

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO

ALINE RUTH SCHMIDT

PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE MALTE CERVEJEIRO COM ÁCIDO
OXÁLICO PARA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE E OBTENÇÃO DE
XILITOL E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

LARANJEIRAS DO SUL

2023

ALINE RUTH SCHMIDT

**PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE MALTE CERVEJEIRO COM ÁCIDO
OXÁLICO PARA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE E OBTENÇÃO DE
XILITOL E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS**

Dissertação apresentada para o programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Bender

Coorientador: Prof. Dr. Sergio L. Alves Júnior

LARANJEIRAS DO SUL

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Schmidt, Aline Ruth
PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE MALTE CERVEJEIRO COM
ÁCIDO OXÁLICO PARA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE E
OBTENÇÃO DE XILITOL E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS /
Aline Ruth Schmidt. -- 2023.
93 f.:il.

Orientador: Doutor João Paulo Bender
Co-orientador: Doutor Sérgio Luiz Alves Júnior
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. Biomassa. 2. Biorrefinaria. I. Bender, João Paulo,
orient. II. Júnior, Sérgio Luiz Alves, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.


ALINE RUTH SCHMIDT

**PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE MALTE CERVEJEIRO COM ÁCIDO
OXÁLICO PARA SOLUBILIZAÇÃO DE HEMICELULOSE E OBTENÇÃO
DE XILITOL E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 23/08/2023.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JOAO PAULO BENDER**
Data: 23/08/2023 18:57:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS
Presidente/Orientador

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR**
Data: 23/08/2023 19:15:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS
Coorientador

Documento assinado digitalmente
 **HELEN TREICHEL**
Data: 24/08/2023 05:30:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Helen Treichel – UFFS
1º Membro

Documento assinado digitalmente
 **DEBORA TRICHEZ**
Data: 24/08/2023 07:45:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Débora Trichez – UFSC
2º Membro

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME MARTINEZ MIBIELLI**
Data: 24/08/2023 10:10:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli – UFFS
Suplente

Dedico este trabalho ao meu pai, José Ruth
Schmidt (em memória), e ao meu marido,
Bruno Ribeiro, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à Universidade Federal da Fronteira Sul e a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram durante esses dois anos de muito estudo, dedicação e trabalho. Não será possível citar todos aqui, mas quero que saibam que sou grata e jamais esquecerei de quem esteve do meu lado.

Em especial, muito obrigada a meus orientadores, Prof. Dr. João Paulo Bender e Prof. Dr. Sérgio L. Alves Júnior, que aceitaram a árdua tarefa de lidar comigo e me guiar durante o processo de pesquisa. Obrigada por não desistirem de mim mesmo quando eu mesma estava prestes a isso (risos). Aprendi muito durante este período de convivência, e àqueles que tem a oportunidade de trabalhar junto com estes dois pesquisadores, eu digo: não deixem a oportunidade escapar! Estendo meus agradecimentos ao Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli, sempre presente no laboratório de Resíduos Sólidos, e que, apesar de não ser meu orientador, foi fundamental durante toda essa jornada. Não poderia deixar de reverenciar a Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel, uma inspiração para todas nós, mulheres pesquisadoras, pela parceria durante o último semestre e a oportunidade dada a mim para que publicássemos juntas. MUITO obrigada!

E como não mencionar ela, minha xará, companheira de laboratório, de cafés, de crises existenciais, risadas, trocas de dicas de *skincare*, fofocas, cafés e publicações científicas, Aline Perin Dresch. Fico em dúvida se trocamos mais links de memes ou DOI de artigos, mas amizades funcionam neste equilíbrio caótico mesmo. Quando lhe conheci, no início de 2022, não imaginei que criaríamos um vínculo tão forte, e sem sua participação certamente tudo teria sido mais difícil (e mais triste). Obrigada por tudo, “Aline 1”.

Agradeço a todos os técnicos do setor de laboratórios dos Campus Chapecó e Erechim, que sempre estiveram disponíveis para ajudar no que foi preciso. Obrigada a todos os estagiários e alunos de Iniciação Científica dos laboratórios de Resíduos Sólidos (LABRES) e de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), que me auxiliaram na execução de ensaios e, por várias vezes, testemunharam surtos na resolução de perrengues rotineiros durante pesquisas científicas.

E como esta pesquisa sairia do papel sem a matéria-prima? Agradeço à Basáltica Cervejaria Experimental, em especial ao Kurt Bourscheid, que não pensou duas vezes em ceder o bagaço de malte para a execução dos ensaios. Sem esta contribuição o projeto, literalmente, não seria possível.

Por último, mas nunca menos importantes, agradeço a minha família, que compreendeu minhas ausências e me apoiou incondicionalmente durante este processo. Mãe, pai (*“Um pedacinho do meu coração é seu...”*), mana, Vande e Júlia, amo vocês! E meus companheiros mais próximos, aqueles com quem compartilhei cada descoberta, cada sucesso, cada fracasso: meu marido, Bruno, e meus gatos (sim, eles merecem esta citação), Valentina, Ziggy (foi duro demais te perder durante o mestrado, meu guerreirinho) e Jolie. Vocês são meu porto seguro, e esta conquista é tão de vocês quanto minha.

APRESENTAÇÃO

Em concordância com o regimento do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, esta dissertação será dividida em dois capítulos. O Capítulo I contempla um artigo de revisão onde é apresentado o estado da arte com relação ao reaproveitamento do bagaço de malte cervejeiro em processos biotecnológicos, enquanto no Capítulo II são apresentadas as metodologias e resultados obtidos ao longo da pesquisa. Sendo assim, a dissertação ficou estruturada da seguinte forma:

CAPÍTULO I:

Artigo de Revisão. SCHMIDT, A.R.; DRESCH, A.P.; ALVES JUNIOR, S.L.; BENDER, J.P.; TREICHEL, H. "Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention". **Catalysts** 13, nº. 4: 755. Abril, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal13040755>

CAPÍTULO 2: Relação dos materiais e métodos utilizados, bem como resultados e discussões referentes aos dados coletados durante a execução do projeto.

RESUMO

A biomassa lignocelulósica de diversos vegetais vem sendo estudada nas últimas décadas como matriz renovável para a obtenção de fontes de energia ecologicamente sustentáveis, como o etanol de segunda geração (2G), além de produtos com valor agregado, impulsionando a implementação de uma economia circular. O bagaço de malte é produzido em grandes quantidades pela indústria cervejeira, sendo uma matéria-prima de baixo custo, com disponibilidade independente da sazonalidade, rica em carboidratos estruturais, como glicose e xilose, que por meio de processos tecnológicos pode ser industrializado e reinserido na economia. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo obter etanol, xilitol e compostos orgânicos voláteis a partir da fermentação de um hidrolisado rico em pentoses proveniente do pré-tratamento ácido do bagaço de malte. Para tal, foram conduzidos uma série de ensaios de hidrólise com ácido oxálico, sendo que o melhor resultado foi obtido com 4,5 % de catalisador e 24 minutos de reação, em autoclave, a 125,6 °C, com solubilização de mais de 99 % da hemicelulose e concentração de 14,9 g/L de xilose na fração líquida. O hidrolisado advindo da etapa de pré-tratamento foi, então, submetido a fermentação por três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo uma industrial (PE-2), e duas geneticamente modificadas para permitir a produção de etanol a partir de xilose e aumentar a tolerância a substâncias inibidoras de fermentação (MP-P5 e JDY-01). Os ensaios foram conduzidos através de um delineamento composto central rotacional a fim de avaliar o efeito da temperatura de fermentação e pH do hidrolisado no consumo de carboidratos, formação de xilitol, etanol e compostos orgânicos voláteis pelas três linhagens. Ao final dos experimentos, percebeu-se um efeito inibitório exercido pela quantidade acentuada de ácido oxálico, ou oxalato, sua base conjugada, presente nos hidrolisados (cerca de 45 g/L) proveniente do pré-tratamento. Como resultado, não foi possível constatar acúmulo de xilitol em nenhum ensaio, e o experimento F12 (pH 3,0 e 20 °C), com a linhagem MP-P5, foi o único a apresentar produção de etanol, com 1,76 g/L gerados a partir do consumo de toda a glicose e uma parte da xilose presente no meio. Mesmo assim, foi possível identificar a produção de alguns compostos orgânicos voláteis por parte das leveduras, com destaque para o álcool fenético, álcool superior com aroma de rosas e mel que possui propriedades antimicrobianas e antifúngicas, e 4-Hydroxy-2-methylacetophenone, composto fenólico com importantes propriedades antioxidantes, antitumorais, analgésicas e antissépticas, que apareceram de forma contundente nos cromatogramas, com área de pico de, em média, 4 % e 45 %, respectivamente, e com potencial

para recuperação. Além disso, o ensaio F26 (pH 9,0 e 40 °C), onde foi utilizada a linhagem JDY-01, apresentou acumulação de ácido linoleico com área de pico correspondente a 44 %, o que possibilitaria sua recuperação. O bagaço de malte, portanto, se mostrou adequado para aproveitamento em biorrefinarias, e, com os processos adequados, pode se tornar peça-chave na implementação de uma economia circular.

Palavras-chave: oxalato, fermentação, *VOCs*, economia circular.

ABSTRACT

The lignocellulosic biomass of various plants has been studied in recent decades as a renewable matrix for obtaining ecologically sustainable energy sources, such as second-generation ethanol (2G) and value-added products, driving the implementation of a circular economy. Brewer's spent grain (BSG) is produced in large quantities by the brewing industry, is a low-cost raw material, with availability independent of seasonality, rich in structural carbohydrates, such as glucose and xylose, which through technological processes can be industrialized and reinserted into the economy. Thus, the present work aimed to obtain ethanol, xylitol and volatile organic compounds from the fermentation of a hydrolyzate rich in pentoses from the acid pre-treatment of malt bagasse. To this end, a series of hydrolysis tests with oxalic acid were conducted, with the best result being obtained with 4.5% catalyst and 24 minutes of reaction, in an autoclave, at 125.6 °C, with solubilization of more than 99% of hemicellulose and concentration of 14.9 g/L of xylose in the liquid fraction. The hydrolyzate from the pre-treatment step was then subjected to fermentation by three strains of *Saccharomyces cerevisiae*, one industrial (PE-2), and two genetically modified to allow the production of ethanol from xylose and increase tolerance to fermentation-inhibiting substances (MP-P5 and JDY-01). The analyses were conducted using a rotational central composite design to evaluate the effect of fermentation temperature and pH of the hydrolyzate on carbohydrate intake, xylitol, ethanol and volatile organic compound formation by the three strains. At the end of the experiments, an inhibitory effect exerted by the accentuated amount of oxalic acid, or oxalate, its conjugate base, present in the hydrolysates (about 45 g/L) from the pre-treatment was noticed. As a result, it was not possible to verify the accumulation of xylitol in any test, and the F12 experiment (pH 3.0 and 20 °C), with the MP-P5 strain, was the only one to present ethanol production, with 1.76 g /L generated from the consumption of all the glucose and a part of the xylose present in the medium. Even so, it was possible to identify the production of some volatile organic compounds by the yeasts, with emphasis on phenethyl alcohol, superior alcohol with a rose and honey aroma that has antimicrobial and antifungal properties, and 4-Hydroxy-2-methylacetophenone, a compound phenolic acid with important antioxidant, antitumor, analgesic and antiseptic properties, which strongly appeared in the chromatograms, with a peak area of, on average, 4% and 45%, respectively, and with potential for recovery. In addition, the F26 test (pH 9.0 and 40 °C), where the JDY-01 strain was used, showed an accumulation of linoleic acid with a peak area corresponding to 44%, which would allow its recovery. BSG, therefore, proved to be suitable

for use in biorefineries, and with the proper techniques, it can become a vital part of implementing a circular economy.

Keywords: oxalate, fermentation, VOCs, circular economy.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema geral das atividades desenvolvidas ao longo do projeto de pesquisa. | 43 |
| Figura 2 - Resultado dos ensaios preliminares de pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (AS1) e ácido oxálico nas concentrações 3 % (AO3), 4 % (AO4) e 5 % (AO5), com relação à concentração de xilose (barra com contorno laranja), glicose (barra com contorno lilás), furfural (linha azul) e 5-hidroximetilfurfural (linha verde). Barras que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$) com relação à concentração de xilose..... | 57 |
| Figura 3 - Porcentagem de solubilização dos componentes hemicelulose (barra com contorno azul), celulose (barra com contorno verde) e lignina (barra com contorno laranja) após os diferentes pré-tratamentos (PE1 – 3,8 % de ácido oxálico (AO) e 40 minutos de reação (min.); PE2 – 5,2 % AO e 40 min.; PE3 – 3,8 % AO e 120 min.; PE4 – 5,2 % AO e 120 min.; PE5 – 4,5 % AO e 80 min.; PE6 – 3,5 % AO e 80 min.; PE7 – 5,5 % AO e 80 min.; PE8 – 4,5 % AO e 40 min.; PE9 – 4,5 % AO e 136 min)..... | 59 |
| Figura 4 - Resultados da cinética de pré-tratamento do bagaço de malte utilizando 4,5 % de ácido oxálico com relação a concentração de xilose (linha roxa) e furfural (linha laranja)..... | 61 |
| Figura 5 – Resultado do ensaio F12 com relação à concentração de glicose (linha com quadrado), xilose (linha com x), arabinose (linha com triângulo) e etanol (linha com losango) após 48 h de fermentação pela linhagem MP-P5 da levedura <i>S. cerevisiae</i> | 65 |
| Figura 6 – Resultado da análise quantitativa de sódio presente nos hidrolisados utilizados na etapa de fermentação com relação às diferentes faixas de pH (1,8 – 3,0 – 6,0 – 9,0 – 10,2) (em g/L). | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Ensaio de pré-tratamento do bagaço de malte com ácido oxálico..... | 51 |
| Tabela 2 - Quadro com os níveis do planejamento experimental dos ensaios de fermentação com as três linhagens de <i>S. cerevisiae</i> | 54 |
| Tabela 3 - Composição físico-química do bagaço de malte (BM) utilizado nesse estudo, comparação com outros trabalhos e bagaço de cana-de-açúcar (BC). ¹ | 56 |
| Tabela 4 - Caracterização físico-química da porção líquida dos ensaios de pré-tratamento. ^{1, 2} | 60 |
| Tabela 5 - Caracterização do hidrolisado concentrado utilizado na etapa de fermentação com relação à concentração de carboidratos (glicose, arabinose e xilose) e inibidores (ácido acético, furfural e HMF) (em g/L)..... | 62 |
| Tabela 6 - Resultados dos ensaios de fermentação utilizando as três linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PE-2, MP-P5 e JDY-01) com relação a concentração inicial e final de glicose, xilose, arabinose e produção de etanol e xilitol (em g/L). Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$) com relação ao mesmo carboidrato e ensaio. | 63 |
| Tabela 7 – VOCs identificados nos hidrolisados de cada ensaio após 48 h de fermentação pelas linhagens PE-2, MP-P5 e JDY-01 da levedura <i>S. cerevisiae</i> | 70 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| | APRESENTAÇÃO | 7 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3 | CAPÍTULO I | 20 |
| 3.1 | ARTIGO DE REVISÃO | 20 |
| 4 | CAPÍTULO II..... | 43 |
| 4.1 | MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 4.1.1 | Obtenção e preparo da matéria-prima | 43 |
| 4.1.1.1 | <i>Análise da distribuição do tamanho de partículas.....</i> | <i>44</i> |
| 4.1.2 | Caracterização físico-química do bagaço de malte cervejeiro | 44 |
| 4.1.2.1 | <i>Determinação do teor de umidade</i> | <i>45</i> |
| 4.1.2.2 | <i>Determinação do teor de proteínas totais.....</i> | <i>45</i> |
| 4.1.2.3 | <i>Determinação do teor de cinzas.....</i> | <i>47</i> |
| 4.1.2.4 | <i>Determinação do teor de extrativos</i> | <i>47</i> |
| 4.1.2.5 | <i>Determinação do conteúdo de lignina total e carboidratos</i> | <i>48</i> |
| 4.1.3 | Pré-tratamento com ácido oxálico para solubilização das hemiceluloses e hidrólise enzimática..... | 51 |
| 4.1.4 | Ensaio de fermentação para produção de xilitol e compostos orgânicos voláteis VOCs..... | 52 |
| 4.1.4.1 | <i>Avaliação da produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs).....</i> | <i>54</i> |
| 4.1.5 | Análise estatística | 55 |
| 4.2 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 4.2.1 | Caracterização físico-química do bagaço de malte cervejeiro | 56 |
| 4.2.2 | Pré-tratamento com ácido oxálico para solubilização de hemiceluloses..... | 57 |
| 4.2.3 | Ensaio de fermentação para produção de xilitol, etanol e VOCs..... | 61 |
| 4.2.3.1 | <i>Consumo de carboidratos e produção de xilitol e etanol</i> | <i>62</i> |
| 4.2.3.2 | <i>Produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs).....</i> | <i>69</i> |
| 5 | CONCLUSÃO | 74 |
| | REFERÊNCIAS..... | 75 |

| | |
|--|-----------|
| APÊNDICE A – CROMATOGRAMA DAS CURVAS PADRÃO DE CARBOIDRATOS, ETANOL, ÁCIDO ACÉTICO, HIDROXIMETILFURFURAL E FURFURAL | 82 |
| APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES ÀS PORÇÕES LIQUIDA E SÓLIDA DO ENSAIO DE PRÉ-TRATAMENTO PE8 (CLAE) | 83 |
| APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO ENSAIO DE FERMENTAÇÃO F12 (CLAE)..... | 90 |

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica de diversos vegetais vem sendo estudada nas últimas décadas como matriz renovável para a obtenção de fontes de energia ecologicamente sustentáveis, como o etanol de segunda geração (2G), além de produtos com valor agregado. Apesar de ser produzida em grande escala por diversos setores da economia, atualmente grande parte destes resíduos são destinados à queima, ao uso para alimentação animal ou à disposição em aterros (HOADLEY et al., 2023). Estima-se que a produção global de biomassa lignocelulósica gire em torno de 181,5 bilhões de toneladas por ano (MUJTABA et al., 2023).

O material lignocelulósico é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, arrançados numa estrutura cristalina vegetal altamente estável que deve ser rompida mediante pré-tratamentos a fim de disponibilizar as frações de interesse de forma isolada, para posterior beneficiamento (DAVISON et al., 2013; PASANGULAPATI et al., 2012; VELVIZHI et al., 2023). A celulose é um polímero muito resistente à hidrólise. Já a hemicelulose é um polímero que apresenta menor grau de polimerização. A lignina é uma substância hidrofóbica que pode atuar como inibidora de processos fermentativos se não for satisfatoriamente removida da composição de carboidratos antes do beneficiamento. Essa biomassa pode ser utilizada em dois tipos principais de biorrefinarias: biorrefinarias lignocelulósicas e de gás de síntese. Dentro das biorrefinarias lignocelulósicas, a biomassa primeiramente é separada em celulose, hemicelulose e lignina, com posterior síntese de produtos químicos de valor agregado por meio da conversão por microrganismos (DAHMEN et al., 2019; DEVI et al., 2023; ZHANG; YANG; BLASIAK, 2011).

Nesse sentido, o bagaço de malte, resíduo do processo produtivo de cervejarias, formado pela parte sólida obtida da filtração do mosto cervejeiro antes da fervura e constituído principalmente de restos de casca e polpa de malte, surge como uma opção com enorme potencial de aproveitamento, sendo responsável por aproximadamente 20 kg a cada 100 litros de cerveja produzida. Em 2022 cerca de 189 bilhões de litros de cerveja foram produzidos mundialmente, o que corresponde a uma geração estimada de aproximadamente 37 milhões de toneladas de bagaço de malte, número bastante contundente e que abre muitas possibilidades de reaproveitamento (ZEKO-PIVAČ et al., 2022). Este subproduto tem como destinação majoritária a alimentação de animais, apresentando baixa valoração. Além de seu valor financeiro e alta disponibilidade, outro atrativo dessa biomassa são suas características

químicas, sendo rica em carboidratos, como glicose e xilose, que, por meio de processos biotecnológicos, podem ser convertidas em produtos de valor agregado (MITRI et al., 2022b; MUSSATTO, 2014; MUSSATTO; ROBERTO, 2005; SGANZERLA et al., 2021).

Num conceito de biorrefinaria, o pré-tratamento da biomassa é uma etapa de suma importância, pois é nela que a estrutura lignocelulósica será modificada, possibilitando o acesso aos seus principais constituintes (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; KUMAR et al., 2009). Para isso, diversos processos podem ser empregados, dentre os quais se destacam as hidrólises ácidas (majoritariamente com ácidos minerais, como H_2SO_4 e HCl), alcalinas (normalmente com $NaOH$ em solução), enzimática e a autohidrólise (também denominada tratamento hidrotermal), onde diversas variáveis devem ser ajustadas a fim de otimizar a reação, como temperatura, pressão, concentração de reagentes e tempo (MERAL et al., 2022; MITRI et al., 2022b).

Um dos principais desafios nessa etapa é conseguir desorganizar a matriz lignocelulósica, aumentando a área de contato e solubilizando os constituintes, com pouca ou nenhuma formação de compostos inibidores de fermentação, a citar o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), produtos da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, e o ácido acético, que pode estar presente na ramificação das hemiceluloses. Essas substâncias, demandam um processo adicional de detoxificação do hidrolisado antes de submetê-lo a ação de microrganismos. Além disso, o uso de ácidos minerais fortes tende a danificar a estrutura física da biorrefinaria, acarretando problemas com a corrosão dos equipamentos e dificuldade em descartar e armazenar os reagentes utilizados no processo. A substituição destes por ácidos orgânicos, menos agressivos, vem sendo objeto de estudos, pois tendem a mitigar tanto a formação de compostos inibidores quanto os problemas com danos à estrutura da biorrefinaria (DHARMALINGAM et al., 2022; GÖNEN; DEVECI; AKTER ÖNAL, 2021; LIU et al., 2022, 2023; NORDIN et al., 2022).

O ácido oxálico é um ácido orgânico dicarboxílico ($pK_{a1} = 1,25$ e $pK_{a2} = 4,27$) de baixo peso molecular ($MM \leq 300g/mol$) amplamente distribuído na natureza, seja na forma de ácido ou de sua base conjugada, o oxalato (PALMIERI et al., 2019). O uso deste ácido no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos apresenta uma série de vantagens, principalmente com relação a uma menor produção de compostos inibidores, que podem afetar o processo fermentativo em etapas subsequentes, e a possibilidade de ser otimizado para o uso com diversos tipos de biomassas, o que é dificultoso no uso ácidos minerais, como o sulfúrico (JEONG; KOO; LEE, 2022). Além disso, hidrolisa seletivamente a matriz lignocelulósica, fazendo com que haja pouca degradação de celulose e glicose, o que faz com que seu uso seja

adequado para a obtenção de carboidratos de origem hemicelulósica, sem degradação extensiva dos monômeros presentes. Outra vantagem é que este ácido pode ser recuperado mais facilmente em comparação com ácidos minerais através de técnicas convencionalmente empregadas para ácidos orgânicos (como troca iônica e adsorção), o que podem viabilizar seu uso apesar do custo mais elevado (SANTOS et al., 2016). O ácido oxálico vem sendo empregado de forma satisfatória no pré-tratamento de diversas biomassas, a exemplo do dendezeiro (BUKHARI et al., 2021), do choupo amarelo (JEONG; KOO; LEE, 2022), de espigas de milho (LEE et al., 2011), madeira de bordo (ZHANG; KUMAR; WYMAN, 2013) e biomassa de oliveira (YILDIRIM et al., 2022).

Diante do exposto, conhecendo o resultado de estudos de pré-tratamento e hidrólise previamente realizados com outras matrizes lignocelulósicas, objetiva-se aqui a obtenção de xilitol e etanol a partir da fermentação das hemiceluloses provenientes do bagaço de malte. Para tal, propõe-se o uso de um ácido orgânico (ácido oxálico) em substituição aos ácidos minerais tradicionais, visando obter um hidrolisado rico em pentoses, com diminuída formação de inibidores. Na sequência, este hidrolisado rico em açúcares provenientes da porção hemicelulósica será submetido à fermentação por três cepas de *S. cerevisiae*, PE-2, MP-P5 e JDY-01, sendo a primeira industrial e as demais derivadas dela e geneticamente modificadas, com avaliação do consumo dos carboidratos, produção de xilitol, etanol e compostos orgânicos voláteis (*VOCs – volatile organic compounds*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização do bagaço de malte para a obtenção de xilitol, etanol e compostos orgânicos voláteis oriundos da fermentação de pentoses provenientes da porção hemicelulósica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atender ao objetivo geral, cumpriu-se as seguintes etapas:

- a) Caracterização da biomassa do bagaço de malte de cevada quanto aos teores de umidade, cinzas, proteínas, extrativos, lignina solúvel e insolúvel, hemicelulose e celulose.
- b) Realização de ensaios de pré-tratamento com ácido oxálico, visando a maximização da solubilização das hemiceluloses presentes na biomassa e a minimização da formação de compostos inibidores de fermentação;
- c) Realização da hidrólise enzimática das hemiceluloses solubilizadas da biomassa de bagaço de malte de cevada, em condições de concentração de enzima temperatura, pH e agitação ótimos, visando obter monômeros de xilose;
- d) Avaliação da produção de xilitol, etanol e compostos orgânicos voláteis por meio da fermentação do hidrolisado rico em hemicelulose proveniente do bagaço de malte de cevada, utilizando três linhagens de *S. cerevisiae* e, sendo elas a PE-2, a MP-P5 e a JDY-01.

3 CAPÍTULO I

3.1 ARTIGO DE REVISÃO

SCHMIDT, A. R.; et al. "Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention". **Catalysts** 13, n^o. 4: 755. Abril, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal13040755>

Review

Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention

Aline Ruth Schmidt^{1,2,3}, Aline Perin Dresch^{3,4} , Sergio Luiz Alves Junior² , João Paulo Bender^{1,3} and Helen Treichel^{1,5,*} 

¹ Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Fronteira Sul, Laranjeiras Do Sul 85301-970, PR, Brazil

² Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó 89815-899, SC, Brazil

³ Laboratory of Solid Waste, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó 89815-899, SC, Brazil

⁴ Graduate Program in Environmental Engineering and Technology, Federal University of Paraná, Palotina 85950-000, PR, Brazil

⁵ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim 99700-970, RS, Brazil

* Correspondence: helentreichel@gmail.com

Abstract: A circular economy is imperative for environmental sustainability. In this context, biorefineries stand out as a means of production able to reduce the carbon footprint and the impact of global warming. Biorefineries may employ lignocellulosic biomass from various plant sources to produce bioproducts with the potential to replace fossil derivatives through synthesis by microorganisms without competing with food crops. Brewer's spent grain (BSG), the residue of the brewery production process, is an option with potential for use, being a cheap raw material highly available throughout the year. The chemical composition of this biomass is quite variable, with significant amounts of hemicellulose, mainly consisting of xylose and arabinose monomers that can be technologically converted into value-added products such as xylooligosaccharides, xylitol, second-generation ethanol (2G ethanol), biofilms and furfural. To this end, catalysts are unusual in making biorefineries increasingly competitive in the market, selectively optimizing reactions and reducing the environmental impact of the production processes of these bioproducts. The present review addresses the primary methods for extracting and processing hemicelluloses from BSG using either biocatalysts (enzymes) or homogenous (acids, alkali, and salts) and heterogenous catalysts (solid acids and metal oxide) that can be used to pretreat the biomass and obtain the preferred byproducts. The state of the art of optimized catalysis mechanisms is also presented.

Keywords: lignocellulosic biomass; xylan; bioconversion; circular economy



check for updates

Citation: Schmidt, A.R.; Dresch, A.P.; Alves Junior, S.L.; Bender, J.P.; Treichel, H. Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention. *Catalysts* **2023**, *13*, 755. <https://doi.org/10.3390/catal13040755>

Academic Editors: Teodora Bavaro and Giovanna Speranza

Received: 28 February 2023

Revised: 11 April 2023

Accepted: 12 April 2023

Published: 15 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The need for a circular economy and the consequent search for materials of sustainable origin to replace the extensive use of petroleum products has led to the development of techniques for reusing and recovering waste that previously seemed destined for disposal. This has led to biorefineries using lignocellulosic biomass from various plant sources to produce bioproducts. The catalysts are mainly acids and microorganisms or their enzymes in these circumstances. Interestingly, besides their potential to replace fossil derivatives, these bioprocesses do not compete with food crops [1,2].

