); 179.0313 (1.62%)	-7.18	97.90	PA	4.17x10 ⁷
p-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	163.0387	7.51	53.1	76.6	93.0330 (7.20%); 117.0330 (2.65%); 119.0488 (100%)	-8.25	98.14	PA	3.88x10 ⁷
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0496	8.27	53.6	79.8	117.0330 (3.40%); 134.0358 (100%); 165.0542 (56.17%)	-8.59	97.49	PA	1.37x10 ⁷
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.0336	6.28	53.8	79.2	117.0331 (1.30%); 133.0279 (2.24%); 135.0435 (100%)	-7.68	98.36	PA	1.12x10 ⁷
Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	153.0179	5.07	48.7	54.1	95.0123 (100%); 107.0124 (71.00%); 151.0022 (59.18%); 152.0097 (51.76%); 153.0177 (60.81%)	-9.46	99.68	PA	6.35x10 ⁶
3,7-dimethylquercetin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.0652	11.07	47.0	42.2	161.0228 (23.69%); 203.0333 (6.82%); 215.0335 (2.08%); 227.0334 (18.64%); 243.0282 (4.70%); 313.0338 (2.38%); 314.0415 (62.35%)	-4.47	98.18	F	4.51x10 ⁶

Tetramethylsc											
utellareinisome	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	341.1015	10.14	42.5	21.1	165.0541 (11.76%); 326.0779 (33.81%)	-4.44	96.36	F	2.27x10 ⁶	
r 3											
Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	153.0179	5.94	56.1	90.9	67.0173 (100%)	-9.35	99.69	PA	1.78x10 ⁶	
Phlorizine	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	435.1280	8.32	40.4	12.0	91.0174 (5.43%); 130.0409 (7.42%); 159.0429 (24.26%); 177.0175 (1.87%); 225.0526 (3.56%); 239.0693 (24.47%)	-3.77	94.63	F	1.30x10 ⁶	
Naringenin 7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1127	7.85	46.9	41.3	188.0479 (5.57%); 228.0406 (4.77%); 254.0569 (3.44%); 327.0856 (72.40%); 375.1064 (7.96%)	-3.07	96.60	F	1.25x10 ⁶	

m/z = mass/charge; RT = retention time; FS = fragmentation score; IS = isotope similarity; F = flavonoids; PA = phenolic acids; AB = total abundance. Bold represent reference standards.