Despite being made on a large scale by various sectors of the economy, today, much of this waste is destined for burning, use for animal feed, or for landfills. It is estimated that the global production of lignocellulosic biomass is around 181.5 billion tons per year [1], emphasizing sugarcane bagasse, which accounts for an annual output of 279 million tons [2]. However, the use of biomass in bioprocesses depends on its chemical constitution. The lignocellulosic material is composed mainly of cellulose, hemicellulose, and lignin,

arranged in a highly stable plant crystalline structure. For them to be useful for biorefinery purposes, a pretreatment approach is required to isolate the fractions of interest and make them available for further processing [3]. Cellulose is a long-chain polymer (with a polymerization degree ranging from 1000 to 15,000) that is very resistant to hydrolysis and consists of glucose units linked by β -1,4-glycosidic bonds. Cellulose molecules are linear and tend to form inter- and intramolecular hydrogen bonds, giving them high tensile strength and making them insoluble in most solvents. Lignin is a hydrophobic substance derived from irregularly repeated phenylpropanoid units, originating in the dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol. It can inhibit fermentative processes if not satisfactorily removed from the carbohydrate composition before processing [4]. Hemicellulose is a heteropolysaccharide formed by hexoses (D-glucose, D-galactose, and D-mannose), pentoses (D-xylose and L-arabinose), and branches with acetyl groups, which give rise to acetic acid, an essential inhibitor of fermentative processes when hydrolyzed [5]. Hemicellulose is bound to cellulose by hydrogen bridges and lignin by covalent bonds (mainly α -benzyl ether bonds [6]).

Catalysts are crucial for biorefining lignocellulosic biomass, from pretreatment to downstream processing. These molecules lower the activation energy of the reaction while remaining unconsumed, which means that they can be separated and reused. Beyond that, waste generation is considerably lower when compared to the traditional use of stoichiometric reagents, which are consumed during the reaction, and usually generate unwanted byproducts. In this sense, solid catalysts are preferred due to the recovery facilitation. These catalysts can be categorized into four groups according to their characteristics: micro and mesoporous materials, metal oxides, supported metal catalysts, and sulfonated polymers [7]. The utilization of catalysts is also necessary to achieve high selectivity towards the desired products, enabling efficient cleavage of C–C and C–O bonds, and thus facilitating the depolymerization of the lignocellulosic structure and recovery of the holocellulosic portion for further processing [8]. Recently, solid catalyst systems have been developed for the optimized conversion of biomass and other raw feedstocks into value-added chemicals and fuels.

Brewer's spent grain (BSG), the residue of the brewery production process, has emerged as a feedstock option for use in biorefineries. It is estimated that for every 100 L of beer produced, ~20 kg of BSG is generated [9]. This byproduct has animal feed as its primary destination (which presents a low valuation). In addition to its high availability, which is independent of seasonality, another attraction of this biomass is its chemical characteristics. BSG is rich in carbohydrates, mostly xylose (coming from hemicellulose), which through biotechnological processes, can be converted into products of higher added value, going far beyond the current applications [10].

For this review, we initially searched the Web of Science (WoC), Science Direct, Scopus, Wiley, and Springer databases with the terms "brewer's spent grain + biorefinery", "brewers spent grain + hemicellulose + hydrolysis", "brewers spent grain + catalyst", and "brewers spent grain + hemicellulose + catalyst". Then, to broaden the scope, we added the terms "hemicellulose + biorefinery + catalyst" and "catalysis + mechanism + hemicellulose" to the search, exploring the possibility of methods applied to other biomasses of a similar structure applying to BSG hemicelluloses processing (Figure 1).

At the end of the bibliographic search, more than 20,000 articles (research or review) were found in different databases (Table 1). We also considered that some could be included in multiple databases. The material thus collected was used to prepare this review.

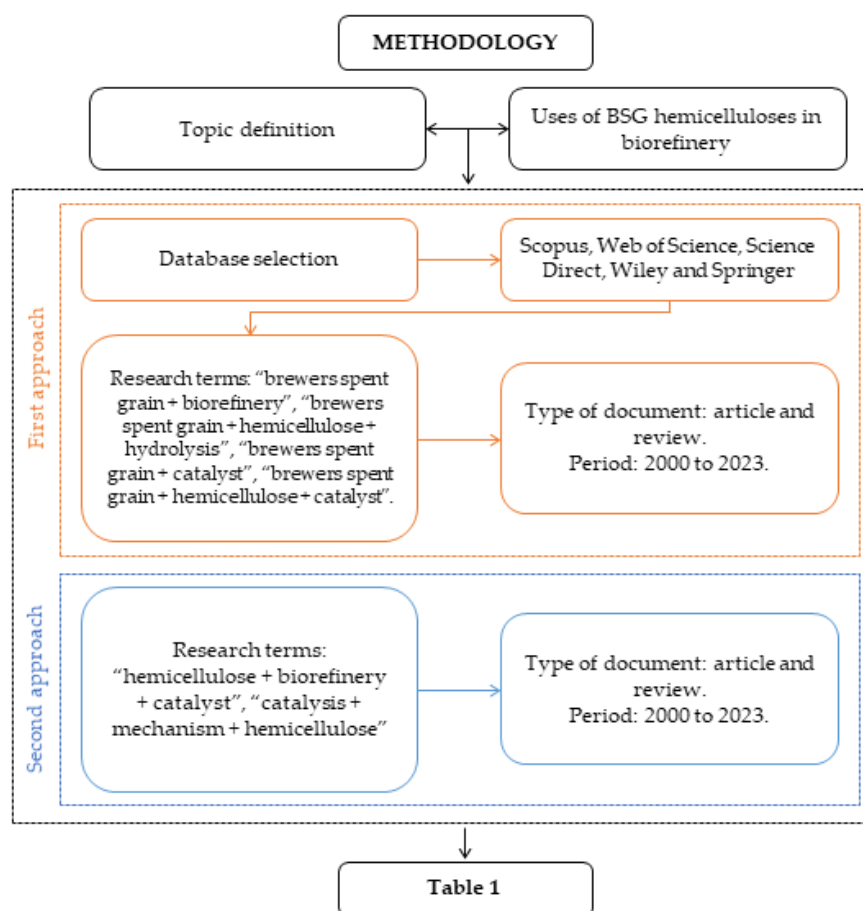


Figure 1. Overview of the methodology used to approach this review.

Table 1. Result of the number of articles found in each database with the search terms related to the subject of the review.

| Database | Brewers Spent Grain + Biorefinery | Brewers Spent Grain + Hemicellulose + Hydrolysis | Brewers Spent Grain + Catalyst | Brewers Spent Grain + Hemicellulose + Catalyst | Hemicellulose + Biorefinery + Catalyst | Catalysis + Mechanism + Hemicellulose |
|----------------|-----------------------------------|--|--------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| Scopus | 61 | 35 | 21 | 3 | 136 | 145 |
| Web of Science | 103 | 47 | 12 | 1 | 196 | 134 |
| Science Direct | 328 | 561 | 381 | 253 | 3441 | 4720 |
| Wiley | 148 | 367 | 1062 | 226 | 1476 | 3183 |
| Springer | 127 | 188 | 157 | 73 | 1235 | 1632 |

2. Productive Chain and Physicochemical Composition of Brewer's Spent Grain

In 2020, worldwide beer production was close to 182 billion liters, and was especially high in North and South America (61.6 billion liters), Asia (55.1 billion liters), and Europe (50.1 billion liters). Considering that every 100 L of beer produced generates approximately 20 kg of dried brewer's spent grain, 36.4 billion kg of this biomass is available annually [11].

Being a cheap raw material (approximately 0.04 USD/kg) [12] with high availability, this lignocellulosic biomass has a high potential for conversion into value-added products as part of a circular economy approach focused on the search for energy alternatives [13]. Around 70% of brewer's spent grain is used for animal feed, just over 10% is intended for biogas production, and the remainder is disposed of in landfills without processing. Currently, the cost of transportation, especially when wet (the bagasse leaves the brewery with 70–80% humidity), the drying process, and the need for pretreatment to access the

carbohydrates are some barriers to increasing its use. This issue delays the effective use of brewer's spent grain and many other biomasses in second-generation biorefineries [11,12]. An interesting approach would be to install these platforms near the waste generation areas, on a smaller and modular scale, within a cooperative and decentralized system commanded by the producers, as already happens with some plants that combine electricity and biogas production. This could reduce transport and investment costs, benefiting the local economy's circularity [1].

Brewer's spent grain represents about 85% of the residues produced by the brewing process, obtained after mashing and filtration of the wort. It is composed of bark, pericarp, and seed. These parts are not extracted during the brewing process. It represents a rich source of fiber (40–70%), proteins (19–30%), and lipids (10% on average), as well as minerals (2–5%), vitamins, and phenols (0.7–2%) [13]. It also contains many amino acids, such as threonine (3.5 g/100 g), isoleucine, valine, phenylalanine (5.5 g/100 g), lysine, and leucine. The phenolic compounds present in the highest concentration are ferulic (336 mg/100 g), p-coumaric (65 mg/100 g), synapic (42 mg/100 g), caffeic (10 mg/100 g), and syringic (7 mg/100 g) acids, which confer an essential antioxidant capacity [14]. The high content of carbohydrates, proteins, and moisture makes BSG susceptible to microbial deterioration (from 2 to 7 days), so it must be quickly processed [15].

The chemical composition of this biomass is quite variable (Table 2), depending on factors such as the type of barley used in malting, the stage and manner in which it was harvested, the quality of the malt, and the additives applied during the mashing process (e.g., gum, iron, zinc, and polypeptides, used to optimize foam formation and stability, but which also cause the hydrolysis of β -glucans, removal of oxalic acid, and degradation of polyphenols). In addition, storage conditions can influence the physical–chemical characteristics of bagasse, with studies demonstrating that frozen samples had a higher protein and fat content compared to lyophilized and air-dried samples, but had a lower carbohydrate content, especially arabinose [11,13].

Table 2. Chemical composition of different brewer's spent grain (BSG) samples and comparison with sugarcane bagasse (SCB), pearl millet (PM), and rice husk (RH) (on a dry basis; g/100 g).

| Component | BSG [16] | BSG [17] | BSG [18] | BSG [19] | SCB [20] | PM [21] | RH [22] |
|------------------|--------------|-------------|-------------|----------|--------------|--------------|---------|
| Cellulose | 15.99 ± 0.88 | 19.2 ± 1.40 | 15.2 ± 0.50 | 19.24 | 39.52 ± 0.66 | 40.99 ± 2.50 | 31.12 |
| Hemicellulose | 29.92 ± 1.60 | 18.4 ± 3.70 | 25.1 ± 0.70 | 53.09 | 25.63 ± 0.44 | 20.90 ± 2.00 | 22.48 |
| Xylan | 25.22 ± 1.46 | 11.3 ± 1.20 | 16.9 ± 0.70 | - | - | - | - |
| Arabinan | 4.71 ± 0.14 | - | 6.6 ± 0.30 | - | - | - | - |
| Total Lignin | 20.80 ± 0.42 | - | 12.5 ± 0.80 | 8.53 | 30.36 ± 0.13 | 18.3 ± 1.80 | 22.34 |
| Soluble Lignin | 3.02 ± 0.01 | 9.9 ± 1.40 | 5.5 ± 0.30 | - | 3.60 ± 0.90 | 18.20 ± 1.80 | - |
| Insoluble Lignin | 17.78 ± 0.41 | - | 7.0 ± 0.50 | - | 26.40 ± 0.20 | 0.06 ± 0.01 | - |
| Starch | - | 4.8 ± 0.46 | 5.3 ± 0.20 | - | - | - | - |
| Lipids | - | 5.2 ± 2.10 | - | - | - | - | - |
| Proteins | 21.16 ± 0.61 | 26.6 ± 0.38 | 21.2 ± 0.20 | 17.25 | - | - | - |
| Ashes | 3.76 ± 0.05 | 2.7 ± 0.07 | 2.3 ± 0.10 | 3.68 | 1.45 ± 0.21 | 5.96 ± 0.50 | 13.87 |
| Extractives | 8.33 ± 0.76 | - | 18.5 ± 1.00 | - | 3.04 ± 0.17 | 19.30 ± 1.40 | 2.33 |

"-": data not available.

Despite the high availability, low cost, and useful chemical composition, which is rich in carbohydrates and aromatic compounds, the application of this biomass is still very restricted to research, and it is necessary to expand its practical use in second-generation biorefineries [23]. To achieve this, however, it is essential to implement sustainable technologies for converting brewer's spent grain and other lignocellulosic biomasses products of technological interest, which should be the focus in the coming years [24,25].

3. The Use of Brewer's Spent Grain in Biorefineries

A bibliometric analysis by Sganzerla et al. [24] showed that brewer's spent grain has been the object of study in scientific research since the 1970s, with the first paper being published in 1976. Since 2004, scientific interest in this biomass has increased, possibly due to the demand for alternatives to oil products and concern about climate change. While initially focused on agriculture engineering, studies began to diversify, opening space for research with fuels, biotechnology, chemical engineering, environmental sciences, and applied chemistry. The last decade produced 75% of the knowledge about processing and characterizing brewer's spent grain. This paper also established Brazil as the country that publishes the most about this biomass, with about 14% of all publications. However, Europe stands out in the practical application of this resource in producing renewable energy, being the pioneer in discussions about the concept of the circular economy.

The processing of BSG is characteristic of the "Second-generation Biorefineries", where agro-industrial waste composed of lignocellulosic biomass is processed to obtain bioproducts which are later reintroduced into the production and consumption chains. One of the potential products is biomethane (biogas). After an optional pretreatment step (which increases digestibility and productivity), biomass undergoes a series of transformations through the action of microorganisms in syntrophy during an anaerobic digestion process consisting of the following steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. This microbial catalytical synergy forms carbon dioxide and methane, which may be used for energy production or as fuel. Moreover, the residue of this process (the digestate) can still be used as a biofertilizer [26–28].

The lignocellulosic biomass presents a complex and naturally recalcitrant structure that requires a series of treatments to access their components, with the subsequent synthesis of bioproducts. For this, several pretreatment methods can be adopted, either catalyzed or not, depending on what it is intended to produce, to optimize the recovery of each fraction [4]. Fortunately, several strategies can be used in the solubilization and recovery of hemicelluloses, and the most prominent are listed below.

3.1. Pretreatments for Extraction of Hemicelluloses from Brewer's Spent Grain

Brewer's spent grain can have more than 50% hemicellulose in its composition, which consists mainly of xylose and arabinose monomers [19]. The solubilization of this fraction can be achieved using several approaches, including physical, chemical, or combined pretreatments (Table 3), depending mainly on the desired characteristics of the hydrolysate [29]. For example, suppose the next step to pretreatment is a conversion by microorganisms, such as xylitol production. In that case, it is essential to consider the formation of fermentation-inhibitory compounds such as furfural (product of degradation of pentoses) and acetic acid (product of hydrolysis of acetyl groups present in the branches of hemicelluloses). If these substances are present, a detoxification step of the hydrolysate may be required [30]. Physical pretreatment, such as drying, is essential to increase the microbiological stability of this biomass, which has a high moisture content (80% average) and facilitates transport to processing sites. Usually, this is the first pretreatment to which this biomass is subjected, regardless of whether it is used for animal feed or biorefineries [31].

Pretreatments with diluted acid catalysts (in concentrations < 5%, usually sulfuric acid) and high temperatures (between 120 and 210 °C) are often used for the solubilization of BSG hemicelluloses, with satisfactory recovery results [32]. In the presence of the acid catalyst, the hydrogen bonds between hemicellulose and cellulose break, and the hydrolysis of hemicellulose occurs [33]. Rojas-Chamorro et al. [18] reached hemicellulosic sugar recoveries greater than 80% in all tested conditions with diluted H₂SO₄, with the concentration of pentoses (xylose + arabinose) reaching 30 g/L on average. A process with two-step acid-catalyzed hydrolysis using diluted sulphuric acid was developed by Bedč et al. [34], wherein the first acidic hydrolysis that rendered high arabinose yield (76%) was achieved under optimized conditions (90 °C, 1.85 w/w % H₂SO₄, 19.5 min) and an arabinose/arabino-xylooligomer-rich supernatant was obtained. The remaining

xylan was solubilized in the second acidic hydrolysis, resulting in a 90% xylose yield. The main disadvantage of this pretreatment method is that it forms byproducts, such as 5-hydroxymethylfurfural (HMF), furfural, and acetic acid (Figure 2). This is mainly related to the high processing temperatures, which may jeopardize an eventual next step involving non-tolerant microorganisms [35]. These molecules, however, can also be desirable and are considered essential building blocks for a biorefinery. Furfural, for example, can be transformed into valuable products such as furfuryl alcohol [36,37]. Organic acids, such as oxalic, formic, and maleic acid, are also being investigated as homogenous catalysts for hemicellulose solubilization, presenting promising results while leading to a lower formation of inhibitory compounds [38–40]. However, the use of organic acids in the solubilization of BSG hemicelluloses needs more studies to evaluate the feasibility of its use.

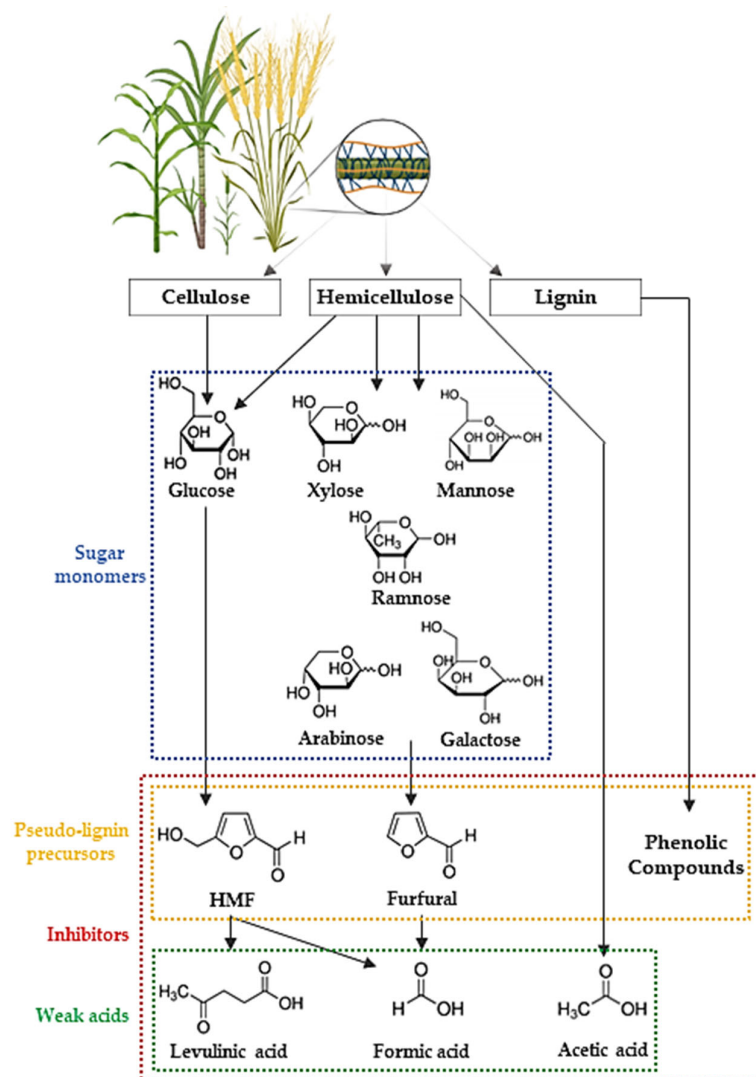


Figure 2. Quick scheme of the main inhibitory compounds formed in the hydrolysis of lignocellulosic biomass during acid and/or hydrothermal pretreatment.

Alkaline hydrogen peroxide (AHP) can also solubilize the hemicellulosic portion, which can be recovered with high purity by using ethanol precipitation [41]. This can be done at room temperature, although it takes longer than at higher temperatures, which results in less or no inhibitory compound formation. This method uses a combination of hydrogen peroxide and sodium hydroxide solutions at pH 11.5, which is effective for the delignification and solubilization of hemicellulose while using a lower concentration of the alkali reagent [42]. Hydrogen peroxide is highly reactive and exhibits solid oxidizing

ability, dissociating to produce hydroperoxide anions that react with hydrogen peroxide in an alkaline medium to form hydroxyl radicals and superoxide anions that oxidize lignin. In the next step, hydrophilic (carboxyl) groups are introduced into the structure, and interunit bonds are cleaved, resulting in the dissolution of lignin and hemicellulose [43]. A study by Fernández-Delgado et al. [44] using AHP (5% H₂O₂, pH 11.5, 50 °C, 150 rpm) in comparison with alkaline and ozone pretreatment obtained hydrolysates with significant recovery (80% maximum) of hemicellulose monomers (13.0 g/L of xylose and 5.2 g/L of arabinose), and concentrations of furfural and HMF under the detection limits (<1 mg/L), which made it suitable for enzymatic and microbiological conversion.

Another pretreatment method commonly applied to BSG is hydrothermal (also known as liquid hot water or autohydrolysis), in which the biomass is hydrolyzed for a time that can vary between minutes and hours only using water under high temperature and pressure, between 150 and 230 °C and approximately 50 bar, respectively [45]. The high temperature promotes the release of acetic and uronic acid in the medium due to the hydrolysis of acetyl and uronic groups present in the xylan, acting as biocatalysts and increasing the xylan hydrolysis rate. For example, Parchami et al. [46] achieved a 76% rate of BSG hemicellulose solubilization, performing this pretreatment at 180 °C for 30 min, observing that the yield improved with the temperature. This reaction is very similar to the pretreatment with dilute acid. This pretreatment is advantageous since it does not require chemical, corrosive, or toxic reagents, preventing equipment corrosion and the need for chemical recycling. Additionally, the costs of this pretreatment are lower compared to others. However, it demands an efficient control of temperature and pressure, which can cause the thermal degradation of hemicellulose [47,48].

Recently, new routes were developed by the Institute for Research in Bioenergy (IP-BEN/UNESP), with two patent registrations. The first is a modification of the organosolv process, allowing the obtention of lignin combined with the recovery of hemicellulose in the same method, which mainly comprises adding ethanol to precipitate the hemicellulose/xylan and subsequent acidification to precipitate the lignin of the liquid fraction [49]. The second, by Felipuci et al. [50], focuses on the extraction of xylan from lignocellulosic biomass using the association of biological pretreatment with a chemical treatment to increase the extraction of xylan from biomass. This biological pretreatment employs a fungus that causes changes in the composition of lignin and/or material and a consequent decrease in biomass recalcitrance, resulting in higher yields in hemicellulose extraction.

Table 3. Brewer’s spent grain hemicellulose extraction methods, yield, and the final product obtained.

| Method of Extraction | Yield/Recovery | The Product Obtained from BSG Hemicelluloses | Reference |
|--|---|---|-----------|
| Diluted acid (o.c.: 130 °C, 1% H ₂ SO ₄ , 26 mi) | 34 g/L, average | Xylose/arabinose monomers (subjected to fermentation to obtain bioethanol) | [18] |
| Two-step acidic hydrolysis (o.c.: 90 °C, 1.85% H ₂ SO ₄ , 19.5 min) | 1° hydrolysis: 29.9% total xylose yield and 69.7% total arabinose yield. 2° hydrolysis: 89.7% xylose yield, complete arabinose solubilization. | Xylose/arabinose monomers and arabinoxyran-oligosaccharides | [34] |
| Ultrasound-assisted extraction w/1.5 M NaOH | 58.47 ± 3.17% max. | Arabinoxyran solution w/increased emulsifying properties | [51] |
| Direct fermentation (o.c.: <i>T. reesei</i> , 20 g/L of BSG, pH 7.0, 30 °C, 72 h) | 326.2 mg XOS/g max. | Arabino-xylooligosaccharides (AXOS) w/degree of polymerization from 2 to 5. | [52] |
| Steam Explosion (o.c.: 180 °C, 10 min, 25% initial dry matter) | >73.1% | Xylooligosaccharides (XOS) | [53] |

Table 3. Cont.

| Method of Extraction | Yield/Recovery | The Product Obtained from BSG Hemicelluloses | Reference |
|--|-----------------|---|-----------|
| Nixtamalization + thermal treatment w/CaO, 100 °C | 6.43% | Arabinoxylan chains | [54] |
| Hydrothermal pretreatment (160 °C for 20 min) | 20 g/L max. | Xylitol and 2G ethanol | [55] |
| Thermal extraction (100 °C for 30 min) followed by NaOH 0.5 mol/L solution (25 °C 100 rpm, 8 h) | - | Thermoplastic films | [56] |
| Alkaline extraction (4 M KOH + 5 mM Na ₂ S ₂ O ₅) followed by ethanol precipitation and enzymatic hydrolysis | 63.6% max. | Xylose monomers | [57] |
| SSF w/ <i>Fusarium oxysporum</i> (o.c.: BSG extruded, 48 h fermentation) | 63.28% | Soluble Arabinoxylans | [58] |
| Microwave-assisted alkali pretreatment (o.c.: 172 °C, 0.38 M NaOH) followed by ethanol precipitation/enzymatic hydrolysis | 133 kg AX/t BSG | Arabino-xylooligosaccharides (AXOS) and biobutanol | [59] |
| Organosolv pretreatment (o.c.: 180 °C, 10 min, 50% ethanol) | 50% average | Arabino-xylooligosaccharides (AXOS) | [60] |
| Subcritical water hydrolysis (174 °C, 60 min and 5% (w/v) of dry BSG) | >80% | Arabinoxylan-rich hydrolysate | [61] |
| Peroxide alkaline pretreatment (o.c.: 5% H ₂ O ₂ , pH 11.5, 50 °C, 150 rpm) followed by enzymatic hydrolysis | 30% max. | Arabino-xylooligosaccharides (AXOS) and monosaccharides | [44] |

¹ optimal condition.

Catalysts are an essential component of any reaction. These substances can be classified as homogeneous (where the active sites are in the same phase as that of the reactant, as in most acid and alkaline hydrolysis), heterogeneous (where the catalyst and the reactant are in different stages), or enzymatic (where an enzyme acts as a catalyst in the reaction) [61]. Heterogeneous catalysts (HTC) have the advantage of being quickly recovered at the end of the process, mainly because they are in solid form and constitute an up-and-coming field of study in green chemistry [62]. Solid acid catalysts (SAC), such as zeolites and metal oxides, comprise an exciting option to substitute mineral acids in the solubilization of hemicelluloses, maintaining the advantages of acid hydrolysis while increasing selectivity towards the glycosidic bonds, leading to higher sugar yields, with the possibility of using a continuous flow process [62]. Recently, a novel SAC was synthesized from biomass-derived glucosamine HCl and used as a catalyst for a one-step conversion of corn stover into furfural and HMF, showing promising results [63]. Additionally, some studies have satisfactorily demonstrated that hemicelluloses can be selectively hydrolyzed into sugar monomers using HTC with cation-exchange properties [64]. Even so, the direct conversion of hemicelluloses into value-added products using HTC is still poorly reported in the literature, mainly due to the poor selectivity of such catalysts. In addition, more studies need to be carried out to develop HTC that can optimize the recovery of monomers of hexoses from cellulose and pentoses from hemicellulose in the same process and in a viable way [65].

3.2. Obtaining Value-Added Products from Brewer's Spent Grain Hemicelluloses

In a biorefinery environment, the heterogeneous structure of hemicelluloses can be transformed into many bioproducts with diverse properties, ranging from simple carbohydrates to complex molecules such as oligosaccharides, lactic acid, xylitol, ethanol, biofilms, and enzymes. The most prominent products will be addressed below.

3.2.1. Xylooligosaccharides

Xylooligosaccharides (XOS) link two to seven xylose molecules through β -1,4-glycosidic bonds. These are emerging molecules with a huge market potential in the food, feed, health, and cosmetics industries due to their biological and physicochemical properties, especially prebiotics. XOS present a moderate degree of sweetness, stability of pH and temperature, and do not exhibit toxicity or negative effects on human health, characteristics that make them suitable compounds to be incorporated into several edible products [53]. The global XOS market is expected to exhibit a compound annual growth rate (CAGR) of 7.57% from 2019 to 2024 and to reach 130 million USD by 2023 [66,67].

The production of XOS typically involves two stages: a chemical or hydrothermal pretreatment to solubilize the xylan of the lignocellulosic material, followed by xylan hydrolysis by xylanolytic enzymes (Figure 3) [66]. Using commercial xylanase from *Aspergillus oryzae*, Sajib et al. [67] used BSG to obtain a hydrolysate with 98% of XOS (mainly X2-X5) and only about 2% (*w/w*) of the xylose present as monosaccharides after 5 h of hydrolysis. Methods using the direct steam explosion of screw-press-dried BSG [53] and extremely low acid (ELA) catalysis in liquid hot water (LHW) hydrothermal treatment (HTT) [68,69] achieved yields of 73.1% and 76.4%, respectively, showing that an enzymatic step is not always needed for XOS production.

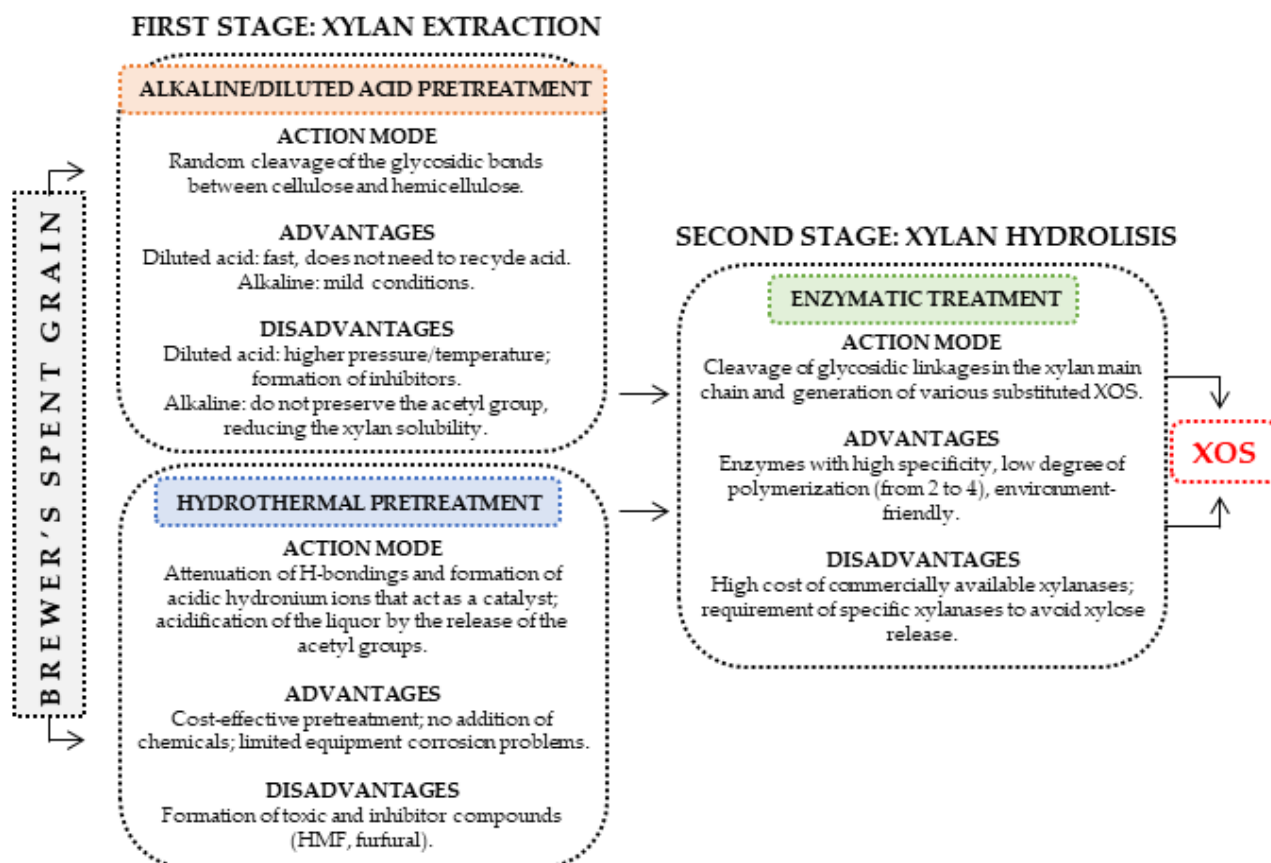


Figure 3. Pretreatments involved in XOS production at the first stage, and enzymatic hydrolysis at the second stage.

3.2.2. Xylitol

Xylitol is a polyol of the pentitol type, and is also called sugar alcohol or polyalcohol. It is the sweetest of the polyols, equivalent to sucrose in sweetness, but with fewer calories and a lower glycemic index. Another advantage is that its two main absorption pathways (liver and intestinal flora) are independent of insulin, which makes xylitol an appropriate sweetener for people with diabetes. In addition, due to its low-calorie load, it can be

considered a suitable sweetener for carbohydrate-controlled diets. The most common application of xylitol worldwide is in sugar-free chewing gums. It is very convenient due to its organoleptic properties, good solubility, and controllable crystallization, which is very useful in providing dental coating benefits. The consumption of xylitol exerts a prebiotic effect by decreasing the fecal pH. Due to its emollient and humectant properties, it can also be used in cosmetic applications [70].

In biorefinery platforms, xylitol is considered one of the most important products derived from carbohydrates. It can be produced by chemical or biological conversion (Figure 4) of hemicellulose [71]. Several studies demonstrate that xylitol is the main product potentially derived from the hemicelluloses in a BSG biorefinery [24]. Chemical routes traditionally carry out the large-scale conversion of biomass to xylitol through the hydrogenation of purified xylose (from the hydrolysis of hemicellulose) using chemical catalysts at high pressures and temperatures. Some of the catalysts successfully used for this purpose include Ru/(NiO–TiO₂) [72], Ni₃Fe₁ [73], silica-supported monometallic cobalt (Co/SiO₂) [74], and Ni-Re bimetallic nanoparticle catalysts (Ni-Re/AC) [75]. However, for safety and environmental reasons, the biotechnological route employing microorganisms and enzymes is being explored and optimized [76].

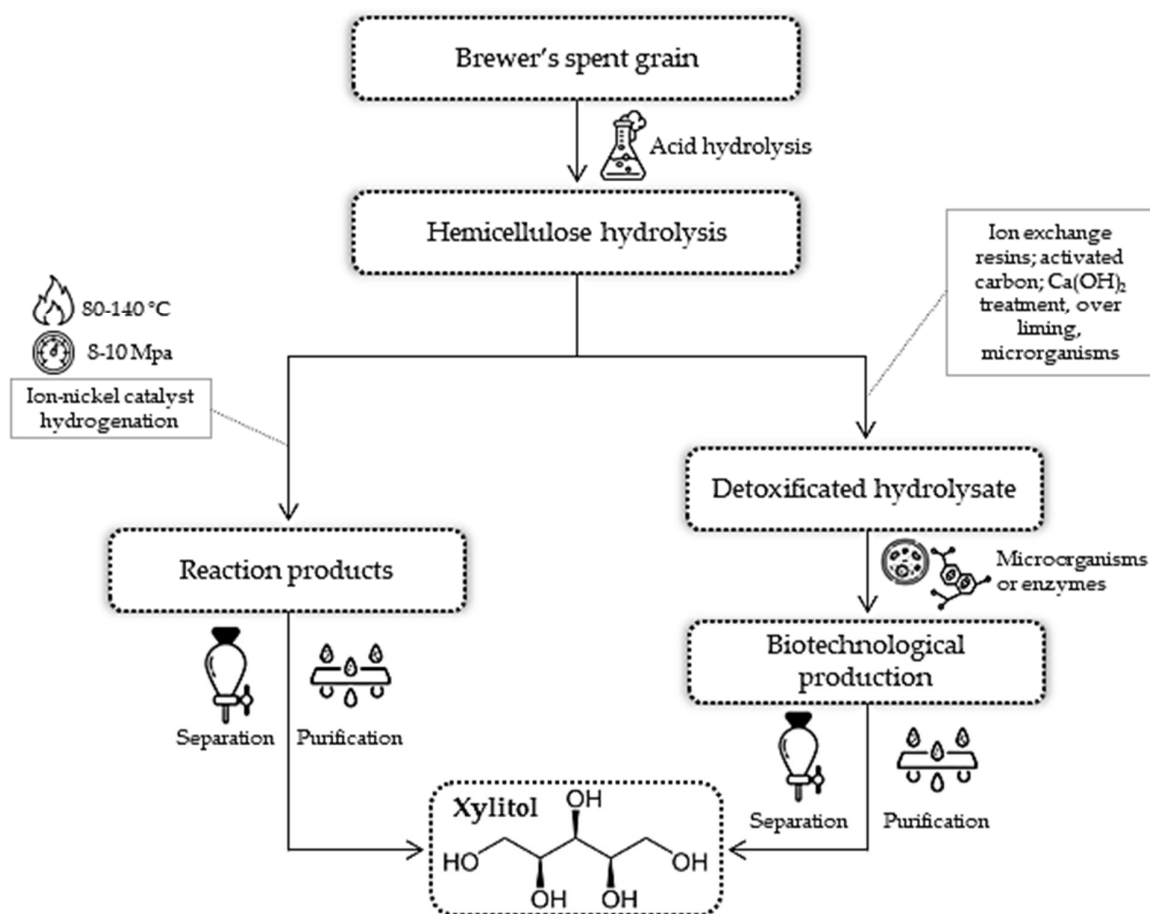


Figure 4. Chemical and biotechnological routes for converting hemicellulose to xylitol.

Many microorganisms can use xylose as a carbon source and convert it into xylitol, generally mediated by enzymatic catalysis by xylose reductase (XR). Xylitol production is obtained by reducing xylose to xylitol as the first step of xylose metabolism with NAD(P)H-dependent XR. Yeasts are the preferred biocatalysts for this process due to high rates of pentose assimilation in some species and stable levels of XR expression, resulting in high xylitol yields [77]. *Candida guilliermondii* [78,79], *Debaryomyces hansenii* [80], *Komagataella*

pastoris [81], and *Pachysolen tannophilus* [55] are some of the yeasts used in research to obtain xylitol from BSG hemicelluloses efficiently.

3.2.3. 2G Ethanol

The combustion of fossil fuels contributes to CO₂ emissions and global warming, making the energy transition to low-carbon fuels a worldwide necessity to tackle climate change. With the growing global demand for energy, fossil fuel resources on our planet are anticipated to become depleted. In the past decade, several fuels have emerged as a promising alternative to fossil fuels, with second-generation bioethanol being the most prominent option [82]. The United States and Brazil are the leading producers of 2G ethanol, which uses lignocellulosic biomass (residues from crops such as sugarcane bagasse, corn stover, and BSG) as feedstocks to produce this biofuel (Figure 5) [83].

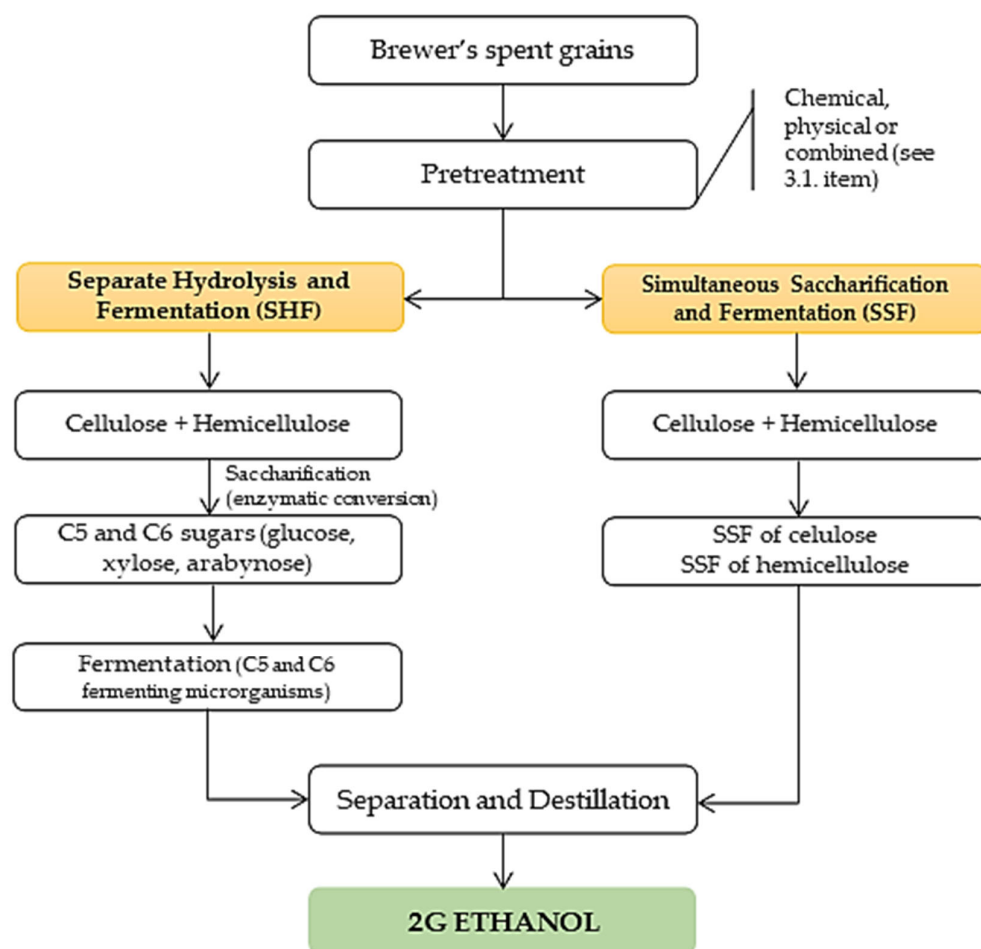


Figure 5. General process for obtaining 2G ethanol using the holocellulosic portion from BSG.

At first, only the cellulosic part of the biomass (predominantly glucose) was subjected to fermentation due to the incapacity of the traditional industrial yeasts (usually *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains, such as PE-2) to convert pentoses (such as xylose and arabinose, the main constituent monomers of hemicellulose) into ethanol once they do not harbor an efficient xylose assimilation pathway [84]. However, the use of native yeasts capable of fermenting xylose, such as *Scheffersomyces stipitis* and *Scheffersomyces shehatae* (that can ferment both glucose and xylose) [55], and the genetic engineering of *S. cerevisiae* strains to include this xylose assimilation pathway, as well as fermentation inhibitor tolerance [85], have made it possible to use pentoses from lignocellulosic biomass in 2G ethanol production, which includes BSG, in addition to possibly reducing costs associated with the removal of the detoxification step of the hydrolysates.

One condition for the metabolization of xylose that requires more attention is oxygen supplementation. Xylose metabolization by yeast occurs through a redox process where, initially, xylose is reduced to xylitol by the enzymatic action of XR. Subsequently, xylitol dehydrogenase (XDH) catalyzes the oxidization of xylitol into xylulose, which is then phosphorylated to xylulose-5-phosphate by xylulokinase. Finally, xylulose-5-phosphate enters the pentose phosphate pathway (PPP), which leads to ethanol formation [86]. Some yeasts achieve higher yields regarding conversion from xylose into ethanol due to recycling coenzymes (NADH/NAD⁺) in the subsequent reactions catalyzed by XR and XDH, respectively. However, when XR uses NADPH as an electron donor and XDH uses NAD⁺ as an electron acceptor, there is a redox imbalance which leads to xylitol accumulation to the detriment of ethanol production. In the presence of oxygen, however, such inequality may be overcome [5]. Indeed, Da Silva et al. [55], using hemicellulose liquor BSG as substrate, noticed that the yeast *Pachysolen tannophilus* preferentially produced xylitol when oxygen was limited. In contrast, ethanol was preferentially produced with higher concentrations of this gas in the medium.

The use of bacteria to produce 2G ethanol is another possible pathway. In bacteria, the conversion of xylose to xylulose occurs directly by the catalysis of the xylose isomerase enzyme. Through the PPP, xylulose-5-phosphate turns into glyceraldehyde-3-phosphate and fructose-6-phosphate, leading to ethanol formation via the Embden–Meyerhof Pathway [5]. Rojas-Chamorro et al. [87] used *Escherichia coli* SL100 to ferment a mixed sugar solution obtained after phosphoric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of BSG. The obtained hydrolyzate, containing hemicellulosic sugars and starchy glucose, without previous detoxification, yielded 0.40 g of ethanol per gram of sugar, which represents an overall yield of 17.9 g of ethanol per 100 g of raw BSG.

3.2.4. Enzymes

Enzymes have proven to be one of the most exciting and well-researched potential products of BSG fermentation, as they have multiple applications in the food, pharmaceutical, and chemical industries. Filamentous fungi are particularly appropriate for the production of enzymes for later extraction, because many of their plant cell-wall-degrading enzymes are secreted extracellularly into the substrate medium, allowing for their extraction without disrupting the fungal cells. Fungi are known to produce extracellular enzymes at higher concentrations, and thus their yield can be more significant on an industrial scale [88].

Due to the necessary amount of hemicellulose in its structure, xylanases and hemicellulases are among the enzymes that can be obtained using BSG as substrate. After eight days of growth on BSG, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, and *Talaromyces stipitatus* reached maximal xylanase activities, with the first producing the highest level of the enzyme (16.90 ± 0.59 U/mL) [89]. *Penicillium janczewskii* also expressed a substantial amount of xylanase, with 15.81 U/mL in submerged culture with BSG 2% for 7 days [90] and in solid-state fermentation with 40% (α -L-arabinofuranosidase) and 50% (xylanase and β -xylosidase) moisturized BSG cultures [91]. Another study conducted with *Moesziomyces aphidis* PYCC 5535T grown on BSG reached a remarkable 518.20 U/mL of xylanase volumetric activity, promising for biotechnological applications [92].

Typically, many enzymes exhibit enhanced activity at higher temperatures, inhibiting unwanted microbial growth in these conditions. However, many xylanolytic enzymes produced by fungi are not heat stable [93]. In general, most microbial enzymes used in industrial processes are mesophilic and are used from 35 to 60 °C, which can be a challenge if they are to be used for industrial purposes. Moreover, many of these studies have only proven the viability of lab-scale processes, and the scale-up of many of them may be unviable, requiring more studies to optimize its use on a larger scale.

3.2.5. Biofilms and Bioplastics

The concept of biorefinery can support the production of bioplastics by the industry since a single raw material can yield several products of high value. The integration of the various processes involved would reduce production costs. However, a higher implementation of biodegradable bioplastics by the industry requires the development of new technologies for production to become viable enough to compete with conventional plastics [94]. BSG contains significant amounts of hemicellulose (mostly arabinoxylans) in its composition, making it an essential raw material for bioplastics. Oligosaccharides obtained from the hydrolysis of water-soluble arabinoxylans have prebiotic effects, making them suitable as functional ingredients in encapsulating active compounds for active/edible food packaging [95].

Hemicellulose is a polymer with a significant potential application for the development of bioplastics. For example, a bioplastic based on xylan and blended with gelatin was biodegraded entirely after 15 days of conditioning, being considered 100% biodegradable since the sample could not be recovered for weighing [96]. BSG biofilms also demonstrate an essential role in the manufacturing of active food packaging. A nanocomposite biofilm prepared with BSG arabinoxylans showed good thermal stability (230 °C max), besides antioxidant activity up to 90% (DPPH activity), antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and antifungal activity towards *Candida albicans* [97]. Pérez-Flores et al. [98] also developed a biofilm using the arabinoxylans of BSG, with glycerol as a plasticizer, and applied it as a release matrix for caffeine. The biofilm showed acceptable mechanical and morphological properties, and a diffusion control mainly released the caffeine with minimum residue.

The challenges for applying hemicellulose-based biofilms are their heterogeneity, low mechanical properties, difficulty forming homogeneous bioplastics, and hydrophilic properties, which demand more focused studies to achieve feasible production [99]. Chemical changes in hemicellulose and blends with other polymers are alternatives for surpassing the difficulties in its use. Gordobil et al. [100] demonstrated that adding nanocellulose to xylan-based bioplastics can increase its mechanical properties and hydrophobicity. Gluten [101], micro cellulose [102], chitosan [103], and plasticizers such as polypropylene glycol [56], glycerol, xylitol, and sorbitol [104] were also reported as promising alternatives for improving the mechanical properties of hemicellulose-based bioplastics.

3.2.6. Furan Derivatives (Furfural and Furfuryl Alcohol)

Furan derivatives are important platform compounds for preparing biofuels, polymers, and pharmaceuticals. They are the main chemicals industrially obtained from hemicelluloses, with furfural being the most appealing due to its versatility. The furfural molecule has an aldehyde group and a dienyl ether functional group, so it can be hydrogenated, oxidized, chlorinated, nitrated, and condensed to produce more than 1600 derivatives. Due to its versatility, the global furfural market size is expected to reach USD 954.36 million by 2030, registering a CAGR of 7.0% from 2023 to 2030 [96]. Downstream products derived from furfural include furfuryl alcohol (a chemical building block for cleaning composites, drug synthesis, viscosity condenser for epoxy resins, paint strippers, and wood modification), furan, tetrahydrofuran, succinic acid, maleic anhydride, and levulinic acid. Among these, about 60–70% of furfural is converted to furfuryl alcohol through catalytic hydrogenation, which makes furfuryl alcohol the main industrial green chemical produced from hemicelluloses [97]. The global furfuryl alcohol market size is estimated to reach USD 821.6 million by 2028, according to a new report by Global Information, Inc. (2023) [105], and expected to expand at a CAGR of 7.2% from 2021 to 2028.

The dissolution and conversion of hemicellulose into furfural occur under harsh conditions. Employing a catalyst during the first step can significantly improve the reaction rate of hemicellulose hydrolysis and subsequent pentose dehydration to furfural, contributing to increased product purity and yield [106]. The obtention of furfural via catalytic systems can be achieved using homogeneous or heterogeneous catalysts (Table 4). Current indus-

trial furfural production mainly involves the use of a homogeneous catalyst such as sulfuric acid in low concentrations (3–6%), in batch or continuous reactors, and using high constant temperatures (between 180 and 230 °C) [107]. This technology has some drawbacks, including the limited furfural yields (55% average) due to undesired side reactions—such as resinification, condensation (cross-polymerization), and fragmentation reactions—the high steam consumption, and the equipment corrosion or requirements for high-cost materials due to the use of hot mineral acid [108]. Among organic acids, formic acid is mainly used to produce furfural. In addition, formic acid is produced during furfural production via decomposition reactions of hemicellulose and furfural, leading to an auto-catalyst system and reducing production costs [109].

Table 4. Application of heterogeneous and homogeneous catalysts in furfural production from different substrates (adapted from Ye et al.) [110].

| Substrate | Catalyst | Type of Catalyst | Yield (%) | Reference |
|-------------|-----------------------------------|------------------|-----------|-----------|
| Cornbob | H-ZSM-5 | Heterogeneous | 71.7 | [111] |
| Corn stover | MSPFR ¹ | Heterogeneous | 50.3 | [112] |
| Wheat straw | CrPO ₄ | Heterogeneous | 67.0 | [113] |
| Bagasse | H-USY | Heterogeneous | 55.0 | [114] |
| Xylan | GO-SO ₃ H ² | Heterogeneous | 87.0 | [115] |
| Xylose | FePO ₄ | Heterogeneous | 88.7 | [116] |
| Bamboo | HCl | Homogeneous | 46.0 | [117] |
| Eucalyptus | AlCl ₃ | Homogeneous | 70.3 | [118] |
| Xylose | NaCl | Homogeneous | 76.7 | [119] |
| Tung shell | H ₃ NSO ₃ | Homogeneous | 92.2 | [120] |
| Switchgrass | H ₂ SO ₄ | Homogeneous | 84.0 | [121] |

¹ p-hydroxybenzenesulfonic acid-formaldehyde resin acid catalyst. ² Sulfonated graphene oxide.

Heterogeneous catalysts would be beneficial because of the principles of green chemistry. Compared with homogeneous catalysts, they are reusable, which solves the problems of separation and recycling. Several have been widely studied, including metal oxide, metal salts, hetero-poly acids, natural clay minerals, and ion exchange resins. The stability and recycling performance of solid catalysts will tend to be the focus of researchers in the coming years [106].

The formation process of furfural can occur in one or two steps (Figure 6). The one-step (“one-pot”) process involves the hydrolysis of arabinoxylans to xylose monomers and simultaneous dehydration to furfural. Rozefelde et al. [122] performed a catalytic hydrothermal treatment using aluminum sulfate (Al₂(SO₄)₃). They reported that the increase in this salt catalyst leads to the formation of high furfural and glucose yields, showing that it is possible to directly convert hemicelluloses into value-added products while enhancing the glucose content of the media for further transformations. The two-step process involves hydrolysis of pentosans under mild conditions and subsequent dehydration of xylose into furfural. The two-step process produces a higher furfural yield than the one-step process [109].

Despite rising demand for furfural, current manufacturing procedures are costly, energy-intensive, and not environmentally friendly [123,124]. The use of lignocellulosic biomass, such as BSG, more specifically its hemicellulosic portion, despite being a good alternative towards green chemistry, has not yet been shown to be sufficient to make the process viable. Additional research into scaling-up challenges, potential biological implements in furfural production, and optimization of catalysts are critical topics of research for the coming years.

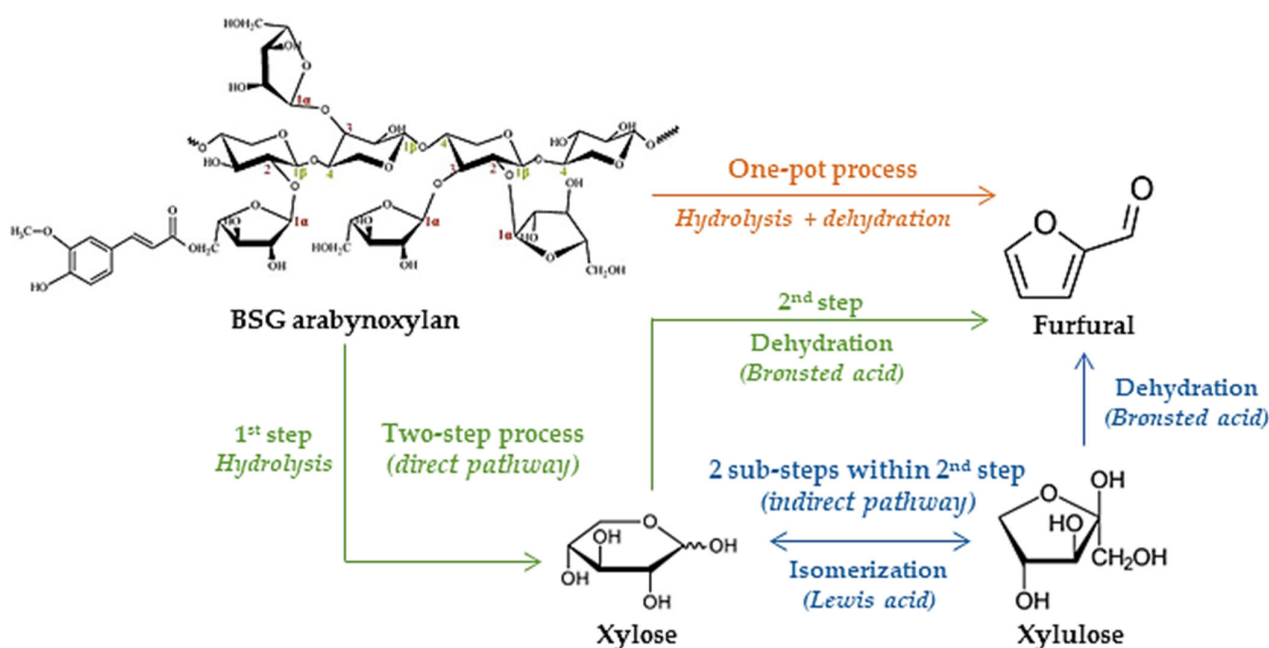


Figure 6. “One-pot” and “two-step” furfural production pathways.

3.3. The Use of Catalysts in Hemicellulosic Biorefinery: What's Next?

The extensive use of BSG hemicelluloses in biorefineries is still very limited to a few products, such as XOS and xylitol, and is linked to scientific research that seeks to make such processes viable for industrial use. Developing possible catalysis mechanisms targeting the heterogeneous characteristics of different biomasses is a challenge for implementing this technology on a larger scale [125].

Homogeneous catalysts, such as minerals and organic acids, are well-established strategies used in the industry to increase the productivity and consequent competitiveness of products derived from various types of biomass. Minerals and diluted organic acids are often used as catalysts to obtain hemicellulose monomers (xylose, arabinose) and valuable products. In contrast, metal salts (Lewis acids) recently showed potential to be used for this purpose [8]. However, despite having excellent yields for production, homogeneous catalysts have the drawbacks of being difficult to recover and generating undesirable reaction byproducts, which leads to environmental concerns. Thus, the employment of chemical and biocatalysts (enzymes) in the processing of lignocellulosic biomass is a field of study in constant development.