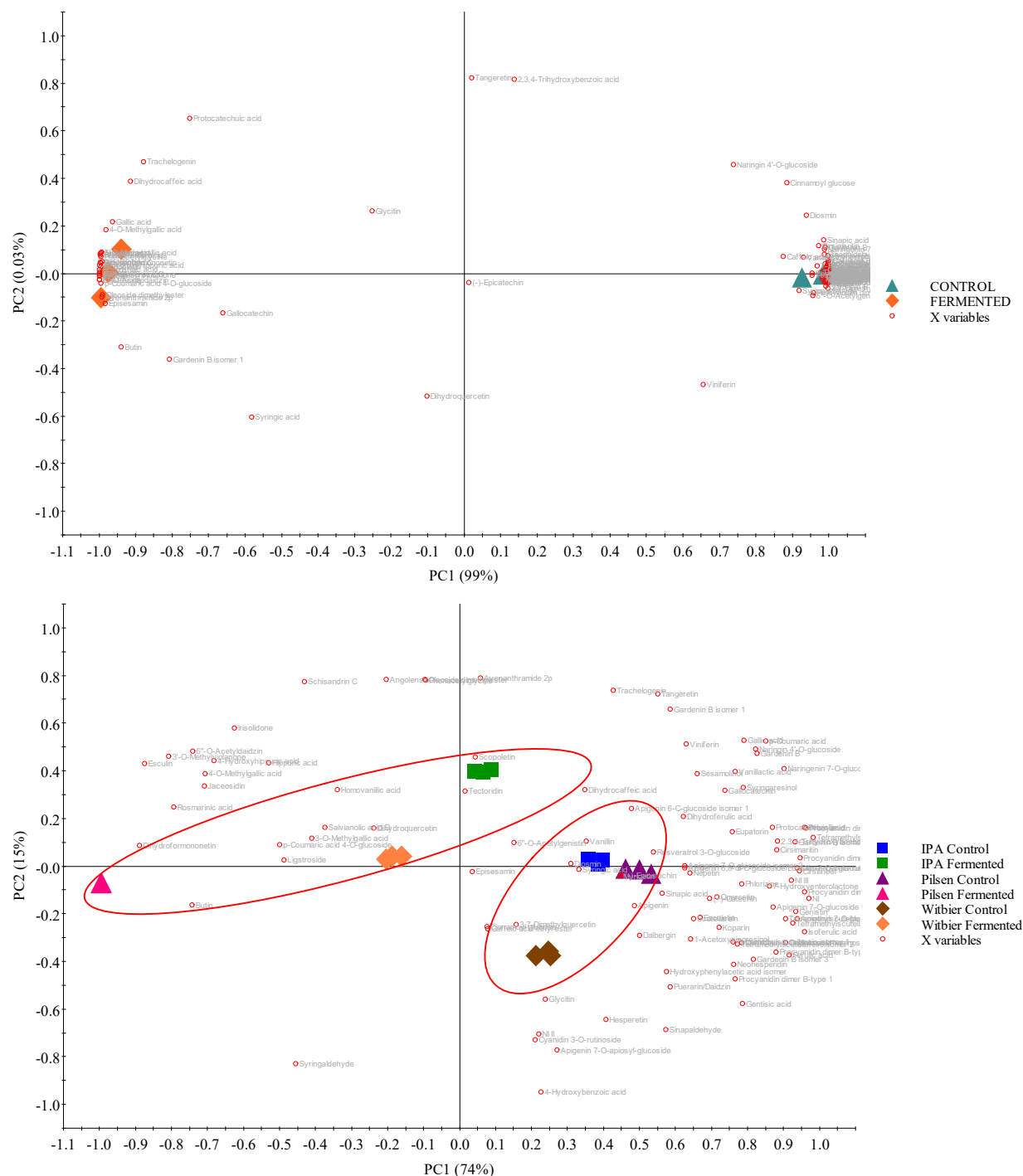


Fig. 8: Principal component analysis (PCA) biplot between brewer's spent grain (BSG) and solid state fermented (SSF) samples (A) and each BSG and SSF samples (B). Identified phenolic compounds (X variables) are presented in red circles.

It is noteworthy that some of the PC exclusively found in BSG are glycosylated making the presence of the enzyme β -glucosidase produced by the fungi even more relevant, because it is able to hydrolyze phenolic glycosides to release free phenolic acids, thus explaining the absence of these compounds after SSF (Martins et al., 2011). Moreover, among

the exclusive PC found after SSF, acetylation and methylation were observed (3-O-methylgallic acid, 4-O-methylgallic acid, esculin, 6''-O-acetyldaidzin and 3'-O-methylviolanone), indicating that the produced enzymes can catalyze these reactions. However, it is worth mentioning the presence of PC previously reported in fruits and plants, such as irisolidone, schisandrin C, jaceosidin, and which were possibly synthesized by the microorganism (Han et al., 2018; Kang et al., 2008; Nowak et al., 2019). A dimer of caffeic acid (salvianolic acid D) was also exclusive to fermented samples.

The changes after SSF also can be observed in Fig. 8B, since PC1 and PC2 explained 89% of the total variance observed on each sample. In this case, the BSG are closer related and occupy the same quadrant (lower right). After SSF, the phenolic profile seems to differ between the three BSGs, indicated by the distribution of scores in three different quadrants. Although the literature reports that the phenolic content of BSG depends on the type of malt used (Ikram et al., 2017), for the first time it is shown that the difference between malts also impacts fermentation. It can also be observed in the number of identifications (Fig. 7C). While free PCs increased after BSG fermentation (Pilsen: 103%; IPA: 78%; and Witbier: 68%), the bound extract seems to be more influenced by the type of malt, leading to a reduction of 82% and 10% in Pilsen and Witbier, respectively, and increase of 4% increase in IPA. Contrary to the results found for non-fermented BSG, in SSF samples the ratio bound to free was very dissimilar between the malt types and strongly decreased (0.2; 1.3 and 1, for Pilsen, IPA and Witbier respectively).

According to the literature, the increase and reduction in free and bound PC, respectively, is directly related to the enzyme β -glucosidase, which hydrolyzes b-glucosidic bonds between the hydroxyl group of PC and sugars in the matrix (Georgetti et al., 2009). However, Rashid et al. (2019) suggested that the activity of glucosidase would be able to catalyze the hydrolysis of β -glucoside bonds, resulting in large amounts of free phenolic activities and phenolic polymerization activities, generating phenolic degradation. This behavior was observed in the present study with Pilsen BSG after SSF, which although has released compounds, reduced in 16% the number of PC identified.

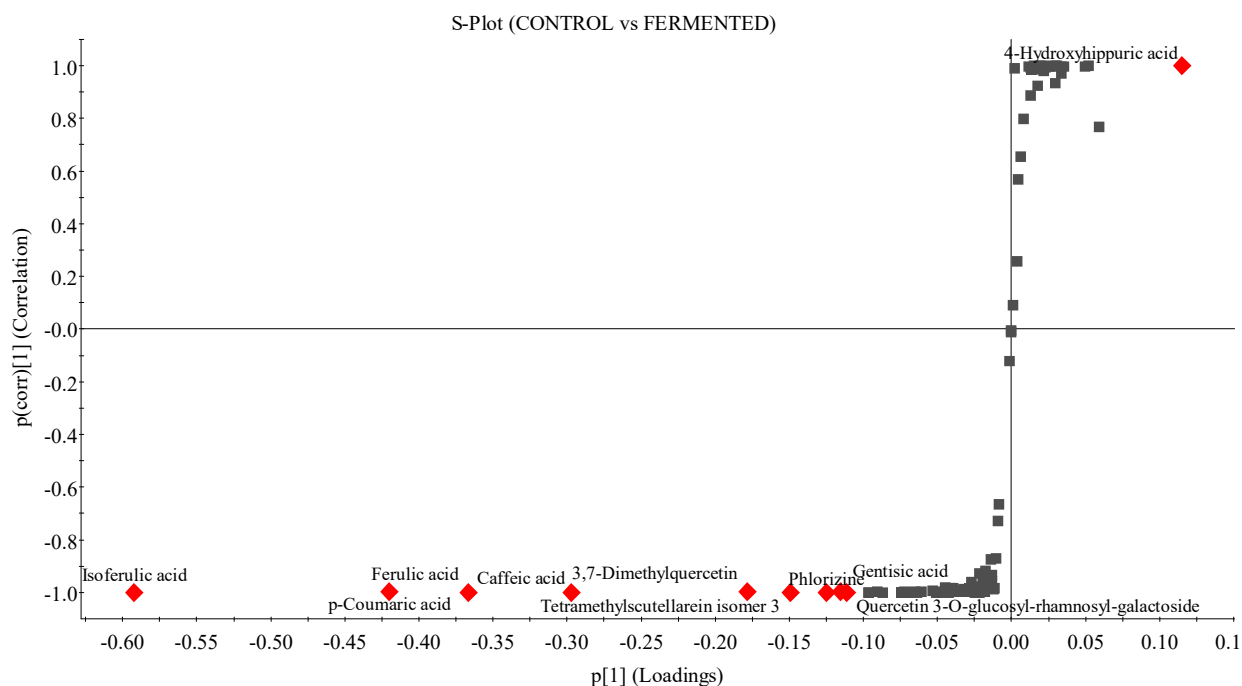


Fig. 9: Changes in brewer's spent grain (BSG) after solid state fermentation (SSF) by untargeted metabolomic. S-plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of BSG vs SSF samples. The x variable is the relative magnitude of loadings (phenolic compounds), and the y variable is the variable confidence/reliability (p). Variables farthest from the origin in the plot are considered significant markers of BSG (lower square) and SSF samples (upper square).

PC were also relatively quantified through total ion abundance (Fig. 7D). Unlike the number of identifications, the total abundance showed a 50% reduction after fermentation. This indicates that although SSF is effective in releasing phenolic compounds and increases its variety in the sample, the total abundance may decrease (Supplementary Fig.). This behavior can be mainly attributed to HCAs and their metabolites (ferulic acid, trans-ferulic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, dihydroferulic acid and dihydrocaffeic acid) since they contributed with 77% of this reduction. This result can be explained by the fact that the bioprocess with yeasts or/and fungi (such as *A. oryzae*) in cereals and legumes favors cinnamate carboxy-lyase activity, enzymatic activity able to transform HCAs into their derivatives through the release of CO₂ (Verni, Verardo, & Rizzello, 2019). Another hypothesis is related to a possible degradation caused by the ultrasound-assisted process during 30 min. The SSF together with the ultrasound increase the release of free phenolics (monomeric or soluble compounds) into the solution, thus these compounds would be more exposed to the degradation caused by the sonochemical reactions, such as free radical generation,

polymerization/depolymerisation, and the reactions depend on the phenolic composition of the samples (Das, Goud, & Das, 2017).

HCAs abundance changes can be seen by orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA), a multivariate analysis to characterize the similarities and dissimilarities in the PC profile of BSG and SSF samples, irrespective of extracts. The S-plot graphs (Fig. 9) shows the distance between the variables and the contribution of PC in opposite quadrants to differentiate samples. A total of 10 PC were selected based on the variable importance projection (VIP) and p value of the OPLS-DA model (Leyva-Corral et al., 2016). The four PC that most contribute to the characterization was HCAs (ferulic acid, trans-ferulic acid, p-coumaric acid and caffeic acid), while the only compound selected by the fermented BSG VIP was 4-hydroxyhippuric acid, present in abundance in fermented extracts. This compound is a low molecular weight aromatic acid resulted from the metabolism of naringenin (in this study, present mainly in bound extracts) through glycation and β -oxidation. In addition, 4-hydroxyhippuric acid can be derived from sources other than polyphenols, such as aromatic amino acids (Orrego-Lagarón, Martínez-Huélamo, Vallverdú-Queralt, Lamuela-Raventós, & Escribano-Ferrer, 2015). *A. oryzae* appears to induce this compound metabolism, but the pathway remains unknown.

4. Conclusion

The SSF of different types of BSG with *A. oryzae* proved to be efficient in the release of antioxidant bioactive compounds especially the PC previously found bound to cell matrix. The comprehensive analysis of compounds was important to indicate possible biotransformation during the fermentation process leading to the identification of exclusive compounds after fermentation of BSG, data never before reported in the literature. Although the complexity of phenolic profile has been improved after fermentation, the total abundance of compounds was decreased about 50%, especially due to the enzymatic action or degradation of HCA into their derivatives. The present work opens many perspectives of research, among them, to evaluate if, despite having shown similar results for phenolic content (TPC) and antioxidant activity against DPPH for 2 fungi, the compounds released from BSG would have the same profile as *A. terreus* depending on the enzymatic set of each fungus be different. The type of malt seems also to influence the fermentation process, since different BSG were quite similar, but extremely different after fermentation. Further

investigation is required to optimize fermentation process and to associate other techniques of extraction of these compounds of interest.

Conflicts of interest

The Authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank UNIRIO, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (26/010.000171/2016; 26/010.100988/2018; 26/202/709-2018) for the financial support and the Allegra Craft beer that kindly donated the samples.

CONCLUSÃO GERAL

Muito tem se estudado sobre valorização de subprodutos agroindustriais; e o bagaço de malte apresenta-se como uma importante fonte de compostos bioativos, e seu alto volume gerado tem despertado crescente interesse. Neste estudo, foi utilizado o processo de fermentação em estado sólido com o objetivo de potencializar a liberação destes compostos. Sabe-se que os tecidos periféricos dos cereais (farelos e cascas) são ricos em compostos fenólicos e o bagaço de malte (geralmente de cevada) é composto principalmente desta matriz lignocelulósica, já que o amido do grão foi retirado na brassagem e será um dos principais constituintes na produção da cerveja.