Therefore, using heterogeneous catalysts has several advantages, such as the easy recovery of the catalyst, high reuse potential, and low waste generation. However, regarding the hydrolysis of polysaccharides, mass transfer limitation between the solid polysaccharides and SAC is the most significant limiting factor for extensive use since this implies a lower product yield. In addition, the polysaccharide chains in hemicellulose are quite heterogeneous and may be constituted by glucuronoxylan, arabinogalactan and other galactans, mannans, and xylans [126], which means that a catalyst designed for one biomass may not be fit for use with another. The design of SAC for hydrolysis, such as for polysaccharides, is challenging, demanding characteristics such as solid binding sites for adsorption, strong acid sites for degradation, and high specific surface areas to enhance the catalytic activities [7,8]. Another aspect that needs to be considered when developing HTC is the necessity to use aqueous-phase processes to convert hemicellulose into bioproducts. Hence, the catalyst must be chemically and structurally stable under this condition, especially its surface acidity [127].

Enzymes are biocatalysts utilized mainly in the industry for the most diverse purposes. These molecules are biocompatible, biodegradable, safe, and derived from renewable resources. The hydrolysis of hemicellulose demands the activity of several enzymes simultane-

ously, including endoxylanase, xylan 1,4-b-xylan esterases, ferulic and p-coumaric esterases, α -1-arabinofuranosidases, α -glucuronidase, α -arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase and α -4-O-methyl glucuronosidases xylosidase. The use of biocatalysts in biorefineries has many advantages, such as mild reaction conditions, fewer effluents, low energy demand, and high specificity. However, it requires long reaction times, usually days, so it is rarely used on an industrial scale for this purpose. Another drawback related to biocatalysis is that enzymes are water soluble and thermo-degraded, making it difficult to recover them from the high-temperature aqueous media generally used in lignocellulosic biorefineries.

Although enzymatic immobilization solves problems related to recovery and stability, the technique has not been widely applied because immobilization can impact the catalytic performance of the enzyme [128,129]. Consequently, most enzymes are currently involved in single-use processes, which is unsuitable for environmental and cost-related reasons. Currently, the use of nanomaterials, such as magnetic/carbonaceous materials and metal-organic frameworks, bioprospecting of native yeasts strains, and techniques of genetic engineering (such as directed evolution, gene editing, and heterologous expression) are being explored to improve thermal and pH stability, resistance to inhibitors, regenerative capacity, activity, and the reusability of different enzymes, showing positive and promising results [8,130,131].

4. Conclusions

The residue of the brewing process, BSG, is a lignocellulosic biomass with great potential for use in second-generation biorefineries. Its structure contains an essential amount of hemicelluloses, a polysaccharide of heterogeneous form consisting mainly of xylose, arabinose, and uronic acids that can be transformed into value-added bioproducts such as xylooligosaccharides (XOS), xylitol, second-generation ethanol, enzymes, biofilms, and furan derivatives, such as furfural and furfuryl alcohol through catalyzed bioprocesses.

The use of catalysts is crucial to improve the feasibility of biorefinery processes. Homogeneous catalysts, such as mineral and organic acids, are well-established and widely used strategies. However, methods involving heterogeneous and biocatalysts (enzymes) are gaining more attention due to their advantages related to the growing environmental concern surrounding industrial processes. Despite this, studies still need to advance to make these methods viable on a large scale, especially regarding these molecules' recovery, reuse, and stability.

Lignocellulosic-based biorefineries are ecologically sustainable alternatives that have been the subject of studies in the diverse areas of science for years now. Currently, one of the main challenges for the actual implementation of this concept is to enable its processes to become competitive against the traditional industry so that we can finally achieve a circular economy and secure the sustainable future of this planet.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.S., S.L.A.J. and J.P.B.; writing—original draft preparation, A.R.S. and A.P.D.; writing—review, editing and supervision, S.L.A.J., J.P.B. and H.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by grants and fellowships from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant number 302484/2022-1); the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); the Bioprocess and Biotechnology for Food Research Center (Biofood), which is funded through the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS, grant number 22/2551-0000397-4); and the Research Promotion Program and the Support Program for Scientific and Technological Initiation from the Federal University of Fronteira Sul.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing does not apply to this article.

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

References

1. Dahmen, N.; Lewandowski, I.; Zibek, S.; Weidtmann, A. Integrated Lignocellulosic Value Chains in a Growing Bioeconomy: Status Quo and Perspectives. *GCB Bioenergy* **2019**, *11*, 107–117. [[CrossRef](#)]
2. Ajala, E.O.; Ighalo, J.O.; Ajala, M.A.; Adeniyi, A.G.; Ayanshola, A.M. Sugarcane Bagasse: A Biomass Sufficiently Applied for Improving Global Energy, Environment and Economic Sustainability. *Bioresour. Bioprocess.* **2021**, *8*, 87. [[CrossRef](#)]
3. Borrero-López, A.M.; Valencia, C.; Franco, J.M. Lignocellulosic Materials for the Production of Biofuels, Biochemicals and Biomaterials and Applications of Lignocellulose-Based Polyurethanes: A Review. *Polymers* **2022**, *14*, 881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Huang, C.; Xu, C.; Meng, X.; Wang, L.; Zhou, X. Editorial: Isolation, Modification, and Characterization of the Constituents (Cellulose, Hemicellulose, Lignin; et al.) in Biomass and Their Bio-Based Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 616. [[CrossRef](#)]
5. Candido, J.P.; Freitas, C.; Schmatz, A.A.; Felipuci, J.P.; de Oliveira Leite, D.A.N.; de Franceschi de Angelis, D.; Brienzo, M. Hemicellulose Sugar Fermentation: Hydrolysate Challenges, Microorganisms, and Value-Added Products. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 337–360.
6. Melati, R.B.; de Freitas, C.; Brienzo, M. Analytical Techniques Applied to Hemicellulose Structure and Functional Characterization. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 139–170.
7. Gómez Millán, G.; Hellsten, S.; Llorca, J.; Luque, R.; Sixta, H.; Balu, A.M. Recent Advances in the Catalytic Production of Platform Chemicals from Holocellulosic Biomass. *ChemCatChem* **2019**, *11*, 2022–2042. [[CrossRef](#)]
8. Deng, W.; Feng, Y.; Fu, J.; Guo, H.; Guo, Y.; Han, B.; Jiang, Z.; Kong, L.; Li, C.; Liu, H.; et al. Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass into Chemicals and Fuels. *Green Energy Environ.* **2023**, *8*, 10–114. [[CrossRef](#)]
9. de Jesus Costa, T.; Inô, M.M.O.; Kunz, V.R.; Barros, F.C. De Reaproveitamento De Resíduos Sólidos Da Indústria Cervejeira: Bagaço De Malte Extrusado Para A Produção De Produtos Alimentícios. In *Avanços e Desafios da Nutrição 4*; Atena Editora: Ponta Grossa, Brazil, 2019; pp. 269–278.
10. Mussatto, S.I. Brewer's Spent Grain: A Valuable Feedstock for Industrial Applications. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 1264–1275. [[CrossRef](#)]
11. Zeko-Pivač, A.; Tišma, M.; Žnidaršič-Plazl, P.; Kulisic, B.; Sakellaris, G.; Hao, J.; Planinić, M. The Potential of Brewer's Spent Grain in the Circular Bioeconomy: State of the Art and Future Perspectives. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 959. [[CrossRef](#)]
12. Lisci, S.; Tronci, S.; Grosso, M.; Karring, H.; Hajrizaj, R.; Errico, M. Brewer's Spent Grain: Its Value as Renewable Biomass and Its Possible Applications. *Chem. Eng. Trans.* **2022**, *92*, 259–264. [[CrossRef](#)]
13. Fărcaș, A.C.; Socaci, S.A.; Chiș, M.S.; Pop, O.L.; Fogarasi, M.; Păucean, A.; Igual, M.; Michiu, D. Reintegration of Brewers Spent Grains in the Food Chain: Nutritional, Functional and Sensorial Aspects. *Plants* **2021**, *10*, 2504. [[CrossRef](#)]
14. Macias-Garbett, R.; Serna-Hernández, S.O.; Sosa-Hernández, J.E.; Parra-Saldívar, R. Phenolic Compounds From Brewer's Spent Grains: Toward Green Recovery Methods and Applications in the Cosmetic Industry. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, 196. [[CrossRef](#)]
15. Bianco, A.; Budroni, M.; Zara, S.; Mannazzu, I.; Fancello, F.; Zara, G. The Role of Microorganisms on Biotransformation of Brewers' Spent Grain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8661–8678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Massardi, M.M.; Massini, R.M.M.; de Jesus Silva, D. Caracterização química do bagaço de malte e avaliação do seu potencial para obtenção de produtos de valor agregado. *J. Eng. Exact Sci.* **2020**, *6*, 83–91. [[CrossRef](#)]
17. Wilkinson, S.; Smart, K.A.; Cook, D.J. A Comparison of Dilute Acid- and Alkali-Catalyzed Hydrothermal Pretreatments for Bioethanol Production from Brewers' Spent Grains. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2018**, *72*, 143–153. [[CrossRef](#)]
18. Rojas-Chamorro, J.A.; Romero, I.; López-Linares, J.C.; Castro, E. Brewer's Spent Grain as a Source of Renewable Fuel through Optimized Dilute Acid Pretreatment. *Renew. Energy* **2020**, *148*, 81–90. [[CrossRef](#)]
19. Silbir, S.; Goksungur, Y. Natural Red Pigment Production by *Monascus Purpureus* in Submerged Fermentation Systems Using a Food Industry Waste: Brewer's Spent Grain. *Foods* **2019**, *8*, 161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Tiwari, S.; Yadav, J.; Gaur, R.; Singh, R.; Verma, T.; Yadav, J.S.; Pandey, P.K.; Rath, S.K. Multistep Structural and Chemical Evaluation of Sugarcane Bagasse, Pretreated with Alkali for Enhancing the Enzymatic Saccharification by Cellulase and Xylanase of the *Pseudomonas* Sp. CVB-10 (MK443365) and *Bacillus Paramycoides* T4 (MN370035) Mix-Culture System. *Front. Energy Res.* **2022**, *9*, 891.
21. Saeed, H.A.M.; Liu, Y.; Chen, H. Exploring Sudanese Agricultural Residues as Alternative Fibres for Pulp and Paper Manufacturing. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *368*, 012030. [[CrossRef](#)]
22. Senthil Kumar, P.; Ramakrishnan, K.; Dinesh Kirupha, S.; Sivanesan, S. Thermodynamic and Kinetic Studies of Cadmium Adsorption from Aqueous Solution onto Rice Husk. *Braz. J. Chem. Eng.* **2010**, *27*, 347–355. [[CrossRef](#)]
23. Pabbathi, N.P.P.; Velidandi, A.; Pogula, S.; Gandam, P.K.; Baadhe, R.R.; Sharma, M.; Sirohi, R.; Thakur, V.K.; Gupta, V.K. Brewer's Spent Grains-Based Biorefineries: A Critical Review. *Fuel* **2022**, *317*, 123435. [[CrossRef](#)]
24. Sganzerla, W.G.; Ampese, L.C.; Mussatto, S.I.; Forster-Carneiro, T. A Bibliometric Analysis on Potential Uses of Brewer's Spent Grains in a Biorefinery for the Circular Economy Transition of the Beer Industry. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2021**, *15*, 1965–1988. [[CrossRef](#)]
25. Puligundla, P.; Mok, C. Recent Advances in Biotechnological Valorization of Brewers' Spent Grain. *Food Sci. Biotechnol.* **2021**, *30*, 341–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Abraham, A.; Mathew, A.K.; Park, H.; Choi, O.; Sindhu, R.; Parameswaran, B.; Pandey, A.; Park, J.H.; Sang, B.I. Pretreatment Strategies for Enhanced Biogas Production from Lignocellulosic Biomass. *Bioresour. Technol.* **2020**, *301*, 122725. [CrossRef]
27. Buller, L.S.; Sganzerla, W.G.; Lima, M.N.; Muenchow, K.E.; Timko, M.T.; Forster-Carneiro, T. Ultrasonic Pretreatment of Brewers' Spent Grains for Anaerobic Digestion: Biogas Production for a Sustainable Industrial Development. *J. Clean Prod.* **2022**, *355*, 131802. [CrossRef]
28. Zhang, R.; Gao, H.; Wang, Y.; He, B.; Lu, J.; Zhu, W.; Peng, L.; Wang, Y. Challenges and Perspectives of Green-like Lignocellulose Pretreatments Selectable for Low-Cost Biofuels and High-Value Bioproduction. *Bioresour. Technol.* **2023**, *369*, 128315. [CrossRef] [PubMed]
29. Lu, Y.; He, Q.; Fan, G.; Cheng, Q.; Song, G. Extraction and Modification of Hemicellulose from Lignocellulosic Biomass: A Review. *Green Process. Synth.* **2021**, *10*, 779–804. [CrossRef]
30. Ujor, V.C.; Okonkwo, C.C. Microbial Detoxification of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates: Biochemical and Molecular Aspects, Challenges, Exploits and Future Perspectives. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 2125. [CrossRef]
31. Arranz, J.I.; Miranda, M.T.; Sepúlveda, F.J.; Montero, I.; Rojas, C.V. Analysis of Drying of Brewers' Spent Grain. *Proceedings* **2018**, *2*, 1467. [CrossRef]
32. Mitri, S.; Salameh, S.J.; Khelfa, A.; Leonard, E.; Maroun, R.G.; Louka, N.; Koubaa, M. Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. *Fermentation* **2022**, *8*, 50. [CrossRef]
33. Ravindran, R.; Jaiswal, S.; Abu-Ghannam, N.; Jaiswal, A.K. A Comparative Analysis of Pretreatment Strategies on the Properties and Hydrolysis of Brewers' Spent Grain. *Bioresour. Technol.* **2018**, *248*, 272–279. [CrossRef] [PubMed]
34. Bedó, S.; Rozbach, M.; Nagy, L.; Fehér, A.; Fehér, C. Optimised Fractionation of Brewer's Spent Grain for a Biorefinery Producing Sugars, Oligosaccharides, and Bioethanol. *Processes* **2021**, *9*, 366. [CrossRef]
35. Guo, W.; Bruining, H.C.; Heeres, H.J.; Yue, J. Efficient Synthesis of Furfural from Xylose over HCl Catalyst in Slug Flow Microreactors Promoted by NaCl Addition. *AIChE J.* **2022**, *68*, e17606. [CrossRef]
36. Takkellapati, S.; Li, T.; Gonzalez, M.A. An Overview of Biorefinery-Derived Platform Chemicals from a Cellulose and Hemicellulose Biorefinery. *Clean Technol. Environ. Policy* **2018**, *20*, 1615–1630. [CrossRef]
37. Nzediegwu, E.; Pérez-Venegas, M.; Auclair, K.; Dumont, M.J. Semisynthetic Production of Hydroxymethylfurfural and Furfural: The Benefits of an Integrated Approach. *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, *10*, 108515. [CrossRef]
38. Cheng, B.; Zhang, X.; Lin, Q.; Xin, F.; Sun, R.; Wang, X.; Ren, J. A New Approach to Recycle Oxalic Acid during Lignocellulose Pretreatment for Xylose Production. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 324. [CrossRef]
39. Świątek, K.; Gaag, S.; Klier, A.; Kruse, A.; Sauer, J.; Steinbach, D. Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Sugars and Furfurals Formation. *Catalysts* **2020**, *10*, 437. [CrossRef]
40. Zhou, S.; Zhang, M.; Zhu, L.; Zhao, X.; Chen, J.; Chen, W.; Chang, C. Hydrolysis of Lignocellulose to Succinic Acid: A Review of Treatment Methods and Succinic Acid Applications. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* **2023**, *16*, 1. [CrossRef]
41. Shao, H.; Zhao, Y.; Sun, H.; Yang, B.; Fan, B.; Zhang, H.; Weng, Y. Barrier Film of Etherified Hemicellulose from Single-Step Synthesis. *Polymers* **2020**, *12*, 2199. [CrossRef]
42. Kavalopoulos, M.; Stoumpou, V.; Christofi, A.; Mai, S.; Barampouti, E.M.; Moustakas, K.; Malamis, D.; Loizidou, M. Sustainable Valorisation Pathways Mitigating Environmental Pollution from Brewers' Spent Grains. *Environ. Pollut.* **2021**, *270*, 116069. [CrossRef]
43. Martins, J.R.; Abe, M.M.; Brienzo, M. Chemical Modification Strategies for Developing Functionalized Hemicellulose. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 171–205.
44. Fernández-Delgado, M.; Plaza, P.E.; Coca, M.; García-Cubero, M.T.; González-Benito, G.; Lucas, S. Comparison of Mild Alkaline and Oxidative Pretreatment Methods for Biobutanol Production from Brewer's Spent Grains. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *130*, 409–419. [CrossRef]
45. De Freitas, C.; Terrone, C.C.; Forsan, C.F.; Milagres, A.M.F.; Brienzo, M. Oligosaccharides from Lignocellulosic Biomass and Their Biological and Physicochemical Properties. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 275–309.
46. Parchami, M.; Ferreira, J.A.; Taherzadeh, M.J. Starch and Protein Recovery from Brewer's Spent Grain Using Hydrothermal Pretreatment and Their Conversion to Edible Filamentous Fungi—A Brewery Biorefinery Concept. *Bioresour. Technol.* **2021**, *337*, 125409. [CrossRef]
47. Scapini, T.; dos Santos, M.S.N.; Bonatto, C.; Wancura, J.H.C.; Mulinari, J.; Camargo, A.F.; Klanovicz, N.; Zabet, G.L.; Tres, M.V.; Fongaro, G.; et al. Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Hemicellulose Recovery. *Bioresour. Technol.* **2021**, *342*, 126033. [CrossRef]
48. Martín, C.; Dixit, P.; Momayez, F.; Jönsson, L.J. Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks to Facilitate Biochemical Conversion. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 148. [CrossRef]
49. Cardoso, F.; Castrillo, V.S.; Bueno, D.; Schmatz, A.A.; de Freitas, C.; Brienzo, M. Processo Organosolv Modificado Para Obtenção de Hemicelulose e Lignina. 2022. Available online: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/237046> (accessed on 27 February 2023).
50. Felipuci, J.P.; Angelis, D.A.D.; Brienzo, M. Método de Extração de Hemicelulose Por Associação de Processo Biológico e Químico. 2022. Available online: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/237049> (accessed on 27 February 2023).

51. Liu, L.; Chen, M.; Coldea, T.E.; Yang, H.; Zhao, H. Emulsifying Properties of Arabinoxylans Derived from Brewers' Spent Grain by Ultrasound-Assisted Extraction: Structural and Functional Properties Correlation. *Cellulose* **2023**, *30*, 359–372. [[CrossRef](#)]
52. Amorim, C.; Silvério, S.C.; Rodrigues, L.R. One-Step Process for Producing Prebiotic Arabino-Xylooligosaccharides from Brewer's Spent Grain Employing *Trichoderma* Species. *Food Chem.* **2019**, *270*, 86–94. [[CrossRef](#)]
53. Swart, L.J.; Bedzo, O.K.K.; van Rensburg, E.; Görgens, J.F. Pilot-Scale Xylooligosaccharide Production through Steam Explosion of Screw Press–Dried Brewers' Spent Grains. *Biomass Convers. Biorefin.* **2022**, *12*, 1295–1309. [[CrossRef](#)]
54. Martínez-Encinas, E.G.; Carvajal-Millán, E.; Calderón de la Barca, A.M.; Rascón-Chu, A.; Martínez-Porchas, M.; Márquez-Escalante, J.A.; Islas-Rubio, A.R. Extraction and Characterization of Arabinoxylans Obtained from Nixtamalized Brewers' Spent Grains. *Food Sci. Technol. Int.* **2021**, *29*, 40–49. [[CrossRef](#)]
55. Da Silva, E.G.; Borges, A.S.; Maione, N.R.; Castiglioni, G.L.; Suarez, C.A.G.; Montano, I.D.C. Fermentation of Hemicellulose Liquor from Brewer's Spent Grain Using *Scheffersomyces stipitis* and *Pachysolen tannophilus* for Production of 2G Ethanol and Xylitol. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2020**, *14*, 127–137. [[CrossRef](#)]
56. Jaguey-Hernández, Y.; Tapia-Ignacio, C.; Aguilar-Arteaga, K.; González-Olivares, L.G.; Castañeda-Ovando, E.P.; Cruz-Cansino, N.; Ojeda-Ramirez, D.; Castañeda-Ovando, A. Thermoplastic Biofilms Obtained from an Arabinoxylan-Rich Fraction from Brewers' Spent Grain: Physicochemical Characterization and Thermal Analysis. *Biomass Convers. Biorefin.* **2022**, *1*, 1–13. [[CrossRef](#)]
57. Rojas-Pérez, L.C.; Narváez-Rincón, P.C.; Rocha, M.A.M.; Coelho, E.; Coimbra, M.A. Production of Xylose through Enzymatic Hydrolysis of Glucuronarabinoxylan from Brewers' Spent Grain. *Bioresour. Bioprocess.* **2022**, *9*, 105. [[CrossRef](#)]
58. Cervantes-Ramirez, J.G.; Vasquez-Lara, F.; Sanchez-Estrada, A.; Troncoso-Rojas, R.; Heredia-Olea, E.; Islas-Rubio, A.R. Arabinoxylans Release from Brewers' Spent Grain Using Extrusion and Solid-State Fermentation with *Fusarium oxysporum* and the Antioxidant Capacity of the Extracts. *Foods* **2022**, *11*, 1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. López-Linares, J.C.; Lucas, S.; García-Cubero, M.T.; Jiménez, J.J.; Coca, M. A Biorefinery Based on Brewer's Spent Grains: Arabinoxylans Recovery by Microwave Assisted Pretreatment Integrated with Butanol Production. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *158*, 113044. [[CrossRef](#)]
60. Parchami, M.; Agnihotri, S.; Taherzadeh, M.J. Aqueous Ethanol Organosolv Process for the Valorization of Brewer's Spent Grain (BSG). *Bioresour. Technol.* **2022**, *362*, 127764. [[CrossRef](#)]
61. Li, H.; Wang, J.; He, J.; Pan, H.; Alonso-Riaño, P.; Amândio, M.S.T.; Xavier, A.M.R.B.; Beltrán, S.; Sanz, M.T.; Bañuelos, M. Subcritical Water as Pretreatment Technique for Bioethanol Production from Brewers' Spent Grain within a Biorefinery Concept. *Polymers* **2022**, *14*, 5218. [[CrossRef](#)]
62. Vilcocq, L.; Castilho, P.C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C. Hydrolysis of Oligosaccharides Over Solid Acid Catalysts: A Review. *ChemSusChem* **2014**, *7*, 1010–1019. [[CrossRef](#)]
63. Yang, T.; Li, W.; Ogunbiyi, A.T.; An, S. Efficient Catalytic Conversion of Corn Stover to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural Using Glucosamine Hydrochloride Derived Carbon Solid Acid in γ -Valerolactone. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *161*, 113173. [[CrossRef](#)]
64. Salmi, T.; Murzin, D.; Wärnå, J.; Mäki-Arvela, P.; Kusema, B.; Holmbom, B.; Willför, S. Hemicellulose Hydrolysis in the Presence of Heterogeneous Catalysts. *Top Catal.* **2014**, *57*, 1470–1475. [[CrossRef](#)]
65. Yuan, Z.; Dai, W.; Zhang, S.; Wang, F.; Jian, J.; Zeng, J.; Zhou, H. Heterogeneous Strategies for Selective Conversion of Lignocellulosic Polysaccharides. *Cellulose* **2022**, *29*, 3059–3077. [[CrossRef](#)]
66. Qin, L.; Ma, J.; Tian, H.; Ma, Y.; Wu, Q.; Cheng, S.; Fan, G. Production of Xylooligosaccharides from Jiuzao by Autohydrolysis Coupled with Enzymatic Hydrolysis Using a Thermostable Xylanase. *Foods* **2022**, *11*, 2663. [[CrossRef](#)]
67. Sajib, M.; Falck, P.; Sardari, R.R.R.; Mathew, S.; Grey, C.; Karlsson, E.N.; Adlercreutz, P. Valorization of Brewer's Spent Grain to Prebiotic Oligosaccharide: Production, Xylanase Catalyzed Hydrolysis, in-Vitro Evaluation with Probiotic Strains and in a Batch Human Fecal Fermentation Model. *J. Biotechnol.* **2018**, *268*, 61–70. [[CrossRef](#)]
68. Swart, L.J.; Bedzo, O.K.K.; van Rensburg, E.; Görgens, J.F. Intensification of Xylo-Oligosaccharides Production by Hydrothermal Treatment of Brewer's Spent Grains: The Use of Extremely Low Acid Catalyst for Reduction of Degradation Products Associated with High Solid Loading. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *193*, 1979–2003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Poletto, P.; Pereira, G.N.; Monteiro, C.R.M.; Pereira, M.A.F.; Bordignon, S.E.; de Oliveira, D. Xylooligosaccharides: Transforming the Lignocellulosic Biomasses into Valuable 5-Carbon Sugar Prebiotics. *Process Biochem.* **2020**, *91*, 352–363. [[CrossRef](#)]
70. Delgado Arcaño, Y.; Valmaña García, O.D.; Mandelli, D.; Carvalho, W.A.; Magalhães Pontes, L.A. Xylitol: A Review on the Progress and Challenges of Its Production by Chemical Route. *Catal. Today* **2020**, *344*, 2–14. [[CrossRef](#)]
71. Xu, Y.; Chi, P.; Bilal, M.; Cheng, H. Biosynthetic Strategies to Produce Xylitol: An Economical Venture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 5143–5160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Yadav, M.; Mishra, D.K.; Hwang, J.S. Catalytic Hydrogenation of Xylose to Xylitol Using Ruthenium Catalyst on NiO Modified TiO₂ Support. *Appl. Catal. A Gen.* **2012**, *425–426*, 110–116. [[CrossRef](#)]
73. Ullah, N.; Jérôme, F.; De Oliveira Vigier, K. Hydrogenation of Xylose to Xylitol in the Presence of Bimetallic Nanoparticles Ni₃Fe Catalyst in the Presence of Choline Chloride. *Catalysts* **2022**, *12*, 841. [[CrossRef](#)]
74. Audemar, M.; Ramdani, W.; Junhui, T.; Raluca Ifrim, A.; Ungureanu, A.; Jérôme, F.; Royer, S.; de Oliveira Vigier, K. Selective Hydrogenation of Xylose to Xylitol over Co/SiO₂ Catalysts. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 1973–1978. [[CrossRef](#)]
75. Xia, H.; Zhang, L.; Hu, H.; Zuo, S.; Yang, L. Efficient Hydrogenation of Xylose and Hemicellulosic Hydrolysate to Xylitol over Ni-Re Bimetallic Nanoparticle Catalyst. *Nanomaterials* **2019**, *10*, 73. [[CrossRef](#)]