Porém esses compostos estão presentes nestes envelopes externos de cereais principalmente na sua forma ligada, e a liberação desses compostos é interessante para potencializar a bioacessibilidade, ou seja, torná-los mais facilmente absorvíveis pelo organismo humano.

A partir dos resultados deste trabalho, foi demonstrado que a fermentação em estado sólido é uma técnica eficiente de liberação de compostos fenólicos antioxidantes, e que o período de pelo menos 3 dias de fermentação já seria suficiente para potencializar esta ação antioxidante em pelo menos 5 vezes.

A utilização da abordagem metabolômica foi essencial para traçar o perfil de compostos e revelou 102 compostos fenólicos que foram tentativamente identificados. O tipo de malte teve grande influência na composição fenólica e foram demonstrados pela primeira vez compostos exclusivos nos bagaços antes e após a fermentação, esses dados sugerem uma biotransformação de compostos e não só sua liberação da matriz. Os ácidos hidroxicinâmicos, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico foram os mais abundantes tanto nos bagaços fermentados como os não fermentados. Porém, a redução da abundância nos bagaços fermentados aponta para uma possível degradação de compostos mais sensíveis à extração, o que sugere que são necessários estudos de otimização das técnicas de extração.

As perspectivas futuras apontam para a otimização da fermentação em estado sólido com seleção de microrganismos mais eficientes e do melhor tempo de fermentação, assim como de técnicas de extração com melhor performance, a fim de potencializar a recuperação e estabilidade de compostos bioativos com vistas a futuras utilizações na indústria.

REFERENCIAS

Uncategorized References

- Abd Razak, D. L., Abd Rashid, N. Y., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A., & Long, K. (2015). Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 33-38.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- Acosta-Estrada, B. A., Villela-Castrejón, J., Perez-Carrillo, E., Gómez-Sánchez, C. E., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2019). Effects of solid-state fungi fermentation on phenolic content, antioxidant properties and fiber composition of lime cooked maize by-product (nejayote). *Journal of Cereal Science*, 90, 102837.
- Albanese, L., Ciriminna, R., Meneguzzo, F., & Pagliaro, M. (2017). Beer-brewing powered by controlled hydrodynamic cavitation: Theory and real-scale experiments. *Journal of Cleaner Production*, 142, 1457-1470.
- Almeida, A. d. R., Geraldo, M. R. F., Ribeiro, L. F., Silva, M. V., Maciel, M. V. d. O. B., & Haminiuk, C. W. I. (2017). Bioactive compounds from brewer's spent grain: phenolic compounds, fatty acids and in vitro antioxidant capacity. *Acta Scientiarum. Technology (UEM)*, 39(3), 269.
- Amorim, C., Silvério, S. C., & Rodrigues, L. R. (2019). One- step process for producing prebiotic arabino- xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma* species. *Food Chemistry*, 270, 86-94.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods-a brief review. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 66(1), 01-09.
- Barbosa-Pereira, L., Pocheville, A., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J. M. (2013). Fractionation and Purification of Bioactive Compounds Obtained from a Brewery Waste Stream. *BioMed Research International*, 2013.
- Bei, Q., Liu, Y., Wang, L., Chen, G., & Wu, Z. (2017). Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 32, 185-194.
- Bento-Silva, A., Vaz Patto, M. C., & do Rosário Bronze, M. (2018). Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chemistry*, 246, 360-378.

- Bhanja Dey, T., & Kuhad, R. C. (2014). Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with RCK2012. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 4(1), 120.
- Bijttebier, S., Van Der Auwera, A., Foubert, K., Voorspoels, S., Pieters, L., & Apers, S. (2016). Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. *Analytica Chimica Acta*, 935, 136-150.
- Borges, G. d. S. C. (2013). Determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Cultivados no Estado de Santa Catarina.
- Boz, H. (2015). p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(11), 2323-2328.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- BRASIL, G. F. (2010). Lei nº 12.305, DE 2 de agosto de 2010. *Diário Oficial da União*, 2.
- Cappa, C., & Alamprese, C. (2017). Brewer's spent grain valorization in fiber-enriched fresh egg pasta production: Modelling and optimization study. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 464-470.
- Carvalho, D., Gonçalves, L., & Guido, L. (2016). Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process: Overall antioxidant properties of malt.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15.
- Cooray, S. T., & Chen, W. N. (2018). Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42, 85-94.
- Couto, Sr., & Sanroman, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- Crowley, D. J., O'Callaghan, Y. C., McCarthy, A. L., Connolly, A., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2015). Effect of Brewers' spent grain (BSG) phenolic extracts on cell viability and protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells. 74(OCE4).
- Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling. *Industrial Crops & Products*, 95, 332-341.