76. Umai, D.; Kayalvizhi, R.; Kumar, V.; Jacob, S. Xylitol: Bioproduction and Applications—A Review. *Front. Sustain.* **2022**, *3*, 2. [[CrossRef](#)]
77. Ruiz, H.A.; Rempel, A.; Cerqueira, M.A.; Camargo, A.F.; Gullón, P.; Scapini, T.; Rodríguez-Jasso, R.M.; Colla, L.; Gullón, B.; Treichel, H. Sustainable Biorefinery Processing for Hemicellulose Fractionation and Bio-Based Products in a Circular Bioeconomy. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 39–69.
78. Mussatto, S.I.; Roberto, I.C. Acid Hydrolysis and Fermentation of Brewer's Spent Grain to Produce Xylitol. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 2453–2460. [[CrossRef](#)]
79. Dávila, J.A.; Rosenberg, M.; Cardona, C.A.; Dávila, J.A.; Rosenberg, M.; Cardona, C.A. A Biorefinery Approach for the Production of Xylitol, Ethanol and Polyhydroxybutyrate from Brewer's Spent Grain. *AIMS Agric. Food* **2016**, *1*, 52–66. [[CrossRef](#)]
80. Swart, L.J.; Petersen, A.M.; Bedzo, O.K.K.; Görgens, J.F. Techno-Economic Analysis of the Valorization of Brewers Spent Grains: Production of Xylitol and Xylo-Oligosaccharides. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2021**, *96*, 1632–1644. [[CrossRef](#)]
81. Araújo, D.; Costa, T.; Freitas, F. Biovalorization of Lignocellulosic Materials for Xylitol Production by the Yeast *Komagataella Pastoris*. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 5516. [[CrossRef](#)]
82. Pascual, A.R.; Víctor, E.E.; Martín, C.; Broda, M.; Yelle, D.J.; Serwá Nska, K. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. *Molecules* **2022**, *27*, 8717. [[CrossRef](#)]
83. Correa, C.; Alves, Y.A.; Souza, C.G.; Boloy, R.A.M. Brazil and the World Market in the Development of Technologies for the Production of Second-Generation Ethanol. *Alex. Eng. J.* **2023**, *67*, 153–170. [[CrossRef](#)]
84. Ha, S.J.; Galazka, J.M.; Kim, S.R.; Choi, J.H.; Yang, X.; Seo, J.H.; Glass, N.L.; Cate, J.H.D.; Jin, Y.S. Engineered *Saccharomyces Cerevisiae* Capable of Simultaneous Cellobiose and Xylose Fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 504–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Tadioto, V.; Deoti, J.R.; Müller, C.; de Souza, B.R.; Fogolari, O.; Purificação, M.; Giehl, A.; Deoti, L.; Lucaroni, A.C.; Matsushika, A.; et al. Prospecting and Engineering Yeasts for Ethanol Production under Inhibitory Conditions: An Experimental Design Analysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2022**, *1*, 1–13. [[CrossRef](#)]
86. Narisetty, V.; Cox, R.; Bommareddy, R.; Agrawal, D.; Ahmad, E.; Pant, K.K.; Chandel, A.K.; Bhatia, S.K.; Kumar, D.; Binod, P.; et al. Valorisation of Xylose to Renewable Fuels and Chemicals, an Essential Step in Augmenting the Commercial Viability of Lignocellulosic Biorefineries. *Sustain. Energy Fuels* **2021**, *6*, 29–65. [[CrossRef](#)]
87. Rojas-Chamorro, J.A.; Cara, C.; Romero, I.; Ruiz, E.; Romero-García, J.M.; Mussatto, S.I.; Castro, E. Ethanol Production from Brewers' Spent Grain Pretreated by Dilute Phosphoric Acid. *Energy Fuels* **2018**, *32*, 5226–5233. [[CrossRef](#)]
88. Marcus, A.; Fox, G.; Grassi, S.; Paciulli, M. Fungal Biovalorization of a Brewing Industry Byproduct, Brewer's Spent Grain: A Review. *Foods* **2021**, *10*, 2159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Mandalari, G.; Bisignano, G.; lo Curto, R.B.; Waldron, K.W.; Faulds, C.B. Production of Feruloyl Esterases and Xylanases by *Talaromyces Stipitatus* and *Humicola Grisea* Var. *Thermoidea* on Industrial Food Processing byproducts. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5130–5133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Terrasan, C.R.F.; Temer, B.; Duarte, M.C.T.; Carmona, E.C. Production of Xylanolytic Enzymes by *Penicillium Janczewskii*. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4139–4143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Terrasan, C.R.F.; Carmona, E.C. Solid-State Fermentation of Brewer's Spent Grain for Xylanolytic Enzymes Production by *Penicillium Janczewskii* and Analyses of the Fermented Substrate. *Biosci. J.* **2015**, *31*, 1826–1836. [[CrossRef](#)]
92. Faria, N.T.; Marques, S.; Ferreira, F.C.; Fonseca, C. Production of Xylanolytic Enzymes by *Moesziomyces* Spp. Using Xylose, Xylan and Brewery's Spent Grain as Substrates. *New Biotechnol.* **2019**, *49*, 137–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Li, X.; Dilokpimol, A.; Kabel, M.A.; de Vries, R.P. Fungal Xylanolytic Enzymes: Diversity and Applications. *Bioresour. Technol.* **2022**, *344*, 126290. [[CrossRef](#)]
94. Macedo, J.V.C.; Martins, J.R.; Abe, M.M.; Branciforti, M.C.; Brienza, M. Hemicellulose Application for the Production of Bioplastics and Biomaterials. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 231–273.
95. Qazanfarzadeh, Z.; Ganesan, A.R.; Mariniello, L.; Conterno, L.; Kumaravel, V. Valorization of Brewer's Spent Grain for Sustainable Food Packaging. *J. Clean Prod.* **2023**, *385*, 135726. [[CrossRef](#)]
96. De Lucena, C.A.A.; da Costa, S.C.; Eleamen, G.R.D.A.; Mendonça, E.A.D.M.; Oliveira, E.E. Desenvolvimento de Biofilmes à Base de Xilana e Xilana/Gelatina Para Produção de Embalagens Biodegradáveis. *Polímeros* **2017**, *27*, 35–41. [[CrossRef](#)]
97. Moreirinha, C.; Vilela, C.; Silva, N.H.C.S.; Pinto, R.J.B.; Almeida, A.; Rocha, M.A.M.; Coelho, E.; Coimbra, M.A.; Silvestre, A.J.D.; Freire, C.S.R. Antioxidant and Antimicrobial Films Based on Brewers Spent Grain Arabinoxylans, Nanocellulose and Feruloylated Compounds for Active Packaging. *Food Hydrocoll.* **2020**, *108*, 105836. [[CrossRef](#)]
98. Pérez-Flores, J.G.; Contreras-López, E.; Castañeda-Ovando, A.; Pérez-Moreno, F.; Aguilar-Arteaga, K.; Álvarez-Romero, G.A.; Téllez-Jurado, A. Physicochemical Characterization of an Arabinoxylan-Rich Fraction from Brewers' Spent Grain and Its Application as a Release Matrix for Caffeine. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 1020–1030. [[CrossRef](#)]
99. Abe, M.M.; Martins, J.R.; Sanvezzo, P.B.; Macedo, J.V.; Branciforti, M.C.; Halley, P.; Botaro, V.R.; Brienza, M. Advantages and Disadvantages of Bioplastics Production from Starch and Lignocellulosic Components. *Polymers* **2021**, *13*, 2484. [[CrossRef](#)]
100. Gordobil, O.; Egúés, I.; Urruzola, I.; Labidi, J. Xylan—Cellulose Films: Improvement of Hydrophobicity, Thermal and Mechanical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *112*, 56–62. [[CrossRef](#)]

101. Kayserilioğlu, B.Ş.; Bakir, U.; Yilmaz, L.; Akkaş, N. Use of Xylan, an Agricultural byproduct, in Wheat Gluten Based Biodegradable Films: Mechanical, Solubility and Water Vapor Transfer Rate Properties. *Bioresour. Technol.* **2003**, *87*, 239–246. [CrossRef] [PubMed]
102. Long, L.; Shen, F.; Wang, F.; Tian, D.; Hu, J. Synthesis, Characterization and Enzymatic Surface Roughing of Cellulose/Xylan Composite Films. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 121–127. [CrossRef] [PubMed]
103. Lee, J.H.; Lee, J.H.; Yang, H.J.; Song, K.B. Preparation and Characterization of Brewer's Spent Grain Protein-Chitosan Composite Films. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 7549–7555. [CrossRef]
104. Xu, J.; Xia, R.; Zheng, L.; Yuan, T.; Sun, R. Plasticized Hemicelluloses/Chitosan-Based Edible Films Reinforced by Cellulose Nanofiber with Enhanced Mechanical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *224*, 115164. [CrossRef] [PubMed]
105. Global Information Inc. Furfuryl Alcohol Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application (Resins, Solvents, Corrosion Inhibitors), by End Use (Foundry, Agriculture, Food & Beverages), by Region, and Segment Forecasts, 2021–2028. Available online: <https://www.giiresearch.com/report/grvi1044783-furfuryl-alcohol-market-size-share-trends-analysis.html> (accessed on 23 February 2023).
106. Liu, H.; Lin, Q.; Li, R.; Chang, M.; Ren, J. Synthesis of Furan Compounds from Hemicelluloses. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 399–445.
107. Mazar, A.; Ajao, O.; Benali, M.; Jemaa, N.; Wafa Al-Dajani, W.; Paleologou, M. Integrated Multiproduct Biorefinery for Furfural Production with Acetic Acid and Lignin Recovery: Design, Scale-Up Evaluation, and Technoeconomic Analysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 17345–17358. [CrossRef]
108. Bariani, M.; Boix, E.; Cassella, F.; Cabrera, M.N. Furfural Production from Rice Husks within a Biorefinery Framework. *Biomass Convers. Biorefin.* **2021**, *11*, 781–794. [CrossRef]
109. Cousin, E.; Namhaed, K.; Pérès, Y.; Cognet, P.; Delmas, M.; Hermansyah, H.; Gozan, M.; Alaba, P.A.; Aroua, M.K. Towards Efficient and Greener Processes for Furfural Production from Biomass: A Review of the Recent Trends. *Sci. Total Environ.* **2022**, *847*, 157599. [CrossRef]
110. Ye, L.; Han, Y.; Wang, X.; Lu, X.; Qi, X.; Yu, H. Recent Progress in Furfural Production from Hemicellulose and Its Derivatives: Conversion Mechanism, Catalytic System, Solvent Selection. *Mol. Catal.* **2021**, *515*, 111899. [CrossRef]
111. Li, X.; Liu, Q.; Si, C.; Lu, L.; Luo, C.; Gu, X.; Liu, W.; Lu, X. Green and Efficient Production of Furfural from Corn Cob over H-ZSM-5 Using γ -Valerolactone as Solvent. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *120*, 343–350. [CrossRef]
112. Zhang, T.; Li, W.; An, S.; Huang, F.; Li, X.; Liu, J.; Pei, G.; Liu, Q. Efficient Transformation of Corn Stover to Furfural Using P-Hydroxybenzenesulfonic Acid-Formaldehyde Resin Solid Acid. *Bioresour. Technol.* **2018**, *264*, 261–267. [CrossRef] [PubMed]
113. Xu, S.; Pan, D.; Wu, Y.; Song, X.; Gao, L.; Li, W.; Das, L.; Xiao, G. Efficient Production of Furfural from Xylose and Wheat Straw by Bifunctional Chromium Phosphate Catalyst in Biphasic Systems. *Fuel Process. Technol.* **2018**, *175*, 90–96. [CrossRef]
114. Romo, J.E.; Bollar, N.V.; Zimmermann, C.J.; Wettstein, S.G. Conversion of Sugars and Biomass to Furans Using Heterogeneous Catalysts in Biphasic Solvent Systems. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 4805–4816. [CrossRef]
115. Upare, P.P.; Hong, D.Y.; Kwak, J.; Lee, M.; Chitale, S.K.; Chang, J.S.; Hwang, D.W.; Hwang, Y.K. Direct Chemical Conversion of Xylan into Furfural over Sulfonated Graphene Oxide. *Catal. Today* **2019**, *324*, 66–72. [CrossRef]
116. Wang, X.; Li, H.; Lin, Q.; Li, R.; Li, W.; Peng, F.; Ren, J. Efficient Catalytic Conversion of Dilute-Oxalic Acid Pretreated Bagasse Hydrolysate to Furfural Using Recyclable Ionic Phosphates Catalysts. *Bioresour. Technol.* **2019**, *290*, 121764. [CrossRef]
117. Sweygers, N.; Harrer, J.; Dewil, R.; Appels, L. A Microwave-Assisted Process for the in-Situ Production of 5-Hydroxymethylfurfural and Furfural from Lignocellulosic Polysaccharides in a Biphasic Reaction System. *J. Clean Prod.* **2018**, *187*, 1014–1024. [CrossRef]
118. Wang, Z.K.; Shen, X.J.; Chen, J.J.; Jiang, Y.Q.; Hu, Z.Y.; Wang, X.; Liu, L. Lignocellulose Fractionation into Furfural and Glucose by AlCl₃-Catalyzed DES/MIBK Biphasic Pretreatment. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *117*, 721–726. [CrossRef] [PubMed]
119. Li, Z.; Luo, Y.; Jiang, Z.; Fang, Q.; Hu, C. The Promotion Effect of NaCl on the Conversion of Xylose to Furfural[†]. *Chin. J. Chem.* **2020**, *38*, 178–184. [CrossRef]
120. Zhang, Q.; Wang, C.; Mao, J.; Ramaswamy, S.; Zhang, X.; Xu, F. Insights on the Efficiency of Bifunctional Solid Organocatalysts in Converting Xylose and Biomass into Furfural in a GVL-Water Solvent. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *138*, 111454. [CrossRef]
121. Chen, Z.; Bai, X.; Lusi, A.; Jacoby, W.A.; Wan, C. One-Pot Selective Conversion of Lignocellulosic Biomass into Furfural and Co-Products Using Aqueous Choline Chloride/Methyl Isobutyl Ketone Biphasic Solvent System. *Bioresour. Technol.* **2019**, *289*, 121708. [CrossRef]
122. Rozenfelde, L.; Puke, M.; Vedernikovs, N.; Scherbaka, R.; Rapoport, A. Catalytic Treatment of Rapeseed Straw for Enhanced Production of Furfural and Glucose for Bioethanol Production. *Process Biochem.* **2021**, *102*, 102–107. [CrossRef]
123. Tongtummachat, T.; Jaree, A.; Akkarawatkhoosith, N. Continuous Hydrothermal Furfural Production from Xylose in a Microreactor with Dual-Acid Catalysts. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 23366–23378. [CrossRef] [PubMed]
124. Liu, C.; Cai, T.; Yin, X.; Liang, J.; Jia, S.; Zhang, X.; Xu, J.; Hu, J.; Jiang, J.; Wang, K. A Sustainable and Profitable Biorefinery Strategy for Efficiently Converting Lignocellulose to Furfural, Glucose and Phenolic Compounds. *Green Chem.* **2022**, *24*, 8494–8502. [CrossRef]
125. Li, X.; Zhang, L.; Wang, S.; Wu, Y. Recent Advances in Aqueous-Phase Catalytic Conversions of Biomass Platform Chemicals Over Heterogeneous Catalysts. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 948. [CrossRef] [PubMed]
126. Hilpmann, G.; Steudler, S.; Ayubi, M.M.; Pospiech, A.; Walther, T.; Bley, T.; Lange, R. Combining Chemical and Biological Catalysis for the Conversion of Hemicelluloses: Hydrolytic Hydrogenation of Xylan to Xylitol. *Catal. Lett.* **2019**, *149*, 69–76. [CrossRef]

127. Albuquerque, E.M.; Fraga, M.A. Production of Platform Chemicals and High Value Products from Hemicellulose. In *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy*; Springer: Singapore, 2022; pp. 361–397.
128. Sheldon, R.A. Biocatalysis and Biomass Conversion: Enabling a Circular Economy. *Philos. Trans. R. Soc. A* **2020**, *378*, 20190274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Mariño, M.A.; Fulaz, S.; Tasic, L. Magnetic Nanomaterials as Biocatalyst Carriers for Biomass Processing: Immobilization Strategies, Reusability, and Applications. *Magnetochemistry* **2021**, *7*, 133. [[CrossRef](#)]
130. Hu, J.; Davies, J.; Mok, Y.K.; Arato, C.; Saddler, J.N. The Potential of Using Immobilized Xylanases to Enhance the Hydrolysis of Soluble, Biomass Derived Xylooligomers. *Materials* **2018**, *11*, 2005. [[CrossRef](#)]
131. Bayer, E.A.; Laura, A.; Benatti, T.; De, M.; Teixeira, L.; Polizeli, M. Lignocellulolytic Biocatalysts: The Main Players Involved in Multiple Biotechnological Processes for Biomass Valorization. *Microorganisms* **2023**, *11*, 162. [[CrossRef](#)]

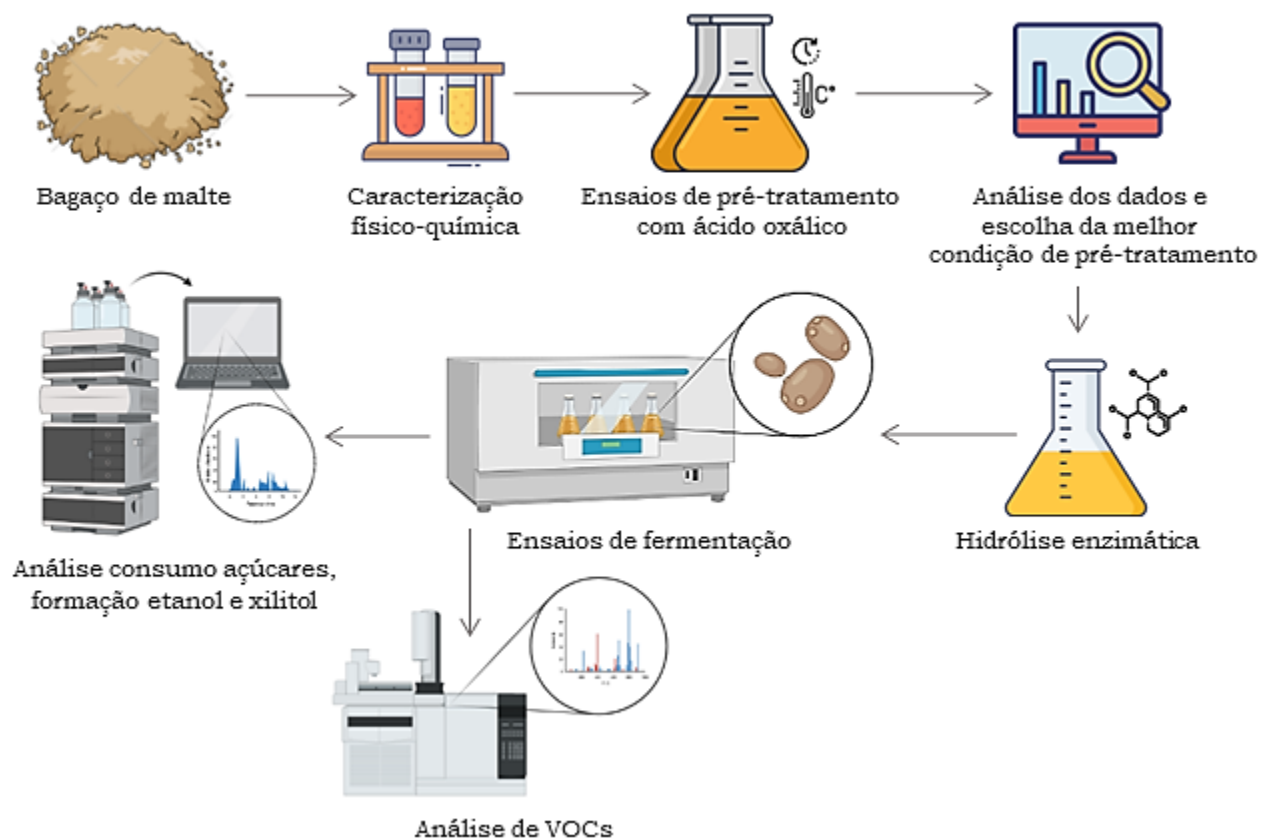
Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4 CAPÍTULO II

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades desenvolvidas ao longo da pesquisa estão descritas na Figura 1.

Figura 1 – Esquema geral das atividades desenvolvidas ao longo do projeto de pesquisa.



Fonte: a autora.

4.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima

O bagaço de malte utilizado nessa pesquisa é proveniente de malte do tipo *pilsen* e foi gentilmente cedido pela Basáltica Cervejaria Experimental, localizada em Chapecó/SC. A coleta do material foi realizada ao término da etapa de brassagem, de um único lote, sendo acondicionado em sacos herméticos e imediatamente conduzido para o laboratório, onde passou

pela etapa de secagem, em estufa com circulação ar, sob temperatura de 55 ± 1 °C, até peso constante (aproximadamente 72 horas). Posteriormente, a biomassa foi moída em moinho de facas tipo *Willye*, a fim de obter partículas de 0,6 mm de diâmetro máximo (AmericanLab modelo AL – 032S). O acondicionamento foi feito em embalagens hermeticamente fechadas, que foram mantidas à temperatura laboratorial (cerca de 20 °C). Para a realização de todos os ensaios foi utilizado um único lote de bagaço.

4.1.1.1 Análise da distribuição do tamanho de partículas

A determinação da distribuição do tamanho de partículas na biomassa é realizada conforme procedimento padrão da *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) “*Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure*” (SLUITER et al., 2008a). Para tal, utilizaram-se peneiras da série Taylor, de 10, 16, 30, 40, 60 e 100 *mesh* para a separação do material. Inicialmente, as peneiras foram pesadas e posteriormente foram empilhadas na seguinte ordem, começando na parte inferior: bandeja inferior, 100, 60, 40, 30, 16 e 10 *mesh*. Em seguida, adicionaram-se aproximadamente 80 g do material em análise na parte superior da série de peneiras, que, por fim, foram tampadas e presas a um agitador eletromagnético. As amostras foram mantidas no agitador em uma vibração de aproximadamente 80 %, por 15 minutos.

Findado o tempo, as peneiras foram pesadas para determinar a massa retida em cada uma delas. Para a pesquisa, baseado em estudos previamente executados pelo grupo de pesquisas, estabeleceu-se o uso de partículas com granulometria ≥ 30 *mesh*, sendo o material acondicionado em bolsas hermeticamente fechadas, e armazenado em local seco e protegido de luminosidade até o uso (DRESCH et al., 2023; VARGAS et al., 2023).

4.1.2 Caracterização físico-química do bagaço de malte cervejeiro

O bagaço de malte previamente seco e com granulometria ≥ 30 *mesh* foi caracterizado com relação aos teores de umidade, proteínas totais, extrativos, cinzas, lignina solúvel e insolúvel, hemicelulose e celulose, seguindo as metodologias detalhadas a seguir.

4.1.2.1 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade seguiu o procedimento padrão da NREL “*Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure*” (SLUITER et al., 2008a). O objetivo dessa análise é medir a quantidade de água e outros componentes voláteis a 105 °C presentes nas amostras.

Inicialmente, placas de Petri foram previamente lavadas e secas a 105 °C em uma estufa, e resfriadas em um dessecador até temperatura ambiente, tendo seus pesos anotados (M1). A amostra em análise foi homogeneizada, e posteriormente pesada na placa de Petri (aproximadamente 6 g), tendo sua massa também anotada (M2). Analogamente, as amostras foram levadas à estufa, a uma temperatura de 105 °C, e mantidas até peso constante (aproximadamente 24 horas). Após a constatação de peso constante, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador, até alcançarem temperatura ambiente. A placa contendo a amostra foi, então, pesada, tendo sua massa anotada (M3).

O teor de umidade foi calculado a partir da Equação 1.

$$\% \textit{umidade} = \left(1 - \left(\frac{M3-M1}{M2-M1} \right) \right) * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

M1: Massa da placa de Petri vazia, em gramas.

M2: Massa da placa de Petri + amostra úmida, em gramas.

M3: Massa da placa de Petri + amostra absolutamente seca, em gramas.

4.1.2.2 Determinação do teor de proteínas totais

A determinação de proteínas foi realizada seguindo o método de *Kjeldahl* modificado, conforme procedimento padrão descrito em manual do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Esse método baseia-se na digestão da amostra livre de umidade com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento contínuo, convertendo todo o nitrogênio orgânico em íon amônio. Posteriormente, a solução obtida é alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado, a amônia produzida nessa etapa destilada em sistema automático de destilação e imediatamente captada por uma solução de ácido bórico, que finalmente é titulada com ácido

clorídrico de concentração conhecida e padronizada. O método é dividido nas etapas de digestão, destilação e titulação.

Na etapa de digestão, 0,2 g de amostra livre de umidade foi pesada em papel filtro, seu peso anotado (P) e transferida para o tubo de *Kjeldahl* juntamente com 2 g de catalisador (10 Na₂SO₄:1 CuSO₄.5H₂O) e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. O ensaio foi feito em triplicata. Os tubos foram então colocados no bloco digestor previamente aquecido a uma temperatura entre 150-200 °C, dentro de capela de exaustão, e a digestão mantida até o conteúdo dos tubos de *Kjeldahl* tornar-se límpido, com coloração azul ou verde clara. Os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e seguiram para a etapa de destilação.

Em seguida, misturou-se 5 mL de água destilada ao tubo com amostra digerida e acoplou-se ao destilador de nitrogênio, onde, lentamente, adicionou-se 20 mL de hidróxido de sódio 40 %, a fim de alcalinizar a amostra. Após o cessamento da reação no tubo, o destilador foi ligado. Depois de alguns instantes, o frasco contendo 10 mL de solução de ácido bórico 3 % e três gotas de indicador vermelho de metila 0,2 % + azul de metileno 0,2 % (em álcool 95 %) foi acoplado no bico do condensador. A destilação perdurou até a solução de ácido bórico atingir uma coloração verde clara, completando um volume de cerca de 50 mL, garantindo a completa evaporação e condensação da amônia presente na amostra. Por fim, o conteúdo do frasco foi titulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N padronizado até a viragem do indicador de verde claro para rosa, tendo o volume de ácido usado na titulação anotado (V).

Para determinar a porcentagem de proteínas totais presentes no bagaço de malte utilizou-se a Equação 2:

$$\% \text{ proteínas} = \left(\frac{V \times f \times 6,25 \times 0,0014}{P} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

P = peso da amostra em gramas (g).

V = volume gasto de HCl 0,1 N na titulação (mL).

f = fator de correção resultante da padronização do HCl 0,1 N.

6,25 = fator de conversão geral.

0,0014 = miliequivalente grama do nitrogênio.

4.1.2.3 Determinação do teor de cinzas

Com a finalidade de quantificar o material inorgânico na biomassa, estrutural ou extraível, como parte da composição total, segue-se o procedimento padrão NREL “*Determination of Ash in Biomass*” (SLUITER et al., 2008b). Para a determinação do teor de cinzas, utilizaram-se cadinhos de porcelana de 50 mL. O ensaio foi feito em triplicata. Os cadinhos foram devidamente lavados e secos a 105 °C, sendo, em seguida, deixados em dessecador para esfriarem até temperatura ambiente. Posteriormente, os cadinhos foram numerados e pesados em uma balança analítica (M1). A seguir, pesou-se aproximadamente 1,5 g do material, isento de umidade, tendo sua massa devidamente anotada (M2).

Realizou-se a carbonização do material em uma mufla, a 800 °C, por duas horas. Em seguida, as amostras foram removidas da mufla e colocadas em um dessecador, até atingirem temperatura ambiente. Por fim, o cadinho contendo a amostra foi pesado, tendo sua massa anotada (M3). Repetiu-se a calcinação por mais 20 minutos, para verificar a constância de peso.

A concentração de cinzas foi calculada a partir da Equação 3.

$$\% \text{ cinzas} = \left(\frac{M3-M1}{M2-M1} \right) * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

M1: Massa do cadinho, em gramas.

M2: Massa do cadinho + massa do material livre de umidade, em gramas.

M3: Massa do cadinho com cinzas, em gramas.

4.1.2.4 Determinação do teor de extrativos

O procedimento é baseado nos procedimentos padrões NREL “*Determination of Extractives in Biomass*” (SLUITER et al., 2008c) e na norma TAPPI T204 cm-97 “*Solvent extractives of wood and pulp*” (TAPPI, 1997).

Para a determinação do teor de extrativos, 4 g de amostra de bagaço de malte com granulometria padronizada e livre de umidade foram adicionados a um cartucho previamente confeccionado com papel filtro. O ensaio foi executado em quadruplicata. Após, cada cartucho foi introduzido no tubo de extração do equipamento tipo *Soxhlet*, adicionando 150 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram

acoplados e o aquecimento do equipamento ligado, assim como a água dos condensadores do equipamento. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração estivesse incolor.

Subsequente a extração com água destilada, as amostras foram submetidas a uma nova extração, utilizando 150 mL de álcool etílico em cada balão extrator, juntamente com pérolas de vidro. A extração foi mantida até o desaparecimento total da coloração das amostras. Ao término da extração, para determinar o peso do material seco livre de extrativos, o cartucho foi seco em uma estufa, a 105 °C, até peso constante, pesado e sua massa anotada (M2). Para o cálculo do teor de extrativos utilizou-se a Equação 4.

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{M1-M2}{M1} \right) * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

M1: Massa da biomassa utilizada, em gramas;

M2: Massa da biomassa utilizada livre de extrativos, em gramas.

4.1.2.5 Determinação do conteúdo de lignina total e carboidratos

A determinação do conteúdo de carboidratos e lignina (solúvel e insolúvel) na biomassa segue os procedimentos do NREL “*Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-vis Spectroscopy*” (HYMAN et al., 2008), “*Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*” (SLUITER et al., 2008d) e “*Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass*” (ASTM E1721-95, 1995; CÂNDIDA RABELO, 2010).