- Dvořáková, M., Guido, L. F., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M. M., & Barros, A. A. (2008). Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 27-33.
- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210-230.
- Georgetti, S., Vicentini, F., Yokoyama, C. Y., Borin, M., Spadaro, A. C. C., & Fonseca, M. (2009). Enhanced in vitro and in vivo antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. *Journal of applied microbiology*, 106, 459-466.
- Ghoshal, G., Basu, S., & Shivhare, U. (2012). Solid State Fermentation in Food Processing. *International Journal Of Food Engineering*, 8(3).
- Gonçalves, E. C. B. A., Lozano-Sanchez, J., Gomes, S., Ferreira, M. S. L., Cameron, L. C., & Segura-Carretero, A. (2018). Byproduct Generated During the Elaboration Process of Isotonic Beverage as a Natural Source of Bioactive Compounds. *Journal of Food Science*, 83(10), 2478-2488.
- Gupta, S., Lee, J. J. L., & Chen, W. N. (2018). Analysis of Improved Nutritional Composition of Potential Functional Food (Okara) after Probiotic Solid- State Fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(21), 5373.
- Han, H.-Y., Kim, H., Jeong, S.-H., Kim, J., Jeong, S.-H., Kim, G., . . . Ryu, M. H. (2018). The Flavonoid Jaceosidin from *Artemisia princeps* Induces Apoptotic Cell Death and Inhibits the Akt Pathway in Oral Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-9.
- Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid- state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 301-306.
- Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain: Composition and preservation of BSG.... *Journal of Food Science*, 82.
- Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Biliaderis, C. G., & Papadoyannis, I. N. (2012). Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 134(3), 1624-1632.
- Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1), 1-25.

- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Marti, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, *182*, 282-291.
- Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Ko, D. O., Wang, Z. H., Kim, B. J., . . . Hyun, J. W. (2008). Protective effect of irisolidone, a metabolite of kakkalide, against hydrogen peroxide induced cell damage via antioxidant effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(3), 1133-1141.
- Kaprelyants, L. (2017). Xylooligosaccharides from agricultural by-products: characterisation, production and physiological effects. *Food Science & Technology (2073-8684)*, *11*(3), 25-35.
- Ktenioudaki, A., Crofton, E., Scannell, A. G. M., Hannon, J. A., Kilcawley, K. N., & Gallagher, E. (2013). Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, *57*(3), 384-390.
- Lange, L., & Meyer, A. S. (2018). Potentials and possible safety issues of using biorefinery products in food value chains. *Trends in Food Science & Technology*.
- Leyva-Corral, J., Quintero-Ramos, A., Camacho-Dávila, A., de Jesús Zazueta-Morales, J., Aguilar-Palazuelos, E., Ruiz-Gutiérrez, M. G., . . . de Jesús Ruiz-Anchondo, T. (2016). Polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace in an extruded cereal. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 228-236.
- Lio, J., & Wang, T. (2012). Solid- state fermentation of soybean and corn processing coproducts for potential feed improvement. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(31), 7702.
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H., Ascacio-Valdés, J., Aguilar-Gonzalez, M., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2017). *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, *257*, 110.
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health (Vol. 122, pp. 553-568).
- Maldaner, L., & Jardim, I. (2012). UHPLC—Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, *4*(3), 197-207.
- Mallen, E., & Najdanovic-Visak, V. (2018). Brewers' spent grains: Drying kinetics and biodiesel production. *Bioresource Technology Reports*, *1*, 16-23.

- Marcusso, E. F., & Müller, C. V. (2020). Anuário da cerveja no Brasil 2019: Crescimento e inovação. Recuperado de <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-no-brasil-2019/view>.
- Martini, D. A.-O. X., Chiavaroli, L. A.-O., González-Sarrías, A. A.-O., Bresciani, L., Palma-Duran, S. A.-O., Dall'Asta, M., . . . Mena, P. A.-O. (2019). Impact of Foods and Dietary Supplements Containing Hydroxycinnamic Acids on Cardiometabolic Biomarkers: A Systematic Review to Explore Inter-Individual Variability. *Nutrients*, *11*, 1805.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, *29*(3), 365-373.
- McCarthy, A. L., O' Callaghan, Y. C., Connolly, A., Piggott, C. O., Fitzgerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2014). Phenolic-enriched fractions from brewers' spent grain possess cellular antioxidant and immunomodulatory effects in cell culture model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(7), 1373-1379.
- McCarthy, A. L., O'callaghan, Y. C., Neugart, S., Piggott, C. O., Connolly, A., Jansen, M. A. K., . . . O'brien, N. M. (2013). The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. *Food Chemistry*, *141*(3), 2567-2574.
- Moreira, M. M., Morais, S., Carvalho, D. O., Barros, A. A., Delerue-Matos, C., & Guido, L. F. (2013). Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International*, *54*(1), 382-388.
- Moura-Nunes, N., Brito, T. C., Fonseca, N. D. D., de Aguiar, P. F., Monteiro, M., Perrone, D., & Torres, A. G. (2016). Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *199*, 105-113.
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(7), 1264-1275.
- Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C., & Ghiselli, A. (2006). Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *17*(1), 14-22.

- Nocente, F., Taddei, F., Galassi, E., & Gazza, L. (2019). Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential. *LWT*, 114.
- Nowak, A., Zakłós-Szyda, M., Błasiak, J., Nowak, A., Zhang, Z., & Zhang, B. (2019). Potential of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. in Human Health and Nutrition: A Review of Current Knowledge and Therapeutic Perspectives. *Nutrients*, 11(2), 333.
- Oliveira, M. D. S., Cicolatti, E. P., Furlong, E. B., & Soares, L. d. S. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity in fermented rice (*Oryza sativa*) bran. *Food Science and Technology*, 32(3), 531-537.
- Orrego-Lagarón, N., Martínez-Huélamo, M., Vallverdú-Queralt, A., Lamuela-Raventós, R. M., & Escribano-Ferrer, E. (2015). High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: Influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism. *The British journal of nutrition*, 114, 1-12.
- Quirós-Sauceda, A., Ayala-Zavala, J., Olivas, G., & González-Aguilar, G. (2014). Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1674-1685.
- Rashid, N. Y. A., Jamaluddin, A., Ghani, A. A., Razak, D. A., Jonit, J., Mansor, A., & Manan, M. (2019). Quantification of phenolic compounds changes by *Aspergillus oryzae* on rice bran fermentation. *Food Research*, 3, 133-137.
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 58-69.
- Reis, S. F., Coelho, E., Coimbra, M. A., & Abu-Ghannam, N. (2015). Influence of grain particle sizes on the structure of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 130, 222-226.
- Rommi, K., Niemi, P., Kemppainen, K., & Kruus, K. (2018). Impact of thermochemical pre-treatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, 79, 168-173.
- Sá Mendes, N. d., Coimbra, P. P. S., Santos, M. C. B., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L., Buera, M. D. P., & Gonçalves, É. C. B. A. (2020). *Capsicum pubescens* as a functional ingredient: Microencapsulation and phenolic profiling by UPLC-MSE. *Food Research International*, 135.
- Sant'Anna, V., Gurak, P. D., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods—A review. *Dyes and Pigments*, 98(3), 601-608.

- Santos, M. C. B., Lima, L. R. d. S., Nascimento, F. R., Nascimento, T. P., Cameron, L. C., & Ferreira, M. S. L. (2019). Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. *Food Research International*, *124*, 118-128.
- Shin, H.-Y., Kim, S.-M., Lee, J. H., & Lim, S.-T. (2019). Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chemistry*, *272*, 235-241.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152-178.
- Socaci, S. A., Fărcaș, A. C., Diaconeasa, Z. M., Vodnar, D. C., Rusu, B., & Tofană, M. (2018). Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, *80*, 180-187.
- Spinelli, S., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2016). Microencapsulation of extracted bioactive compounds from brewer's spent grain to enrich fish-burgers. *Food and Bioproducts Processing*, *100*, 450-456.
- Stefanello, F. S., Dos Santos, C. O., Bochi, V. C., Fruet, A. P. B., Soquetta, M. B., Dörr, A. C., & Nörnberg, J. L. (2018). Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. *Food Chemistry*, *239*, 385-401.
- Stojceska, V., & Ainsworth, P. (2008). The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads. *Food Chemistry*, *110*(4), 865-872.
- Szwajgier, D., Waško, A., Targoński, Z., Niedźwiadek, M., & Bancarzewska, M. (2010). Use of a Novel Ferulic Acid Esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the Release of Phenolic Acids from Brewer's Spent Grain. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(3), 293-303.
- Verni, M., Verardo, V., & Rizzello, C. G. (2019). How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. *Foods*, *8*(9).
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. *Waste and Biomass Valorization*, *3*(2), 213-232.
- Yamamoto, H., Fujimori, T., Sato, H., Ishikawa, G., Kami, K., & Ohashi, Y. (2014). Statistical hypothesis testing of factor loading in principal component analysis and its application to metabolite set enrichment analysis. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 51.

Zuorro, A., Lannone, A., & Lavecchia, R. (2019). Water–Organic Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Brewers’ Spent Grain. *Processes*, 7(3), 126.