Para o processo de hidrólise ácida concentrada, em quadruplicata, pesou-se aproximadamente 0,3 g de amostra em tubos de ensaio previamente secos e identificados, seguida da adição de 3,0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 72% (v/v) em cada tubo. Paralelamente, um branco foi preparado, com apenas 3,0 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados em banho termostático, a 30 °C, por 1 h, homogeneizando as amostras com um bastão de vidro a cada 5-10 min, sem removê-los do banho. Após o processo de hidrólise ácida concentrada, realizou-se o processo de hidrólise ácida diluída, onde os tubos de ensaio foram removidos e o conteúdo transferido para erlenmeyers de 250 mL, utilizando, para isso, 84 mL de água destilada, sendo a concentração do meio ácida diluída para 4 %. Os frascos foram

pesados e sua massa anotada. Para a completa hidrólise dos oligômeros, os frascos foram fechados com papel alumínio e fita crepe.

Os Erlenmeyers foram colocados em autoclave, por 1 h a 121 °C. Decorrido o tempo, foram resfriados até temperatura ambiente, novamente pesados e aferidos com água destilada até atingir o peso inicial da amostra, mantendo a razão sólido/líquido.

A seguir, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, utilizando um papel de filtro. A fração sólida retida foi lavada com 500 mL de água destilada. O papel filtro foi, então, transferido para placas de Petri e o conjunto encaminhado para estufa, a 40 °C, onde permaneceu até peso constante. A placa contendo o papel filtro + amostra foi, então, pesada, tendo sua massa anotada.

Uma fração do hidrolisado ácido (fração líquida) foi diluído na proporção 1:100 para realizar a leitura em um espectrofotômetro UV-Visível n o comprimento de onda de 280 nm, utilizando cubetas de quartzo, dado utilizado no cálculo de lignina solúvel. Paralelamente, cerca de 20 mL deste hidrolisado ácido foi neutralizado com carbonato de cálcio (CaCO₃) até atingir a faixa de pH entre 5 – 6. Após, uma alíquota foi filtrada, acondicionada em *ependorfs* e congelada para posterior leitura em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para obtenção das concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose, e inibidores, como ácido acético, HMF e furfural a partir da curva padrão previamente construída (conforme Apêndice A).

Para o cálculo do percentual de lignina solúvel, lignina insolúvel, celulose e hemicelulose, utilizaram-se as equações descritas a seguir.

$$\% \text{ lignina solúvel} = \left(\frac{\text{conc.lignina solúvel} * V \text{ filtrado}}{M1} \right) * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{conc.lignina solúvel} = [41,87 * ((AT * FD) - APD) - 0,3279] * 10^{-3}$$

$$APD = C1 * \varepsilon_1 + C2 * \varepsilon_2$$

Onde:

conc. lignina solúvel = Concentração de lignina solúvel;

V filtrado = Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M1 = Massa de biomassa utilizada na hidrólise ácida concentrada, 0,3 g

AT = Absorbância da solução de lignina solúvel junto com os produtos de degradação lidos em espectro UV-Visível, a 280 nm;

FD = Fator de diluição para leitura da absorbância, ou seja, 100;

APD = Absorbância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares, cujas concentrações C1 e C2 foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades do furfural e HMF (146,85 e 114,00 L/g cm). Esses valores são retirados em estudos encontrados na literatura.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \left(\left(\frac{M_2}{M_1} \right) * 100 \right) - \% \text{ cinzas} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

M1 = Massa de biomassa utilizada na hidrólise ácida concentrada, 0,3 g;

M2 = Massa da lignina insolúvel seca, em g;

% cinzas = Teor de cinzas da biomassa livre de extrativos.

$$\% \text{ celulose} = \left[\frac{(((0,95 * Ce) + (0,90 * G) + (1,29 * HMF) + (3,35 * AF) + (0,88 * ARA) * V) * (1 - (E/100) * 100))}{M} \right] \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

Ce = Concentração de celobiose, em g/L;

G = Concentração de glicose, em g/L;

HMF = Concentração de 5-hidroximetilfurfural, em g/L;

AF = Concentração de ácido fórmico, em g/L;

ARA = Concentração de arabinose, em g/L;

V = Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

E = Teor de extrativos da biomassa, em %.

M = Massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada, 0,3

g.

$$\% \text{ hemicelulose} = \left[\frac{(((0,88 * X) + (1,37 * F) + (0,72 * AA) * V) * (1 - (E/100) * 100))}{M} \right] \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

X = Concentração de xilose, em g/L;

F = Concentração de furfural, em g/L;

AA = Concentração de ácido acético, em g/L;

V = Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

E = Teor de extrativos da biomassa, em %.

M = Massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada, 0,3

g.

4.1.3 Pré-tratamento com ácido oxálico para solubilização das hemiceluloses e hidrólise enzimática

Por meio de testes preliminares e ensaios de pré-tratamentos, avaliou-se a condição ótima de pré-tratamento para a solubilização das hemiceluloses presentes no bagaço de malte. Para os testes preliminares, 20 g do bagaço de malte livre de umidade e com granulometria padronizada foram pesados em frascos aletados de 500 mL, com posterior adição de 200 mL de solução de ácido oxálico nas concentrações de 3 % (AO3), 4 % (AO4) e 5 % (AO5), baseando-se nos resultados ótimos obtidos por Dresch et al. (2023). Além disso, foi preparada uma solução com ácido sulfúrico a 1 % (AS1), para fins de comparação entre a ação do ácido orgânico e do mineral. Os frascos contendo a solução e o bagaço foram fechados com papel alumínio e levados à autoclave para a realização da hidrólise ácida, por 120 minutos, a 125,6 °C e 1,4 bar. Ao fim do tempo reacional, a autoclave foi desligada, despressurizada e os frascos retirados e resfriados até temperatura ambiente. O conteúdo de cada frasco foi, então, filtrado em funil de Büchner, utilizando o tecido VOAL. Uma parcela da fração líquida do hidrolisado foi encaminhada para análise de carboidratos, formação de inibidores e grupos acetil em CLAE. Já a fração sólida foi ressuspensa em 200 mL de água destilada, neutralizada com solução de hidróxido de sódio 12 %, filtrada em funil de Büchner — utilizando o tecido VOAL — e seca em estufa por 24 h, a 105 °C, para posterior caracterização físico-química.

Baseando-se nos resultados dos testes preliminares, elaborou-se uma série de ensaios a fim de analisar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de ácido oxálico (variando entre 3,8 e 5,5 %) e tempos de reação (variando entre 24 e 136 minutos) conforme a Tabela 1, onde avaliou-se o rendimento de xilose no hidrolisado e a formação de compostos inibidores (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido acético).

Tabela 1 - Ensaios de pré-tratamento do bagaço de malte com ácido oxálico.

| Ensaio | Concentração de ácido oxálico (%) | Tempo de reação (min.) |
|---------------|--|-------------------------------|
| PE1 | 3,8 | 40 |
| PE2 | 5,2 | 40 |
| PE3 | 3,8 | 120 |
| PE4 | 5,2 | 120 |
| PE5 | 4,5 | 80 |

Tabela 1 – Continuação.

| | | |
|------------|-----|-----|
| PE6 | 3,5 | 80 |
| PE7 | 5,5 | 80 |
| PE8 | 4,5 | 24 |
| PE9 | 4,5 | 136 |

Após a escolha da melhor condição de pré-tratamento com ácido oxálico, foi realizada a etapa de hidrólise enzimática, baseando-se nas condições utilizadas por Vargas et al. (VARGAS et al., 2023). Para tal, o hidrolisado provindo da etapa de pré-tratamento foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio 4 % até pH ótimo (5,0), seguida da adição da enzima CELLIC HTec2 (28 FPU) na concentração de 1 %, diluída 1:10 em tampão acetato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8). Posteriormente, os hidrolisados adicionados de enzima foram acondicionados sob agitação orbital em *shaker*, à temperatura de 50 °C, por 24 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o processo, os hidrolisados foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos em centrífuga. Alíquotas foram filtradas em filtros de membrana GS não estéril, com porosidade de 0,22 µm da marca Millipore, e diluídas 1:2 em água destilada, sendo analisadas em CLAE para avaliar o conteúdo de monômeros de xilose presentes nas amostras.

4.1.4 Ensaios de fermentação para produção de xilitol e compostos orgânicos voláteis VOCs

Os ensaios de fermentação foram realizados utilizando três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: PE-2, MP-P5 e JDY-01, sendo as duas últimas modificadas geneticamente e derivadas da primeira, uma linhagem industrial diploide comumente utilizada na produção de etanol combustível.

Segundo Tadioto et al. (2023), a linhagem PE-2 foi transformada com o plasmídeo de integração cromossômica pAUR-XKXDHXR, permitindo a superexpressão das enzimas xilose redutase (XR, codificada por XYL1) e xilitol desidrogenase (XDH, codificada por XYL2) provindo de uma cepa de *Scheffersomyces stipitis*, bem como xiluloquinase (XK, codificada por XKS1) de *S. cerevisiae*. Em síntese, o plasmídeo pAUR-XKXDHXR foi digerido com BsiWI e depois integrado cromossomicamente no locus AUR1 da cepa de levedura. Após 90

minutos de cultivo em meio YP rico (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona, pH 5,0) contendo 20 g/L de glicose, as células transformadas foram selecionadas em placas do mesmo meio contendo 20 g/L de ágar e 0,5 mg/L de aureobasidin A (Takara Bio, Kyoto, Japão), dando origem a cepa MP-P5 (isogênica a PE-2, mas AUR1-C::PPGK1-XKS1-TPGK1, PPGK1-XYL2-TPGK1, PPGK1-XYL1-TPGK1). A transformação da levedura foi realizada pelo método do acetato de lítio. A cepa MP-P5 foi aprimorada promovendo a superexpressão do gene TAL1 de *S. cerevisiae*, que codifica a enzima transaldolase na fase não-oxidativa da via das pentoses-fosfato. A região promotora deste gene TAL1 foi modificada de acordo com o procedimento de substituição genética baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR). O módulo kanMX-PADH1 do plasmídeo pFA6a-kanMX6-PADH foi amplificado usando os primers TAL1-Kanr-F e TAL1-PADH1-R e o produto de PCR de 2394 pb (flanqueado por 40 pb de homologia com o promotor e as regiões de início do gene TAL1) contendo o gene kanMX6 e o promotor constitutivo do gene ADH1 foram utilizados para transformar células de levedura competentes. Após 2 horas de cultivo em YP-20 g/L de glicose, as células de levedura transformadas foram plaqueadas no mesmo meio contendo 20 g/L de ágar e 200 mg/L de G-418 (Merck Sigma Aldrich Brasil, Barueri, Brasil) e incubadas a 28 °C. Os isolados resistentes a G-418 foram testados quanto à integração genômica adequada do cassete kanMX-PADH1 no locus TAL1 por PCR de diagnóstico usando 3 primers (V-TAL1-F, V-TAL1-R e V-kanr-F). Este conjunto de três primers amplificou um fragmento de 501 pb (iniciadores V-TAL1-F e V-TAL1-R) de um locus TAL1 normal, ou rendeu um fragmento de 2.700 pb (iniciadores V-TAL1-F e V-TAL1-R) ou um fragmento de 1479 pb (iniciadores V-kanr-F e V-TAL1-R), se o módulo kanMX-PADH1 estivesse corretamente integrado na região promotora do gene TAL1, produzindo, então, a cepa JDY-01.

Para utilização nos ensaios de fermentação do hidrolisado hemicelulósico, pré-inóculos das três linhagens foram preparados utilizando meio de cultura contendo 1,0 % de extrato de levedura, 2,0 % de peptona bacteriológica, 2,0 % de glicose e 2,0 % de ágar bacteriológico, onde as linhagens foram inoculadas e incubadas a 30 °C por 48 h antes de serem utilizadas.

Os ensaios foram conduzidos através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) ²², com triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios para cada linhagem, a fim de avaliar o efeito da temperatura de fermentação e pH do hidrolisado no consumo de carboidratos, acumulação de xilitol pela linhagem PE-2, produção de etanol pelas linhagens MP-P5 e JDY-01, além de compostos orgânicos voláteis pelas três linhagens de levedura. Os níveis do planejamento estão descritos na Tabela 2

Tabela 2 - Quadro com os níveis do planejamento experimental dos ensaios de fermentação com as três linhagens de *S. cerevisiae*.

| | -α | -1 | 0 | +1 | +α |
|------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| Temperatura (°C) | 15,9 | 20 | 30 | 40 | 44,1 |
| pH | 1,8 | 3,0 | 6,0 | 9,0 | 10,2 |

Para a realização dos ensaios, o hidrolisado hemicelulósico advindo do pré-tratamento do bagaço de malte foi, primeiramente, concentrado em rotaevaporador a vácuo até aproximadamente 50 % do seu volume inicial, aumentando a concentração de carboidratos, seguido da suplementação com 1 % de extrato de levedura e 2 % de peptona bacteriológica, a fim de fornecer fontes de nitrogênio para os microrganismos. Em seguida, o hidrolisado foi fracionado em cinco aliquotas e o pH de cada uma ajustado, conforme estabelecido nos níveis do planejamento experimental (1,8 – 3,0 – 6,0 – 9,0 – 10,2), utilizando uma solução de hidróxido de sódio 2M. Após, as aliquotas foram esterilizadas em sistema estéril de filtração à vácuo, com membrana PES de 0,22 µm, da marca Kasvi, e acondicionadas em recipientes estéreis, sob refrigeração, até o momento do uso.

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados em autoclave, adicionando-se 50 mL do hidrolisado hemicelulósico e uma alçada calibrada de 1 µL do pré-inóculo de cada linhagem, à temperatura definida no planejamento, por 48 h a 145 rpm, em agitador rotacional com controle de temperatura. No tempo zero e a cada 12 h foram coletadas amostras de 1 mL, em duplicata, para a análise do consumo de carboidratos e produção de xilitol e etanol. Para tal, as aliquotas coletadas foram centrifugadas a 9000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes filtrados em Filtrilos® de 0,22 µm e enviados para análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Ao término do tempo de fermentação, o hidrolisado fermentado foi centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante armazenado em tubos Falcon para subsequente extração líquido-líquido e análise da formação compostos orgânicos voláteis (VOCs).

4.1.4.1 Avaliação da produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Para a determinação dos VOCs, ao fim da fermentação, os hidrolisados fermentados foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados a 9000 rpm por 10 minutos. Do

sobrenadante proveniente da centrifugação, foi coletado 20 mL e adicionado a 6,67 mL de diclorometano (1/3 v). A mistura foi agitada por 30 min a 145 rpm e temperatura ambiente e, na sequência, com o auxílio de um funil de separação, realizou-se uma extração líquido-líquido seguindo uma adaptação feita de Roque et al. (2019).

Sendo assim, as amostras oriundas da fase imiscível da extração líquido-líquido em diclorometano foram submetidas à cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS), modelo GCMS-QP2010Ultra (Shimadzu). Foram injetados 2 μ L de amostra em uma coluna capilar NST05ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) e fase móvel de gás hélio, com fluxo total de 14 mL/min; com temperatura do injetor de 150 °C, *split* 1:10, programação de temperatura do forno de 100 °C por 6 minutos, 100 °C a 150 °C com taxa de 4 °C/min, 150 °C a 220 °C com taxa de 8°/min e 220 °C até 40 minutos. O espectrômetro de massas operou com temperatura da fonte de ionização de 200 °C e da interface de 220 °C, modo de escaneamento (m/z) 35 - 500. A biblioteca utilizada para a análise do espectro de massas foi a NIST08s Os resultados foram expressos em relatórios, com limite definido de 50 picos, que apresentavam a área respectiva desses picos para os compostos que apresentaram tempo de retenção na coluna. Avaliou-se também a diferença dos compostos em relação ao meio de cultura prévio ao inóculo.

4.1.5 Análise estatística

Os resultados obtidos ao longo desta pesquisa foram avaliados através de análises de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey*, utilizando um intervalo de confiança de 95 %, $p < (0,05)$, no software GraphPad Prism 9® v. 9.5.1 (StatSoft Inc). O planejamento experimental e o DCCR foram estruturados e analisados no software Protimiza Experimental Design® (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Caracterização físico-química do bagaço de malte cervejeiro

O bagaço de malte cervejeiro utilizado na pesquisa apresentou composição físico-química conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Composição físico-química do bagaço de malte (BM) utilizado nesse estudo, comparação com outros trabalhos e bagaço de cana-de-açúcar (BC).¹

| Componente | Este estudo | BM ² | BM ³ | BC ⁴ |
|----------------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| Cinzas | 3,33 ± 0,01 | 2,70 ± 0,07 | 3,76 ± 0,05 | 6,71 ± 0,08 |
| Extrativos | 17,94 ± 1,85 | - | 8,33 ± 0,76 ⁵ | 5,33 ± 0,20 |
| Proteínas | 14,15 ± 0,79 | 26,60 ± 0,38 | 21,16 ± 0,61 | - |
| Lignina Total⁶ | 32,22 ± 2,64 | - | 20,80 ± 0,42 | 23,37 ± 0,25 |
| Lignina solúvel | 8,79 ± 0,56 | 9,90 ± 1,40 | 3,02 ± 0,01 | - |
| Lignina insolúvel | 25,01 ± 0,18 | - | 17,78 ± 0,41 | - |
| Celulose | 18,34 ± 1,90 | 19,20 ± 1,40 | 15,99 ± 0,88 | 39,57 ± 0,31 |
| Hemicelulose | 15,63 ± 1,48 | 18,40 ± 3,70 | 29,92 ± 1,60 | 26,17 ± 0,05 |

¹ Valores expressos em %; ² (WILKINSON; SMART; COOK, 2018); ³ MASSARDI; MASSINI; SILVA, 2020; ⁴ PIN et al., 2019; ⁵ Extração com etanol 80% v/v; ⁶ Lignina insolúvel (*Klason*) + lignina solúvel (em ácido).

A composição do bagaço de malte tende a variar consideravelmente dependendo da variedade de cevada utilizada e de seu processamento durante a produção de cerveja (MASSARDI; MASSINI; SILVA, 2020). O teor de celulose encontrado foi coerente aos valores encontrados por Massardi et al. (2020) e Wilkinson et al. (2018), sendo esses 15,9 % e 19,2 %, respectivamente. A quantidade de hemicelulose também foi semelhante à encontrada por Wilkinson et al. (2014), com 18,4%. O teor de holocelulose (celulose + hemicelulose) do bagaço de malte pode chegar a compreender 50 % da biomassa (em média), sendo essa porção constituída por pentoses e hexoses, o que o coloca como uma boa opção para o processamento em biorrefinarias de segunda geração, onde microrganismos transformam esses carboidratos em produtos de valor agregado, impulsionando a circularidade da economia.

O teor de lignina presente no bagaço de malte, assim como o de carboidratos, tende a variar consideravelmente na literatura, mas, no geral, são encontradas porcentagens que variam entre 9,0 e 30,0 % (DOS SANTOS et al., 2015; WILKINSON; SMART; COOK, 2018). O bagaço utilizado nesse trabalho apresentou valores relativamente superiores deste componente,

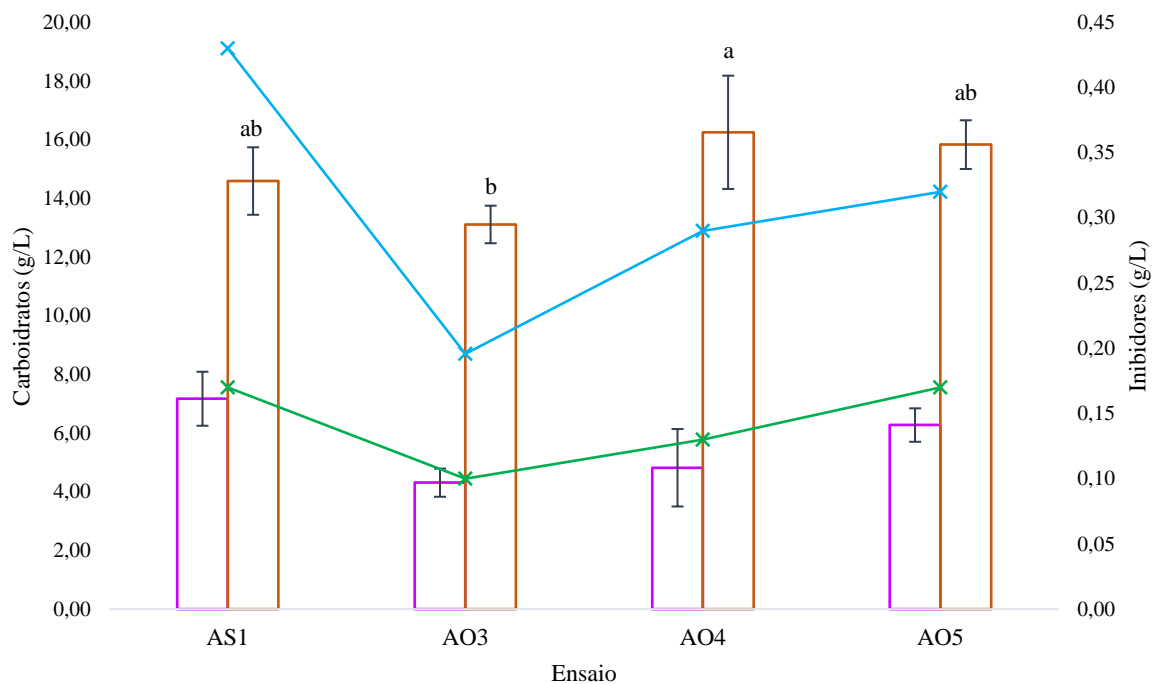
tendo 32 % de lignina total na sua composição. As diferenças entre os resultados encontrados podem ser explicadas pelas diversas variedades de malte e processos cervejeiros existentes, mas também pelas metodologias utilizadas pelos autores, que diferem de acordo com a evolução dos modos de quantificação, instrumentação e técnica envolvida. Além disso, temperaturas extremas (muito frio ou muito calor), nutrição rica em nitrogênio e escassez de água durante o cultivo podem alterar significativamente o teor de lignina presente em diversos cultivares com potencial para biorrefino, o que inclui gramíneas como a cevada, da qual deriva o bagaço de malte (MALINSKÁ et al., 2021).

O bagaço de malte é uma excelente fonte de proteínas ricas em aminoácidos essenciais, variando em média entre 15 e 31 % da composição deste resíduo, e exatamente por isso é majoritariamente destinado para alimentação (ELIOPOULOS et al., 2022; IKRAM et al., 2017; JAEGER et al., 2023). A biomassa analisada neste estudo encontrou valores coerentes aos constantes na literatura, com aproximadamente 14 % de proteínas totais na sua constituição. O isolamento desta porção para incorporação na alimentação humana, como substituto para isolados proteicos de origem animal, notadamente utilizados como suplementos alimentares, é uma possibilidade a ser mais explorada, principalmente se levarmos em consideração a alta disponibilidade deste resíduo (JUNTTILA, 2022).

4.2.2 Pré-tratamento com ácido oxálico para solubilização de hemiceluloses

Sabendo a composição da biomassa, partiu-se, então, para a execução de testes preliminares a fim de determinar alguns parâmetros iniciais a serem utilizados posteriormente nos ensaios de pré-tratamento. Os resultados dos ensaios, com relação à concentração de xilose do hidrolisado e formação de compostos inibidores, encontram-se na Figura 2.

Figura 2 - Resultado dos ensaios preliminares de pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (AS1) e ácido oxálico nas concentrações 3 % (AO3), 4 % (AO4) e 5 % (AO5), com relação à concentração de xilose (barra com contorno laranja), glicose (barra com contorno lilás), furfural (linha azul) e 5-hidroximetilfurfural (linha verde). Barras que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$) com relação à concentração de xilose.

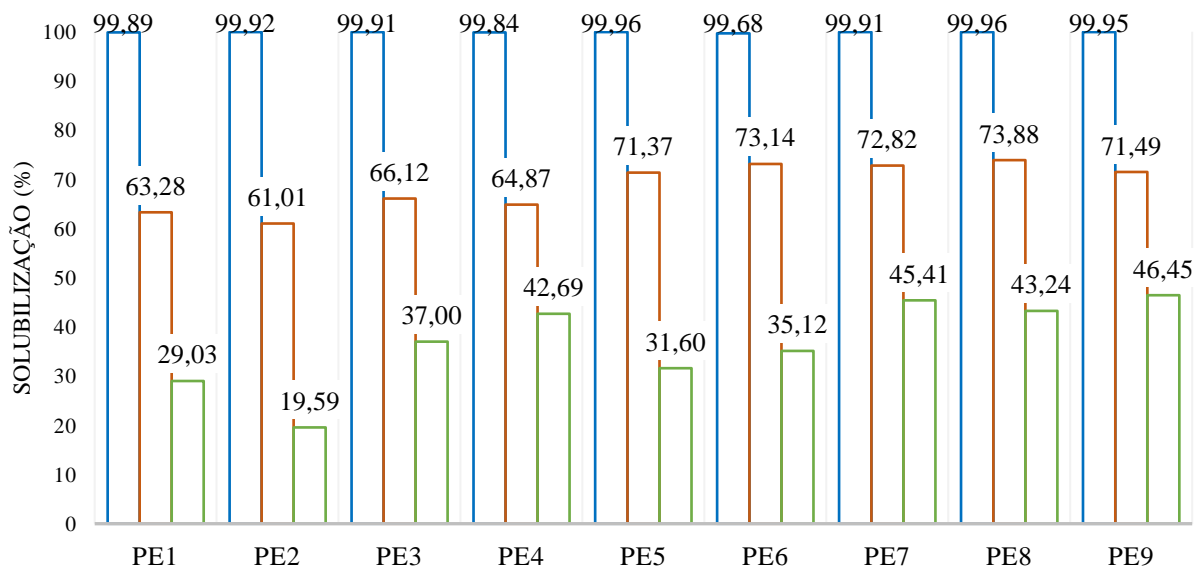


Todos os testes solubilizaram > 99,0 % da hemicelulose presente no bagaço de malte, produzindo hidrolisados com uma concentração de xilose que variou de 13 a 16 %. Os tratamentos com ácido oxálico nas concentrações de 4 e 5 % apresentaram os melhores resultados com relação a concentração de xilose no meio e, ainda, acarretaram uma formação significativamente menor de compostos inibidores em comparação ao tratamento utilizando ácido sulfúrico, com destaque para o HMF, que alcançou de 0,32 g/L na hidrólise com ácido oxálico a 5 %, contra 0,43 g/L no tratamento com ácido sulfúrico a 1 %. Wilkinson (2014) obteve um hidrolisado com 0,44 g/L e 0,41 g/L de HMF e furfural, respectivamente, no pré-tratamento utilizando ácido clorídrico a 1 %, o que demonstra que o ácido oxálico é significativamente menos agressivo com relação a degradação dos carboidratos constituintes da biomassa. A formação destes compostos está muito ligada ao tempo de reação, uma vez que, após solubilizadas, as pentoses e hexoses ficam expostas ao ácido e, conseqüentemente, à sua degradação. Um estudo conduzido por Sanchez e Bautista (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988) mostrou que o furfural exerce forte influência negativa no metabolismo fermentativo e respiratório da levedura *S. cerevisiae* em concentrações a partir de 1,5 g/L, exibindo completa inibição quando essa concentração atinge 2 g/L. O furfural está presente em quantidades superiores ao HMF na maioria dos hidrolisados lignocelulósicos, e apresenta uma toxicidade mais elevada do que o HMF para a maioria dos microrganismos utilizados na indústria, inclusive por potencialmente aumentar a toxicidade de outros compostos que podem estar

presentes nos meios de cultura (NIEVES; PANYON; WANG, 2015). As concentrações de furfural e HMF, portanto, podem ser consideradas baixas em todos os tratamentos executados.

Sabendo que os resultados mais satisfatórios dos testes preliminares foram encontrados utilizando solução de ácido oxálico entre 4 e 5 %, elaborou-se uma série de ensaios de pré-tratamento do bagaço de malte com concentrações de ácido variando entre 3,8 e 5,5 %. Também foi avaliado o comportamento da hidrólise ácida conforme o tempo de reação em autoclave. Os resultados mostraram que todos os ensaios foram eficientes em solubilizar mais de 99 % da hemicelulose presente no bagaço (Figura 3), contudo, alguns produziram mais compostos inibidores do que outros, conforme o tempo de reação aumentava, como pode ser visto na Tabela 4.