APÊNDICES

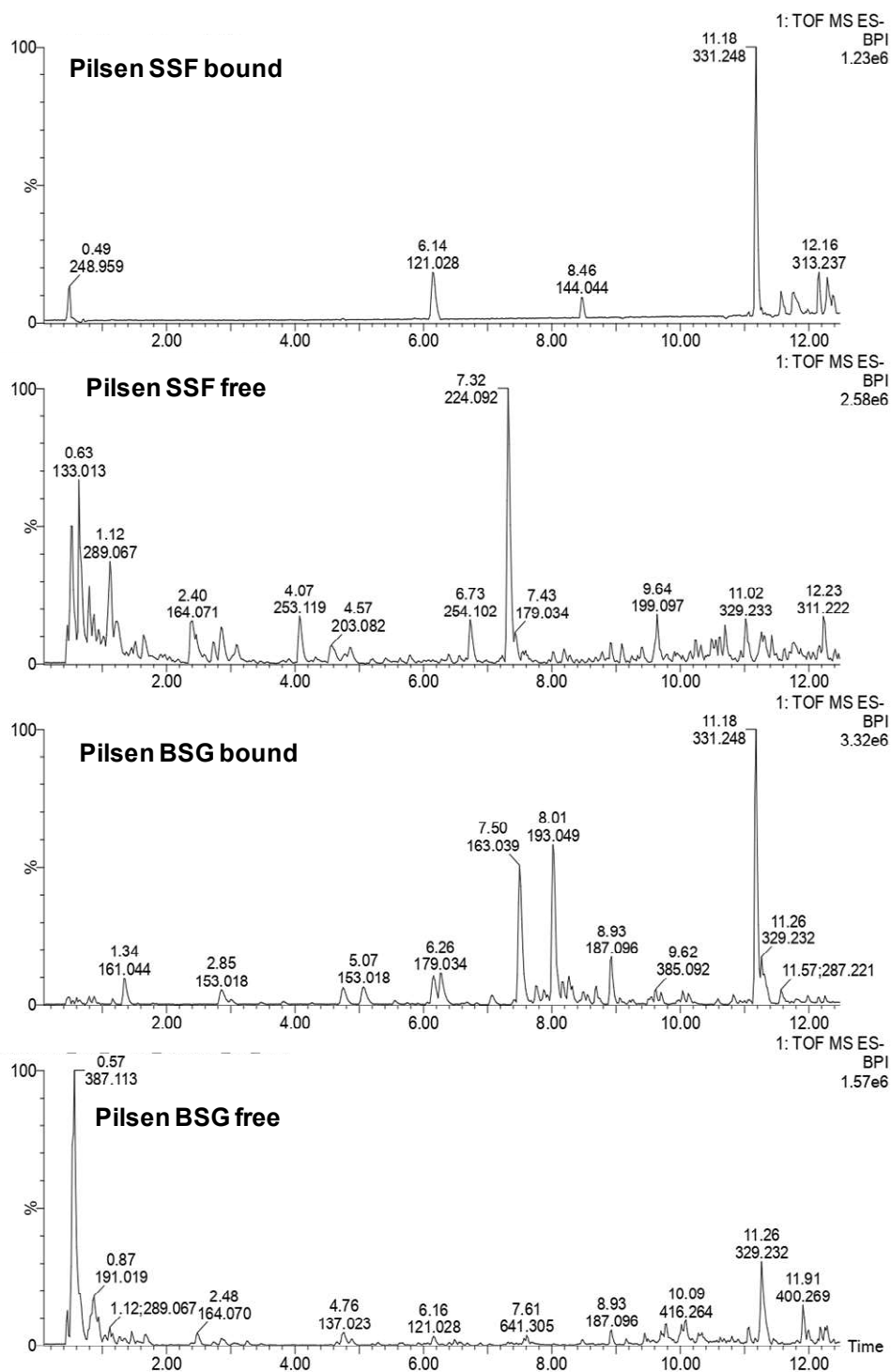


Fig.10: Fig. supplementary. *MS-Base peak chromatograms (BPI) of each Pilsen extract. SSF: solid-state fermentation; and BSG: brewers' spent grain.* The x-axis represents the retention time and the y-axis represents the intensity of the peaks.