Figura 3 - Porcentagem de solubilização dos componentes hemicelulose (barra com contorno azul), celulose (barra com contorno verde) e lignina (barra com contorno laranja) após os diferentes pré-tratamentos (PE1 – 3,8 % de ácido oxálico (AO) e 40 minutos de reação (min.); PE2 – 5,2 % AO e 40 min.; PE3 – 3,8 % AO e 120 min.; PE4 – 5,2 % AO e 120 min.; PE5 – 4,5 % AO e 80 min.; PE6 – 3,5 % AO e 80 min.; PE7 – 5,5 % AO e 80 min.; PE8 – 4,5 % AO e 40 min.; PE9 – 4,5 % AO e 136 min).



Com relação à concentração de xilose no hidrolisado, os ensaios que apresentaram resultados mais satisfatórios foram o PE8 (4,5 % de ácido oxálico; 24 minutos de hidrólise) e PE7 (5,5 % de ácido oxálico; 80 minutos de hidrólise), respectivamente, não exibindo diferença significativa entre si nesse parâmetro e apresentando concentração de, em média, 14 g/L desta pentose. Bukhari et al. (2021) alcançou resultados semelhantes ao realizar o pré-tratamento de

biomassa proveniente do tronco de dendezeiro com ácido oxálico 4 %, obtendo um hidrolisado com uma concentração de xilose de aproximadamente 15 g/L. Sabendo que o prosseguimento da pesquisa envolve a fermentação do hidrolisado, outro aspecto que deve ser considerado é a presença de substâncias inibidoras da ação dos microrganismos, nesse caso, o furfural, produto da degradação da xilose, e o HMF, produto da degradação de glicose. Nesse sentido, o ensaio PE8 (conforme Apêndice B) se destacou dos demais, com formação de 0,12 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF. Isso pode estar relacionado ao menor tempo de reação desse ensaio, 24 minutos, onde a hemicelulose solubilizada não ficou por muito tempo sob a ação do binômio “temperatura alta/ácido oxálico”, mitigando a degradação dos monômeros de xilose e glicose em compostos inibidores.

Tabela 4 - Caracterização físico-química da porção líquida dos ensaios de pré-tratamento.^{1, 2}

| Ensaio | Xilose (g/L) | Glicose (g/L) | HMF (g/L) | Furfural (g/L) |
|--------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| PE1 | 11,60 ^b ± 0,36 | 4,66 ^d ± 0,26 | 0,07 ^{de} ± 0,01 | 0,21 ^{ef} ± 0,01 |
| PE2 | 13,30 ^{ab} ± 1,25 | 5,62 ^{bc} ± 0,48 | 0,08 ^{cde} ± 0,01 | 0,26 ^e ± 0,02 |
| PE3 | 12,10 ^b ± 1,02 | 5,62 ^{bc} ± 0,45 | 0,19 ^{ab} ± 0,10 | 0,53 ^b ± 0,03 |
| PE4 | 13,38 ^{ab} ± 0,47 | 6,42 ^{ab} ± 0,13 | 0,16 ^{abc} ± 0,00 | 0,59 ^b ± 0,01 |
| PE5 | 13,53 ^{ab} ± 0,95 | 5,73 ^{abc} ± 0,40 | 0,10 ^{cde} ± 0,00 | 0,37 ^d ± 0,03 |
| PE6 | 8,77 ^c ± 0,32 | 2,85 ^e ± 0,08 | 0,04 ^e ± 0,00 | 0,15 ^{fg} ± 0,00 |
| PE7 | 14,85 ^a ± 0,96 | 6,55 ^a ± 0,31 | 0,12 ^{bcde} ± 0,00 | 0,45 ^c ± 0,02 |
| PE8 | 14,86 ^a ± 1,08 | 4,94 ^{cd} ± 0,21 | 0,05 ^e ± 0,00 | 0,12 ^g ± 0,00 |
| PE9 | 11,88 ^b ± 0,60 | 6,38 ^{ab} ± 0,31 | 0,22 ^a ± 0,01 | 0,79 ^a ± 0,05 |

Fonte: a autora.

¹ Resultados expressos como média ± desvio padrão.

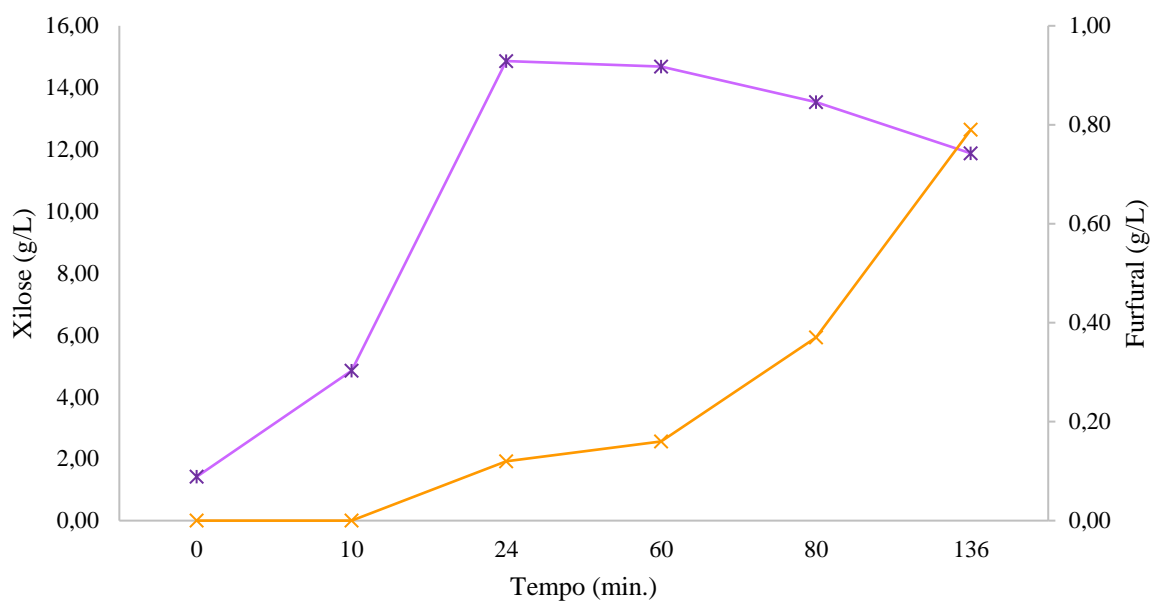
² Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$) com relação ao mesmo componente.

Por não haver diferença significativa na solubilização e concentração da xilose no hidrolisado, além da menor concentração de compostos inibidores que possam interferir na etapa de fermentação, optou-se por prosseguir o trabalho com as condições do ensaio PE8, com uma concentração de 4,5 % de ácido oxálico, 125,6 °C, 1,4 bar e 24 minutos em autoclave.

Para compreender melhor a cinética da hidrólise com ácido oxálico, uma série de ensaios foram conduzidos mantendo a concentração (4,5 %) de catalisador, temperatura e pressão, e variando o tempo de reação: 0, 10, 24, 60, 80 e 136 minutos. Os resultados (Figura 4) corroboraram a escolha pelo ensaio PE8, demonstrando que 24 minutos de reação, na condição

estudada, são suficientes para solubilizar uma quantidade superior a 99 % de hemicelulose na forma de monômeros de xilose, sem que haja uma degradação acentuada e formação de furfural. A partir dos 60 minutos ocorreu um relevante aumento na concentração de furfural, e consequente diminuição da concentração de xilose no hidrolisado. Sendo assim, utilizando essa concentração de ácido, optou-se por manter o tempo de reação em 24 minutos.

Figura 4 - Resultados da cinética de pré-tratamento do bagaço de malte utilizando 4,5 % de ácido oxálico com relação a concentração de xilose (linha roxa) e furfural (linha laranja).



Fonte: a autora.

A etapa de hidrólise enzimática não alterou significativamente a concentração de xilose no hidrolisado, passando de, em média, 14,86 g/L para 14,94 g/L após o tratamento. Isso pode ser explicado pelo fato de o ácido oxálico hidrolisar seletivamente a hemicelulose, resultando na liberação preferencial de monômeros de xilose e/ou arabinose (JEONG; KOO; LEE, 2022), não restando, assim, cadeias de hemicelulose para serem quebradas enzimaticamente. Finalmente, definida a melhor condição de pré-tratamento, partiu-se para os ensaios de fermentação.

4.2.3 Ensaios de fermentação para produção de xilitol, etanol e VOCs

Após a concentração em rotoevaporador, o hidrolisado destinado à fermentação apresentou uma concentração de carboidratos de aproximadamente 42 g/L, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização do hidrolisado concentrado utilizado na etapa de fermentação com relação à concentração de carboidratos (glicose, arabinose e xilose) e inibidores (ácido acético, furfural e HMF) (em g/L).

| Carboidratos | | |
|---------------------|--------------|--------------|
| Glicose | Xilose | Arabinose |
| 5,40 ± 0,03 | 22,98 ± 0,13 | 14,09 ± 0,10 |
| Inibidores | | |
| Ácido acético | Furfural | HMF |
| 1,12 ± 0,07 | 0,01 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 |

Fonte: a autora.

Pela primeira vez também foi possível identificar a presença de ácido acético no hidrolisado, que antes não aparecia possivelmente devido a diluição 1:2 efetuada nas alíquotas da fração líquida antes de enviá-las para análise em CLAE. O ácido acético apresenta forte poder inibitório sobre microrganismos quando presente em concentrações superiores a 5 g/L (BELLISSIMI et al., 2009; NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001; YANG et al., 2023). O hidrolisado concentrado a ser fermentado apresentou, em média, 1,12 g/L de ácido acético, e, portanto, abaixo do valor crítico anteriormente mencionado. A concentração de furfural apresentou queda após a etapa de concentração do hidrolisado. É possível que o composto tenha evaporado durante esse processo, devido à pressão de vapor reduzida a que foi submetido no rotoevaporador.

4.2.3.1 Consumo de carboidratos e produção de xilitol e etanol

Os ensaios de fermentação não apresentaram, de forma majoritária, produção de etanol ou xilitol por nenhuma das três linhagens de *S. cerevisiae* testadas (Tabela 6). O único experimento que exibiu etanol ao fim das 48 h foi o F12 (conforme Apêndice C), onde a linhagem MP-P5 foi utilizada, alcançando 1,76 g/L de álcool etílico no hidrolisado. A levedura consumiu, primeiramente, toda a glicose disponível, o que já era esperado devido às preferências metabólicas do microrganismo na presença deste carboidrato (KAYIKCI; NIELSEN, 2015), e nas últimas 12 h de ensaio iniciou o consumo de xilose. Na Figura 5, vê-se uma leve queda, cerca de 1,0 g/L, na concentração deste carboidrato no meio. É válido ressaltar que esta linhagem possui a capacidade de fermentar xilose graças a modificações

genéticas que integraram em seu genoma genes que codificam as enzimas necessárias à metabolização eficiente dessa pentose (TADIOTO et al., 2023).

O rendimento do ensaio F12 foi de 0,35 g_{etanol}/g_{glicose/xilose}, inferior ao máximo teórico, que é de 0,51 g_{etanol}/g_{glicose} (CHANG et al., 2018), porém esperado levando em consideração que a fermentação possivelmente estava sendo prejudicada por algum fator exógeno às leveduras, e que este rendimento máximo dificilmente é alcançado, mesmo em condições ótimas. Não era esperada a produção de xilitol por esta linhagem, uma vez que as modificações genéticas a que foi submetida fizeram com que produzisse etanol a partir do consumo da pentose. Ao final do experimento restaram aproximadamente 26 g/L de açúcares no meio, todavia, é importante salientar que possivelmente todos os carboidratos seriam consumidos se a fermentação fosse mantida por mais tempo, indo além das 48 h iniciais.

Este ensaio também apresentou aumento na concentração de glicerol no meio, de 0,42 g/L para 0,90 g/L, uma possível consequência ao estresse ocasionado pelo pH baixo, o que leva à danificação da parede celular e ativação de uma série de mecanismos de defesa, através das vias de integridade da parede celular (*Cell Wall Integrity pathway*) e de glicerol de alta osmolaridade (*High-osmolarity Glycerol pathway*), que inclui a acumulação de glicerol no interior da célula com a finalidade de manter seu tônus (DE NADAL; POSAS, 2022; RIBEIRO; BOURBON-MELO; SÁ-CORREIA, 2022; WU et al., 2022).

Tabela 6 - Resultados dos ensaios de fermentação utilizando as três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2, MP-P5 e JDY-01) com relação a concentração inicial e final de glicose, xilose, arabinose e produção de etanol e xilitol (em g/L). Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$) com relação ao mesmo carboidrato e ensaio.

| Ensaio | Temp. (°C) | pH | Glicose inicial | Glicose final | Xilose inicial | Xilose final | Arabinose inicial | Arabinose final | Etanol | Xilitol |
|---------------------------|------------|------|-------------------|-------------------|----------------|--------------|-------------------|-----------------|--------|---------|
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2 | | | | | | | | | | |
| F1 | 20 | 3,0 | 3,96 ^a | 2,89 ^b | 16,70 | 16,78 | 10,76 | 10,80 | 0,00 | 0,00 |
| F2 | 20 | 9,0 | 3,09 | 3,07 | 12,74 | 12,78 | 8,28 | 8,37 | 0,00 | 0,00 |
| F3 | 40 | 3,0 | 3,96 | 4,06 | 16,65 | 17,34 | 10,74 | 11,13 | 0,00 | 0,00 |
| F4 | 40 | 9,0 | 3,07 | 3,24 | 12,76 | 13,37 | 8,29 | 8,76 | 0,00 | 0,00 |
| F5 | 30 | 1,8 | 4,41 | 4,55 | 18,64 | 19,13 | 11,97 | 12,33 | 0,00 | 0,00 |
| F6 | 30 | 10,2 | 2,82 | 2,97 | 11,48 | 12,40 | 7,68 | 8,43 | 0,00 | 0,00 |
| F7 | 15,9 | 6,0 | 3,20 | 3,14 | 13,39 | 13,42 | 8,62 | 8,62 | 0,00 | 0,00 |

Tabela 6 – Continuação.

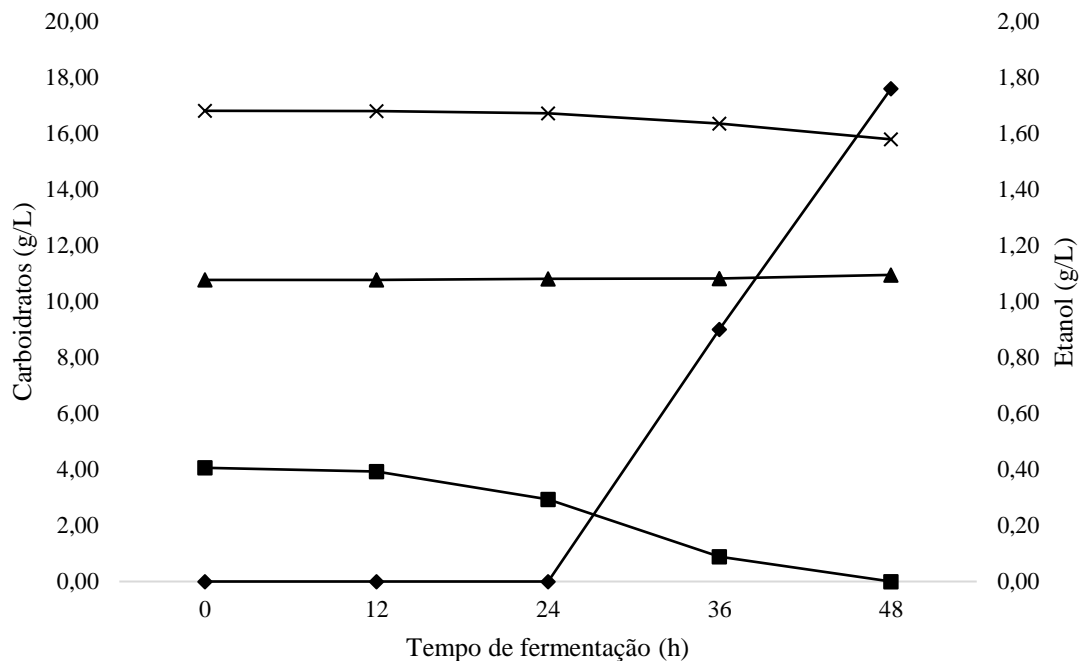
| | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|------|------|
| F8 | 44,1 | 6,0 | 3,19 | 3,37 | 13,26 | 13,85 | 8,54 | 8,95 | 0,00 | 0,00 |
| F9 | 30 | 6,0 | 3,35 | 3,31 | 13,89 | 14,16 | 8,95 | 9,18 | 0,00 | 0,00 |
| F10 | 30 | 6,0 | 3,37 | 3,38 | 13,94 | 14,20 | 8,96 | 9,16 | 0,00 | 0,00 |
| F11 | 30 | 6,0 | 3,37 ^a | 3,09 ^b | 13,94 | 14,14 | 8,97 | 9,20 | 0,00 | 0,00 |
| <i>S. cerevisiae</i> MP-P5 | | | | | | | | | | |
| F12 | 20 | 3,0 | 4,06 ^a | 0,00 ^b | 16,81 ^a | 15,79 ^b | 10,77 | 10,95 | 1,76 | 0,00 |
| F13 | 20 | 9,0 | 3,14 | 3,08 | 12,99 | 13,08 | 8,42 | 8,48 | 0,00 | 0,00 |
| F14 | 40 | 3,0 | 4,05 | 4,09 | 16,79 | 17,30 | 10,72 | 11,08 | 0,00 | 0,00 |
| F15 | 40 | 9,0 | 3,21 | 3,31 | 13,39 | 13,73 | 8,48 | 8,80 | 0,00 | 0,00 |
| F16 | 30 | 1,8 | 4,72 | 4,89 | 19,42 | 20,03 | 12,20 | 12,59 | 0,00 | 0,00 |
| F17 | 30 | 10,2 | 3,06 | 3,01 | 12,70 | 12,91 | 8,42 | 8,70 | 0,00 | 0,00 |
| F18 | 15,9 | 6,0 | 3,16 | 2,81 | 13,51 | 13,55 | 8,55 | 8,57 | 0,00 | 0,00 |
| F19 | 44,1 | 6,0 | 3,20 | 3,28 | 13,53 | 14,35 | 8,54 | 9,11 | 0,00 | 0,00 |
| F20 | 30 | 6,0 | 3,36 ^a | 3,13 ^b | 14,11 | 14,14 | 8,90 | 8,97 | 0,00 | 0,00 |
| F21 | 30 | 6,0 | 3,30 ^a | 2,84 ^b | 14,11 | 14,25 | 8,97 | 9,26 | 0,00 | 0,00 |
| F22 | 30 | 6,0 | 3,24 ^a | 3,02 ^b | 14,13 | 14,37 | 9,07 | 9,45 | 0,00 | 0,00 |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01 | | | | | | | | | | |
| F23 | 20 | 3,0 | 3,87 ^a | 3,39 ^b | 17,02 | 17,17 | 11,07 | 10,93 | 0,00 | 0,00 |
| F24 | 20 | 9,0 | 3,17 | 3,18 | 13,34 | 13,44 | 8,47 | 8,52 | 0,00 | 0,00 |
| F25 | 40 | 3,0 | 4,37 | 4,56 | 17,28 | 18,11 | 10,92 | 11,46 | 0,00 | 0,00 |
| F26 | 40 | 9,0 | 3,32 | 3,46 | 13,30 | 13,47 | 8,41 | 8,57 | 0,00 | 0,00 |
| F27 | 30 | 1,8 | 4,81 | 4,94 | 19,30 | 20,04 | 12,17 | 12,61 | 0,00 | 0,00 |
| F28 | 30 | 10,2 | 3,05 | 3,06 | 12,48 | 12,99 | 8,27 | 8,72 | 0,00 | 0,00 |
| F29 | 15,9 | 6,0 | 3,19 | 3,14 | 13,60 | 13,78 | 8,61 | 8,69 | 0,00 | 0,00 |
| F30 | 44,1 | 6,0 | 3,18 | 3,35 | 13,31 | 14,33 | 8,39 | 9,06 | 0,00 | 0,00 |
| F31 | 30 | 6,0 | 3,42 ^a | 3,03 ^b | 14,22 | 14,47 | 8,95 | 9,26 | 0,00 | 0,00 |
| F32 | 30 | 6,0 | 3,44 ^a | 2,15 ^b | 14,26 | 14,39 | 9,00 | 9,29 | 0,00 | 0,00 |
| F33 | 30 | 6,0 | 3,24 | 3,37 | 14,49 | 14,64 | 9,00 | 9,32 | 0,00 | 0,00 |

Fonte: a autora.

Os ensaios F1 e F11, com a levedura PE-2, F20, F21 e F22 com a levedura MP-P5, e F23, F31, F32 e F33 com a levedura JDY-01, apresentaram leve queda na concentração de glicose ao longo das 48 h de fermentação. Os valores iniciais e finais se mostraram significativamente diferentes quando submetidos a um teste de diferença de médias (teste *t*), o que pode significar que houve consumo por parte das leveduras, que possivelmente ainda estavam se adaptando ao meio, não resultando em produção de etanol. Esta fase de adaptação, chamada de fase *lag*, pode durar horas ou até mesmo dias, a depender das condições que o

microrganismo encontra durante a mudança de ambiente (VERMEERSCH et al., 2019). Apesar disso, uma fase *lag* longa nem sempre é indicativo de estresse celular, como Hamill et al. (2020) demonstraram num estudo conduzido com vários microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Os autores argumentam que fases *lag* longas ocorrem naturalmente em espécies nativas, e que a duração desta etapa está mais relacionada com uma adaptação minuciosa ao ambiente do que com uma condição de estresse celular para a população submetida àquela situação.

Figura 5 – Resultado do ensaio F12 com relação à concentração de glicose (linha com quadrado), xilose (linha com x), arabinose (linha com triângulo) e etanol (linha com losango) após 48 h de fermentação pela linhagem MP-P5 da levedura *S. cerevisiae*.



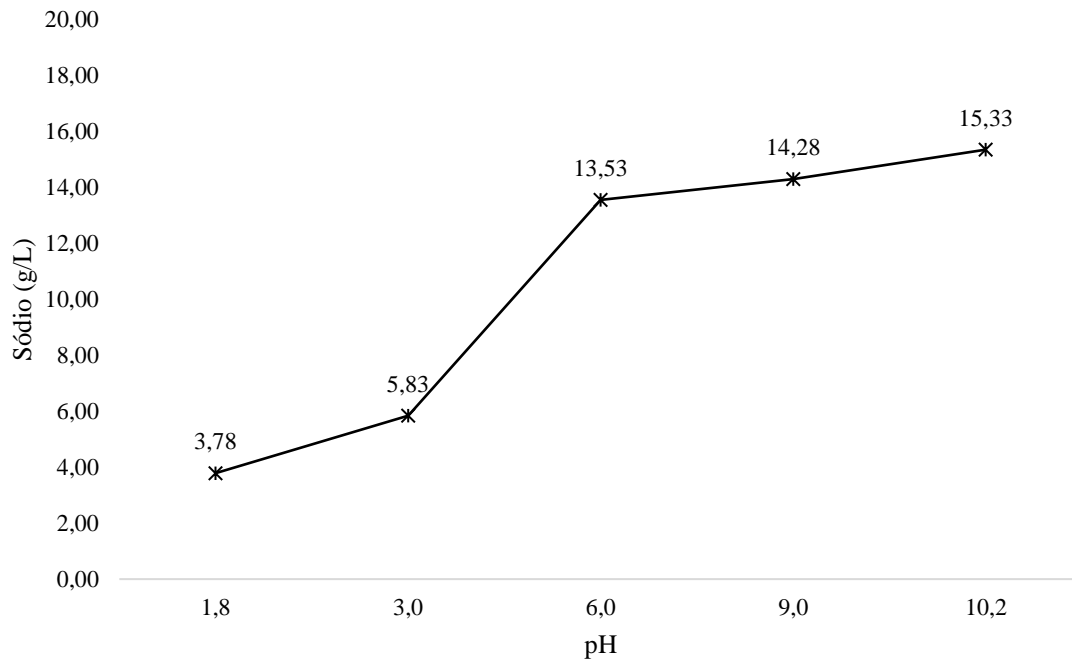
Os ensaios que não produziram etanol ou xilitol, e onde não houve consumo de carboidratos, possivelmente foram afetados por fatores limitantes à atuação das leveduras, como o pH inicial do hidrolisado e a presença residual do ácido oxálico (utilizado na etapa de pré-tratamento) ou da sua base conjugada (oxalato), decorrente da elevação do pH do meio, realizada conforme o planejamento experimental.

O pH do meio é considerado um fator determinante para a viabilidade celular e metabólica de leveduras durante a fermentação. A maioria das cepas de *S. cerevisiae* cresce em valores de pH entre 2,50 e 8,50, dependendo da temperatura, presença de oxigênio e linhagem utilizada, sendo que a faixa ótima encontra-se entre 4,00 e 6,00, apresentando um rendimento

superior em ambientes ácidos (LIU et al., 2015). Diversos estudos sugerem que em ambiente com pH muito ácido ($< 2,50$), a performance das leveduras é significativamente afetada, levando ao aumento da fase *lag*, inibição do crescimento microbiano, e até mesmo danificação da parede e DNA celular, o que pode ser irreversível e inviabilizar completamente a levedura (LIU et al., 2015; SALAS-NAVARRETE et al., 2022; WU et al., 2022). Este possivelmente é o motivo pelo qual os ensaios F5, F16 E F27 não apresentaram nenhum tipo de consumo de carboidrato ou produção de etanol e xilitol, independentemente da linhagem da levedura, após as 48 h de experimento. Ambientes alcalinos, com pH acima de 8,00 – 8,20, são ainda mais estressantes para leveduras. Nestas condições uma série de mecanismos adaptativos são ativados na tentativa de sobreviver a mudança de meio, o que acaba perturbando a homeostase de nutrientes pelo impacto nas vias de captação/utilização de ferro, cobre, fosfato e glicose (ARIÑO, 2010; CANADELL et al., 2015). Visto que os ensaios F2, F4, F6, F13, F15, F17, F24, F26 e F28 têm pH inicial com valores de 9,00 e 10,00, já era esperado que as leveduras encontrassem dificuldades para produzir ou consumir algo durante estes experimentos.

Todavia, a maioria dos ensaios que apresentavam níveis de pH e temperatura onde leveduras costumam mostrar bom desempenho não tiveram resultados compatíveis ao esperado com relação ao consumo de carboidratos e produção de etanol e/ou xilitol. Como a temperatura não parecia ser um fator significativamente limitante nos níveis em que foi estabelecida, variando entre 15 e 40 °C, e os valores de pH entre 3,00 e 6,00 costumam favorecer a atividade da levedura, pareceu pertinente analisar minuciosamente o hidrolisado utilizado para a fermentação a procura de algo que pudesse estar afetando o metabolismo dos microrganismos utilizados. Assim, chegou-se à conclusão de que as concentrações de oxalato e de sódio (em associação ou não) presentes no meio foram determinantes para o não rendimento fermentativo das três linhagens de *S. cerevisiae*, desfavorecendo o metabolismo das leveduras e fazendo com que não conseguissem se adaptar às condições de estresse a que foram submetidas. A concentração de sódio nos hidrolisados nas diferentes faixas de pH foi estabelecida através de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama. Os resultados encontram-se na Figura 6.

Figura 6 – Resultado da análise quantitativa de sódio presente nos hidrolisados utilizados na etapa de fermentação com relação às diferentes faixas de pH (1,8 – 3,0 – 6,0 – 9,0 – 10,2) (em g/L).



O ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ou, mais precisamente, $\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$), utilizado no pré-tratamento para a solubilização da hemicelulose do bagaço de malte, é um ácido orgânico dicarboxílico ($\text{pK}_{\text{a}1} = 1.25$ e $\text{pK}_{\text{a}2} = 4.27$) e amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado na forma de ácido oxálico ou oxalato, sua base conjugada (a depender do pH). O oxalato pode formar diversos tipos de sais, dependendo do metal disponível e da solubilidade dos produtos formados por estas espécies químicas (PALMIERI et al., 2019).