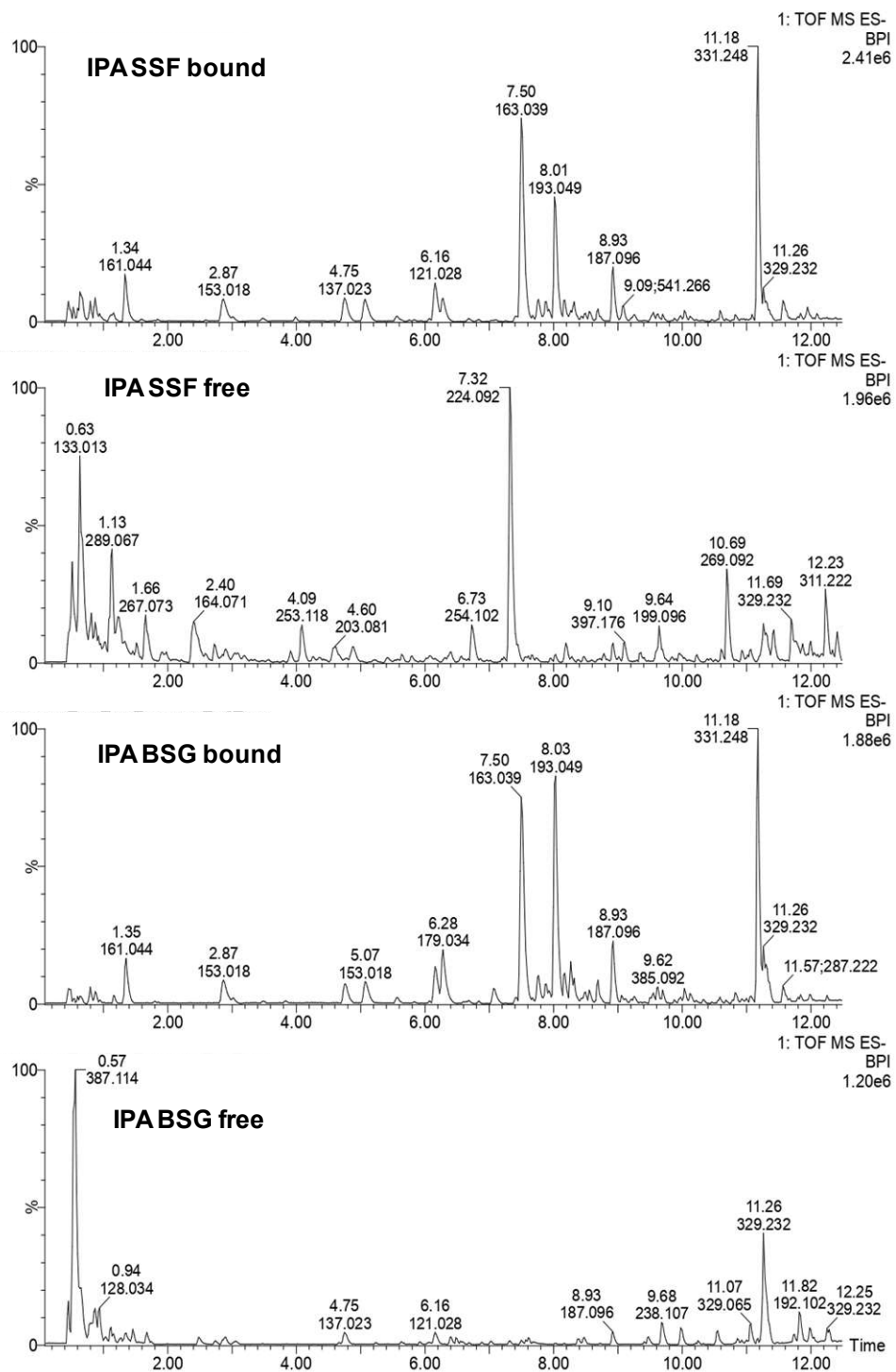


Fig.11: Fig. supplementary. *MS-Base peak chromatograms (BPI) of each IPA extract. SSF: solid-state fermentation; and BSG: brewers' spent grain.* The x-axis represents the retention time and the y-axis represents the intensity of the peaks.

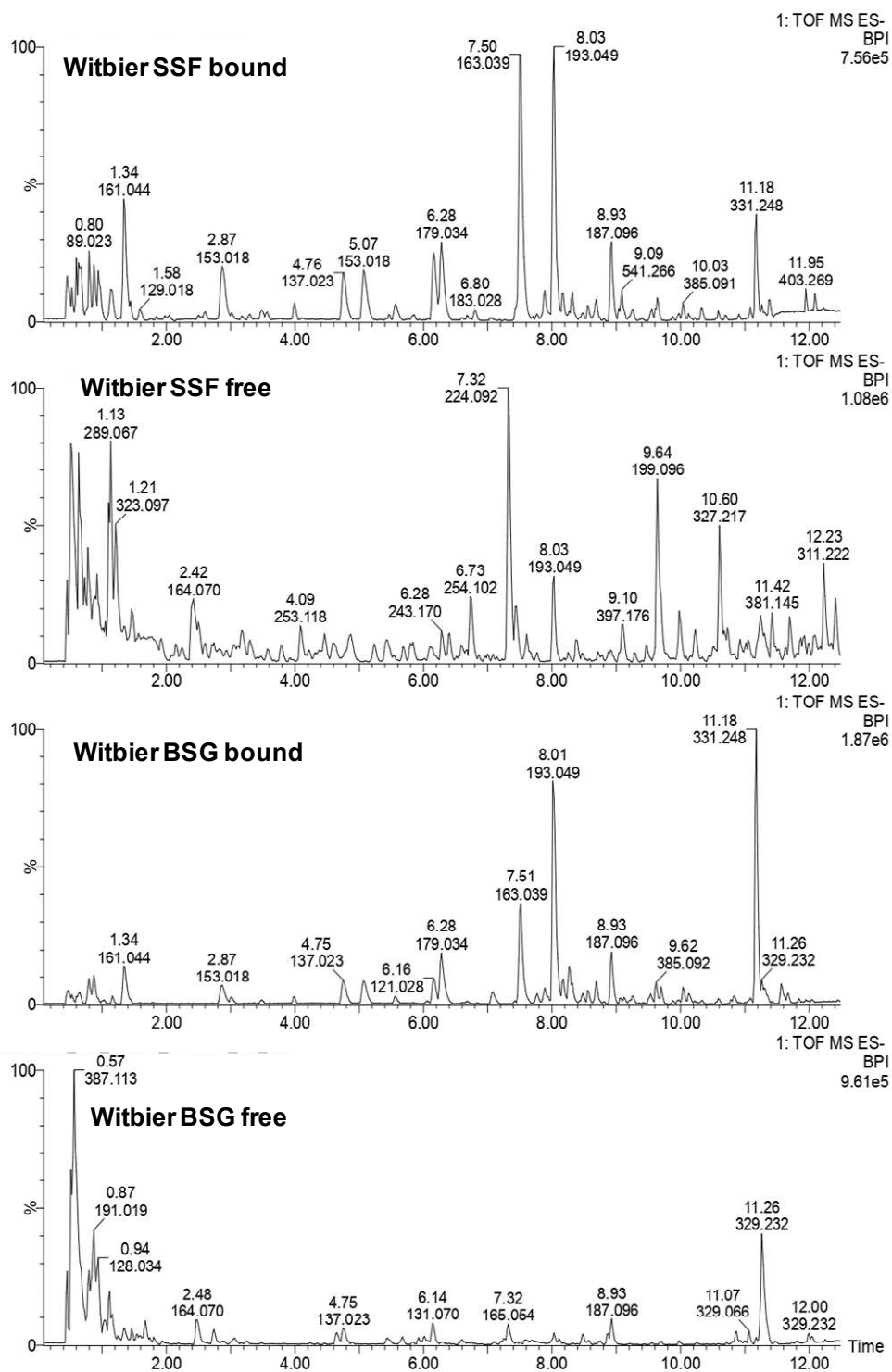


Fig.12: Fig. supplementary. MS-Base peak chromatograms (BPI) of each Witbier extract. SSF: solid-state fermentation; and BSG: brewers' spent grain. The x-axis represents the retention time and the y-axis represents the intensity of the peaks.