O hidrolisado utilizado para a etapa de fermentação possuía uma concentração de aproximadamente 45 g/L de ácido oxálico, uma vez que foi utilizada uma solução contendo 4,5 % (m/v) deste ácido na solubilização das hemiceluloses do bagaço de malte. Em meio aquoso o ácido oxálico pode estar disponível tanto na forma de ácido quanto de sua base conjugada, o oxalato, que em pH neutro é completamente dissociado e pode formar sais a depender da espécie química disponível no meio. O ajuste de pH do hidrolisado hemicelulósico utilizado aqui foi efetuado com solução de hidróxido de sódio 2M, que dissociado libera íons de sódio, resultando na formação de oxalato de sódio. Isso não seria um problema em baixas concentrações, contudo, como o ácido oxálico possui dois valores de pKa, isso confere a ele dois pontos de tamponamento, sendo o primeiro na faixa de pH entre 0,25 – 2,25 e outro logo na sequência, entre 3,27 – 5,27 (PALMIERI et al., 2019). Portanto, durante o ajuste de pH foi

necessário adicionar uma grande quantidade de solução básica a fim de superar estas duas faixas de tamponamento e atingir os níveis de pH definidos para os experimentos, o que acarretou uma concentração elevada de íons de sódio no meio, como pode ser visto na Figura 6. Por exemplo, foram gastos cerca de 450 mL de NaOH 2M para atingir o pH 6,0 em 800 mL de hidrolisado hemicelulósico, posteriormente utilizado na etapa de fermentação.

A presença do ácido oxálico, majoritariamente em sua forma indissociada, nos ensaios do planejamento com pH 1,8 e 3,0 mostrou ter um relevante efeito inibitório sobre as leveduras. Em meios de cultura com valores de pH baixos, a forma indissociada da molécula de ácido oxálico se difunde com facilidade através da membrana plasmática da levedura, onde, no citosol, valores de pH mais elevados (entre 7,0 – 7,4) do que os do ambiente externo ocasionarão a dissociação do ácido à sua forma iônica, com liberação de prótons, acidificação do citoplasma e consequente danos à célula. Altas concentrações de H^+ dentro da célula acabam gerando demandas muito altas de ATP, em detrimento do crescimento celular, para controlar a acidificação no interior da célula, o que gera subsequente dano à célula, incluindo perturbação do sistema de gradiente eletroquímico, redução na síntese de DNA e RNA e culminando em morte celular programada (apoptose) (BONATTO et al., 2020).

A levedura *S. cerevisiae* possui a habilidade de produzir CO_2 a partir da degradação de oxalato (FOSTER; NAKATA, 2014), contudo, a presença e assimilação deste íon em altas concentrações, em combinação com o sódio proveniente da neutralização pode impor limitações metabólicas ao microrganismo. Em pH 6,0 o ácido oxálico estava quase totalmente dissociado, fazendo com que os níveis de oxalato livre atingissem a mesma concentração inicial do ácido, cerca de 45 g/L. O estresse osmótico causado pela concentração aumentada de sais no meio causa um rápido encolhimento celular, que mesmo em pequenas proporções ocasiona uma desaceleração nos processos de difusão celular, impactando diretamente processos fermentativos ou respiratórios (BABAZADEH et al., 2017). Além disso, o oxalato é um conhecido inibidor da atividade do citocromo b2, que tem importante papel no metabolismo da molécula de glicose dentro da mitocôndria, a partir da transformação do piruvato em etanol e CO_2 (BLAZY; BAUDRAS; THUSIUS, 1976; THUSIUS; BLAZY; BAUDRAS, 1976).

Sendo assim, a alta concentração de oxalato/ácido oxálico nos hidrolisados, e sua associação com o sódio, proveniente do NaOH 2M utilizado no ajuste de pH, podem ser considerados fatores determinantes para o revés fermentativo durante a condução dos ensaios. Isso vale, portanto, até mesmo para o pH 6,0, no qual a levedura deveria encontrar um ambiente metabólico ótimo para produzir etanol a partir dos carboidratos disponíveis. Mesmo a linhagem

JDY-01, modificada geneticamente para ter mais tolerância a presença de substâncias inibidoras (TADIOTO et al., 2023), não conseguiu superar, dentro das 48 h de ensaio, o obstáculo da concentração de oxalato no meio em que foi inoculada e produzir etanol.

Por fim, pode-se afirmar que o ácido oxálico, apesar de muito efetivo na solubilização das hemiceluloses presentes no bagaço de malte, com menor produção de compostos inibidores derivados da degradação dos carboidratos, quando utilizado em concentrações superiores a 3,0 %, tende a ser um problema se a etapa subsequente envolver neutralização e fermentação com microrganismos. Comportamento semelhante foi relatado por Bukhari et al. (2021), onde, apesar de alcançar um maior rendimento de xilose utilizando 3,0 e 4,0 % (w/v) de ácido oxálico no pré-tratamento de biomassa de dendezeiro, não obteve êxito na etapa de fermentação com *A. succinogenes* para produção de ácido succínico. Os autores também relatam que, com 1,0 % (w/v) de ácido oxálico, a mesma levedura conseguiu produzir 12.69 g/L de ácido succínico, ao passo que um aumento para 2,0 % (w/v) diminuiu em cerca de 45,0 % a produtividade. Os resultados são coerentes com os encontrados por Jung et al. (2014), onde concentrações superiores a 3,0 % (w/v) de ácido maleico, outro ácido orgânico, inibiram significativamente o metabolismo a levedura *S. cerevisiae* D₅A para obtenção de bioetanol. Portanto, é prudente que o ácido oxálico seja aplicado em concentrações máximas de 3,0 % para evitar perturbações metabólicas significativas nas leveduras durante a etapa de fermentação. Como alternativa, vale mencionar que uma etapa de destoxificação biológica com o fungo *Paecilomyces variotii* FN89 se mostrou efetiva na degradação de 68,0 % do ácido oxálico utilizado no pré-tratamento de palha de trigo e milho, sem que houvesse alteração na concentração de carboidratos, possibilitando um rendimento máximo de 0,47 g_{etanol}/g_{glicose}/g_{xilose} após fermentação com *S. cerevisiae* XH7 (ZHANG et al., 2021).

Seguiu-se, então, com a análise de produção de compostos orgânicos voláteis, a fim de avaliar se, apesar de não haver consumo significativo dos carboidratos presentes no meio, e produção de etanol ou xilitol, as leveduras metabolizaram outros compostos em meio à situação adversa em que se encontravam.

4.2.3.2 Produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Os extrativos provenientes da extração líquido-líquido dos sobrenadantes coletados dos 33 hidrolisados hemicelulósicos pós-fermentação foram submetidos ao cromatógrafo gasoso

acoplado ao espectrômetro de massas. Também foram analisados os hidrolisados nas diferentes faixas de pH antes da fermentação, para que compostos que já estavam presentes no meio de cultura previamente não fossem erroneamente considerados como metabólitos produzidos durante a fermentação. Em virtude de os hidrolisados terem sido suplementados com peptona e extrato de levedura, e de os extrativos conterem moléculas residuais de células mortas, as detecções de compostos alcanos oriundos de ácidos graxos, aminoácidos, e alguns outros compostos, como o Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-, foram desconsideradas, não sendo provenientes do metabolismo das linhagens avaliadas. Os principais VOCs identificados nos hidrolisados após a etapa de fermentação estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – VOCs identificados nos hidrolisados de cada ensaio após 48 h de fermentação pelas linhagens PE-2, MP-P5 e JDY-01 da levedura *S. cerevisiae*.

| Possível composto | Ensaio | Área do pico (%) | Tempo de retenção | Similaridade (%) |
|-----------------------------------|--------|------------------|-------------------|------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2 | | | | |
| Álcool fenetílico | F1 | 4,76 | 5,958 | 98 |
| | F3 | 4,81 | 5,963 | 98 |
| | F10 | 1,44 | 5,968 | 97 |
| | F11 | 1,31 | 5,950 | 96 |
| 2,4-Di-tert- butilfenol | F1 | 1,58 | 19,542 | 89 |
| | F3 | 1,22 | 4,162 | 94 |
| Pantolactona | F7 | 0,61 | 4,170 | 94 |
| | F8 | 1,79 | 4,164 | 95 |
| | F10 | 1,26 | 4,166 | 93 |
| | F11 | 0,96 | 4,152 | 92 |
| 4-Hidroxi-2-metilacetofenona | F9 | 35,31 | 12,672 | 89 |
| | F10 | 43,32 | 12,661 | 89 |
| | F11 | 48,22 | 12,655 | 89 |
| <i>S. cerevisiae</i> MP-P5 | | | | |
| Álcool fenetílico | F12 | 20,69 | 5,967 | 98 |
| | F14 | 1,52 | 5,972 | 96 |
| | F17 | 0,65 | 5,933 | 97 |
| | F18 | 3,14 | 5,965 | 97 |
| | F19 | 8,44 | 5,950 | 98 |
| | F20 | 1,06 | 5,983 | 97 |
| | F21 | 1,60 | 5,97 | 98 |
| Pantolactona | F12 | 1,60 | 4,167 | 94 |
| | F14 | 1,65 | 4,172 | 95 |
| | F17 | 0,51 | 4,137 | 95 |
| | F18 | 2,43 | 4,165 | 95 |

Tabela 7 – Continuação.

| | | | | |
|------------------------------------|------|-------|--------|----|
| Pantolactona | F19 | 2,36 | 4,156 | 93 |
| | F20 | 0,69 | 4,183 | 93 |
| | F21 | 0,73 | 4,170 | 93 |
| Etanol, 2-(pentiloxi)-, acetato | F12 | 1,41 | 3,079 | 87 |
| 1-Propanol, 3-(metilthio)- | F12 | 1,56 | 3,375 | 80 |
| | F17 | 0,57 | 3,320 | 80 |
| Indol-3-etanol | F12 | 1,62 | 24,877 | 95 |
| 4-Hidroxi-2-metilacetofenona | F20 | 48,48 | 12,676 | 89 |
| | F21 | 44,60 | 12,676 | 87 |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01 | | | | |
| Álcool fenetílico | F23 | 3,05 | 5,982 | 97 |
| | F27 | 0,59 | 5,972 | 97 |
| | F29 | 1,81 | 5,942 | 96 |
| | F30 | 6,55 | 5,957 | 97 |
| | F31 | 2,54 | 5,937 | 97 |
| | F32 | 1,22 | 5,979 | 97 |
| | F33 | 0,70 | 6,002 | 97 |
| Pantolactona | F23 | 1,91 | 4,179 | 94 |
| | F24 | 1,72 | 4,175 | 92 |
| | F25 | 2,02 | 4,178 | 95 |
| | F27 | 0,51 | 4,170 | 93 |
| | F29 | 2,40 | 4,138 | 94 |
| | F30 | 2,07 | 4,155 | 93 |
| | F31 | 1,09 | 4,138 | 92 |
| | F32 | 0,74 | 4,177 | 91 |
| F33 | 0,66 | 4,200 | 93 | |
| Tridecanal | F26 | 0,71 | 28,977 | 89 |
| Ácido linoleico | F26 | 44,11 | 31,679 | 94 |
| Ácido esteárico | F26 | 3,43 | 32,242 | 80 |
| 4-Hidroxi-2-metilacetofenona | F25 | 2,22 | 12,676 | 87 |
| | F27 | 37,68 | 12,696 | 89 |
| | F31 | 48,11 | 12,664 | 89 |
| | F32 | 55,02 | 12,705 | 89 |
| | F33 | 45,96 | 12,695 | 89 |

Analisando as áreas dos cromatogramas gerados, de forma quantitativa, destaca-se a substância 4-Hidroxi-2-metilacetofenona, composto fenólico com importantes propriedades antioxidantes, antitumorais, analgésicas e antissépticas (DANDEKAR; FEGADE; BHASKAR, 2015; MARTINEZ et al., 2019), que apareceu de forma expressiva nos ensaios conduzidos com pH 6,0 utilizando as três linhagens de levedura (F9, F10, F11 – PE2; F20, F21 – MP-P5; F31,

F32, F33 – JDY-01). Esta substância faz parte de um grupo de compostos orgânicos biologicamente ativos chamado “sesquiterpenlactonas”, sendo um metabolito secundário prevalente em diversas espécies de plantas, mas também encontrado em alguns fungos, e que vem ganhando bastante atenção por seu potencial uso medicinal (SECA; SILVA; PINTO, 2017).

O ensaio F26, onde a linhagem JDY-01 foi utilizada, apresentou pico com área correspondente a 44,11 % para o composto ácido linoleico. Os mecanismos de síntese de lipídeos por *S. cerevisiae* são conhecidos, e sabe-se que ela é capaz de produzir ácidos graxos saturados e monoinsaturados compostos de 16 e 18 carbonos com não mais do que duas insaturações na cadeia (YAZAWA et al., 2009). You et al. (2017) conduziram estudos bem-sucedidos com o objetivo de aumentar a produtividade de ácidos graxos por esta levedura. Ao sobre-expressarem as enzimas acetil-CoA carboxilase, tioesterase e málica, os autores alcançaram uma produtividade 2,4 vezes superior de ácidos graxos, que subiu em 4,7 vezes utilizando nitrato de cálcio como fonte de nitrogênio. Dada a importante identificação de ácido linoleico no ensaio F26, é importante considerar a utilização desta linhagem para fins que vão além de produção de bioetanol.

A presença de pantolactona foi identificada em pequenas porcentagens nos extrativos da maioria dos ensaios pós-fermentação. Este composto pode estar presente intracelularmente ou ser excretada pela levedura durante processos fermentativos. Zea et al. (1995) identificou o acúmulo e a excreção para o mosto desta lactona pela levedura *S. cerevisiae* durante a maturação de vinhos tipo Xerez, com importante papel na formação do véu característico durante o processo de envelhecimento da bebida. A pantolactona é um produto intermediário da biossíntese de ácido pantotênico (vitamina B5), essencial no funcionamento do ciclo de Krebs, metabolismo de lipídeos e crescimento celular de leveduras (ZHANG et al., 2020). Também é muito utilizada na indústria de cosméticos como umectante (BLANCHARD et al., 2022).

Outro composto identificado em vários ensaios foi o álcool fenetílico, um álcool primário com aroma de rosas bastante pronunciado, bastante utilizado na indústria de farmacêutica, de cosméticos e alimentos. Possui propriedades antimicrobianas e antifúngicas importantes, podendo ser aplicado como conservante em cosméticos, medicamentos e alimentos (DREŽEK et al., 2021). A partir do metabolismo de leveduras, pode ser obtido através de duas rotas metabólicas: a via do ácido chiquímico, ou pela via de Ehrlich, nas quais aminoácidos, principalmente a fenilalanina (aqui presente sobretudo pela adição de extrato de

levedura aos hidrolisados) sofrem uma série de modificações catabólicas que culminam na liberação de álcool fenético pela célula (MIERZEJEWSKA et al., 2019; MITRI et al., 2022a). A presença deste composto foi bastante pronunciada no ensaio F12 (21 %), possibilitando potencial recuperação, onde também houve acúmulo de etanol e outros compostos derivados, como o Indol-3-etanol e etanol, 2-(pentiloxi), acetato.

Por fim, apesar das adversidades metabólicas encontradas pelas três linhagens de *S. cerevisiae*, todas conseguiram produzir compostos interessantes sob o ponto de vista biotecnológico, o que mais uma vez estabelece esta levedura como uma “biofábrica” com importantes e potenciais aplicações industriais ainda a serem exploradas.

5 CONCLUSÃO

Apesar de eficiente na solubilização da porção hemicelulósica do bagaço de malte, a utilização de 4,5 % de ácido oxálico no pré-tratamento resultou num importante comprometimento metabólico das três linhagens de levedura utilizadas na etapa de fermentação, devido a dissociação de uma grande quantidade de oxalato relacionado com a etapa de ajuste de pH do hidrolisado, que se mostrou extremamente tóxico para os microrganismos utilizados. Houve produção de etanol (1,76 g/L) no ensaio F12 (pH 3,0 e 20 °C), onde toda a glicose do meio foi consumida, com início da assimilação de xilose nas últimas 12 h de ensaio. O consumo e produção possivelmente seriam acentuados caso a fermentação fosse mantida por mais tempo além das 48 h pré-estabelecidas. Não foi possível identificar produção de xilitol em nenhum ensaio com a linhagem PE-2.

A produção de compostos orgânicos voláteis trouxe resultados interessantes com relação aos compostos álcool fenetílico, pantolactona e, principalmente, 4-Hidroxi-2-metilacetofenona, este último sendo responsável por áreas de pico de, em média, 40,0 % nos ensaios em que foi identificado, tendo sido produzido pelas três linhagens. Outro resultado interessante ficou por conta do ensaio F26, onde foi utilizada a linhagem JDY-01, que apresentou pico com área correspondente a 44,1 % para ácido linoleico, um ácido graxo de cadeia longa essencial na dieta da maioria dos seres vivos.

A alta concentração de oxalato no hidrolisado destinado à fermentação foi determinante na inibição dos processos metabólicos associados a produção de etanol e xilitol. Concentrações abaixo de 3,0 % de ácidos orgânicos no pré-tratamento de biomassas são relatadas na literatura como “seguras” para a maioria dos microrganismos, onde maiores tempos de reação ou temperaturas podem ser empregadas para compensar a menor utilização de catalisador.

REFERÊNCIAS

- ARIÑO, J. Integrative Responses to High pH Stress in *S. cerevisiae*. <https://home.liebertpub.com/omi>, v. 14, n. 5, p. 517–523, 18 out. 2010.
- ASTM E1721-95. **Standard Test Method for Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass**. [s.l.] American Society for Testing and Materials, 1995.
- BABAZADEH, R. et al. The yeast osmostress response is carbon source dependent. **Scientific Reports** **2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 20 abr. 2017.
- BELLISSIMI, E. et al. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 3, p. 358–364, 1 maio 2009.
- BLANCHARD, G. et al. Allergic contact dermatitis from pantolactone and dexpanthenol in wound healing creams. **Contact Dermatitis**, v. 87, n. 5, p. 468–471, 1 nov. 2022.
- BLAZY, B.; BAUDRAS, A.; THUSIUS, D. Mechanism of Yeast Cytochrome b2, Action. II. Steady-State Kinetics of Oxalate Inhibition. **Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 257–261, 1 jan. 1976.
- BONATTO, C. et al. Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2445–2450, 1 jan. 2020.
- BUKHARI, N. A. et al. Oil palm trunk biomass pretreatment with oxalic acid and its effect on enzymatic digestibility and fermentability. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 119–123, 1 jan. 2021.
- CANADELL, D. et al. Impact of high pH stress on yeast gene expression: A comprehensive analysis of mRNA turnover during stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 6, p. 653–664, 1 jun. 2015.
- CÂNDIDA RABELO, S. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 23 abr. 2010.
- CHANG, Y. H. et al. Enhancement of the Efficiency of Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* via Gradually Batch-Wise and Fed-Batch Increasing the Glucose Concentration. **Fermentation** **2018, Vol. 4, Page 45**, v. 4, n. 2, p. 45, 13 jun. 2018.
- DAHMEN, N. et al. Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. **GCB Bioenergy**, v. 11, n. 1, p. 107–117, 1 jan. 2019.
- DANDEKAR, R.; FEGADE, B.; BHASKAR, V. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 1, p. 148–154, 2015.

- DAVISON, B. H. et al. Plant Cell Walls: Basics of Structure, Chemistry, Accessibility and the Influence on Conversion. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**, p. 23–38, 5 abr. 2013.
- DE NADAL, E.; POSAS, F. The HOG pathway and the regulation of osmoadaptive responses in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. 1–7, 7 dez. 2022.
- DEVI, A. et al. A panoramic view of technological landscape for bioethanol production from various generations of feedstocks. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095702>, v. 14, n. 1, p. 81–112, 1 dez. 2023.
- DHARMALINGAM, B. et al. Organic Acid Pretreatments and Optimization Techniques for Mixed Vegetable Waste Biomass Conversion into Biofuel Production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 1–16, 26 set. 2022.
- DOS SANTOS, D. M. et al. Microwave-assisted carboxymethylation of cellulose extracted from brewer's spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 125–133, 20 out. 2015.
- DRESCH, A. P. et al. DIFFERENT TREATMENTS OF PEARL MILLET BIOMASS FOR CELLULOSE RECOVERY: EFFECTS ON LIGNOCELLULOSIC COMPOSITION. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 57, n. 3–4, p. 227–236, 10 maio 2023.
- DREŹEK, K. et al. Development of a Continuous System for 2-Phenylethanol Bioproduction by Yeast on Whey Permeate-Based Medium. **Molecules 2021, Vol. 26, Page 7388**, v. 26, n. 23, p. 7388, 6 dez. 2021.
- ELIOPOULOS, C. et al. Conversion of brewers' spent grain into proteinaceous animal feed using solid state fermentation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 20, p. 29562–29569, 1 abr. 2022.
- FOSTER, J.; NAKATA, P. A. An oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 588, n. 1, p. 160–166, 3 jan. 2014.
- GÖNEN, Ç.; DEVECI, E. Ü.; AKTER ÖNAL, N. Evaluation of biomass pretreatment to optimize process factors for different organic acids via Box–Behnken RSM method. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 23, n. 5, p. 2016–2027, 1 set. 2021.
- HAMILL, P. G. et al. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–20, 3 abr. 2020.
- HOADLEY, A. et al. Biorefinery Development Based on Brewers' Spent Grain (BSG) Conversion: A Forecasting Technology Study in the Brazilian Scenario. **Biomass 2023, Vol. 3, Pages 217-237**, v. 3, n. 3, p. 217–237, 30 jun. 2023.
- HYMAN, D. et al. **Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 06/01/2007**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nrel.gov>.
- IKRAM, S. et al. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 1 out. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4^a ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAEGER, A. ; et al. Functional Properties of Brewer's Spent Grain Protein Isolate: The Missing Piece in the Plant Protein Portfolio. **Foods** **2023**, Vol. **12**, Page **798**, v. 12, n. 4, p. 798, 13 fev. 2023.

JEONG, S. Y.; KOO, B.; LEE, J. W. Structural changes in biomass (yellow poplar and empty fruit bunch) during hydrothermal and oxalic acid pretreatments and their effects on enzymatic hydrolysis efficiency. **Industrial Crops and Products**, v. 178, p. 114569, 1 abr. 2022.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 1 jan. 2016.

JUNG, Y. H. et al. Whole slurry fermentation of maleic acid-pretreated oil palm empty fruit bunches for ethanol production not necessitating a detoxification process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 4, p. 659–665, 24 ago. 2014.

JUNTTILA, M. H. Extraction of brewers' spent grain in near subcritical conditions: A method to obtain high protein contents extracts. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 10, p. 100378, 1 dez. 2022.

KAYIKCI, Ö.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 6, p. 68, 1 set. 2015.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 15 abr. 2009.

LEE, J. W. et al. Scale-up study of oxalic acid pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7451–7456, 1 ago. 2011.

LIU, B. et al. Application and prospect of organic acid pretreatment in lignocellulosic biomass separation: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 1400–1413, 1 dez. 2022.

LIU, L. et al. Mannitol assisted oxalic acid pretreatment of poplar for the deconstruction and separation of hemicellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 200, p. 116811, 15 set. 2023.

LIU, X. et al. Effect of Initial PH on Growth Characteristics and Fermentation Properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 4, p. M800–M808, 1 abr. 2015.

MALINSKÁ, H. A. et al. Plant priming changes physiological properties and lignin content in *Miscanthus x giganteus*. **Industrial Crops and Products**, v. 174, p. 114185, 15 dez. 2021.

MARTINEZ, S. J. et al. Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, p. 459024, 26 jun. 2019.

MASSARDI, M. M.; MASSINI, R. M. M.; SILVA, D. DE J. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE VALOR AGREGADO. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 1, p. 0083–0091, 27 fev. 2020.

MERAL, R. et al. The potential use of agro-industrial by-products as sources of bioactive compounds: a nanotechnological approach. Em: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2022. v. 73p. 435–466.

MIERZEJEWSKA, J. et al. Hydrolyzed corn stover as a promising feedstock for 2-phenylethanol production by nonconventional yeast. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 777–784, 1 mar. 2019.

MITRI, S. et al. Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. **Foods 2022, Vol. 11, Page 109**, v. 11, n. 1, p. 109, 1 jan. 2022a.

MITRI, S. et al. Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. **Fermentation 2022, Vol. 8, Page 50**, v. 8, n. 2, p. 50, 25 jan. 2022b.

MUJTABA, M. et al. Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 402, p. 136815, 20 maio 2023.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1264–1275, 1 maio 2014.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2453–2460, 1 nov. 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171–177, 1 mar. 2001.

NIEVES, L. M.; PANYON, L. A.; WANG, X. Engineering sugar utilization and microbial tolerance toward lignocellulose conversion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. FEB, p. 127907, 18 fev. 2015.

NORDIN, N. et al. Highly sustainable cascade pretreatment of low-pressure steam heating and organic acid on pineapple waste biomass for efficient delignification. **Fuel**, v. 321, p. 124061, 1 ago. 2022.

PALMIERI, F. et al. Oxalic acid, a molecule at the crossroads of bacterial-fungal interactions. Em: GADD, G. M.; SARIASLANI, S. (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.: s.n.]. v. 106p. 49–77.

PASANGULAPATI, V. et al. Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 663–669, 1 jun. 2012.

- PIN, T. C. et al. Screening of protic ionic liquids for sugarcane bagasse pretreatment. **Fuel**, v. 235, p. 1506–1514, 1 jan. 2019.
- RIBEIRO, R. A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 953479, 28 jul. 2022.
- ROQUE, L. R. et al. Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v. 242, p. 775–787, 15 abr. 2019.
- SALAS-NAVARRETE, P. C. et al. Evolutionary and reverse engineering to increase *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to acetic acid, acidic pH, and high temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 383–399, 1 jan. 2022.
- SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–318, 1 maio 1988.
- SANTOS, J. C. et al. Biomass Pretreatment With Oxalic Acid for Value-Added Products. Em: **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 187–208.
- SECA, A. M. L.; SILVA, A. M. S.; PINTO, D. C. G. A. Parthenolide and Parthenolide-Like Sesquiterpene Lactones as Multiple Targets Drugs: Current Knowledge and New Developments. Em: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 52p. 337–372.
- SGANZERLA, W. G. et al. A bibliometric analysis on potential uses of brewer's spent grains in a biorefinery for the circular economy transition of the beer industry. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 6, p. 1965–1988, 1 nov. 2021.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 3/31/2008**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.nrel.gov>.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 7/17/2005**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.nrel.gov>.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.
- TADIOTO, V. et al. Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 8, p. 1133–1145, 24 ago. 2023.

TAPPI. **TAPPI Test methods T 204 cm-97: Solvent extractives of wood and pulp.**

Technical Association of the Pulp Paper Industry - TAPPI, , 1997.

THUSIUS, D.; BLAZY, B.; BAUDRAS, A. Mechanism of Yeast Cytochrome b2 Action. I. Thermodynamics and Relaxation Kinetics of the Interaction between Cytochrome b2 and Oxalate. **Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 250–256, 1 jan. 1976.

VARGAS, A. C. G. et al. Batch Fermentation of Lignocellulosic Elephant Grass Biomass for 2G Ethanol and Xylitol Production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 1–10, 9 jan. 2023.

VELVIZHI, G. et al. Emerging trends and advances in valorization of lignocellulosic biomass to biofuels. **Journal of Environmental Management**, v. 345, p. 118527, 1 nov. 2023.

VERMEERSCH, L. et al. On the duration of the microbial lag phase. **Current Genetics**, v. 65, n. 3, p. 721–727, 1 jun. 2019.

WILKINSON, S.; SMART, K. A.; COOK, D. J. A Comparison of Dilute Acid- and Alkali-Catalyzed Hydrothermal Pretreatments for Bioethanol Production from Brewers' Spent Grains. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-0327-02>, v. 72, n. 2, p. 143–153, 2018.

WU, Y. et al. *Saccharomyces cerevisiae* employs complex regulation strategies to tolerate low pH stress during ethanol production. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 1 dez. 2022.

YANG, P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* MET5DeltaSIZ1Delta enhancing organic acid tolerance with XYL1 and XYL2 integration for ethanol yield improvement in the presence of xylose and low pH value. **LWT**, v. 180, p. 114718, 15 abr. 2023.

YAZAWA, H. et al. Production of polyunsaturated fatty acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to alkaline pH tolerance. **Yeast**, v. 26, n. 3, p. 167–184, 1 mar. 2009.

YILDIRIM, O. et al. Optimization of oxalic and sulphuric acid pretreatment conditions to produce bio-hydrogen from olive tree biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 62, p. 26316–26325, 22 jul. 2022.

YOU, S. K. et al. Enhancing Fatty Acid Production of *Saccharomyces cerevisiae* as an Animal Feed Supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 50, p. 11029–11035, 20 dez. 2017.

ZEA, L. et al. Comparative study of the γ -butyrolactone and pantolactone contents in cells and musts during vinification by three *Saccharomyces cerevisiae* races. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 12, p. 1351–1356, dez. 1995.

ZEKO-PIVAČ, A. et al. The Potential of Brewer's Spent Grain in the Circular Bioeconomy: State of the Art and Future Perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 870744, 17 jun. 2022.

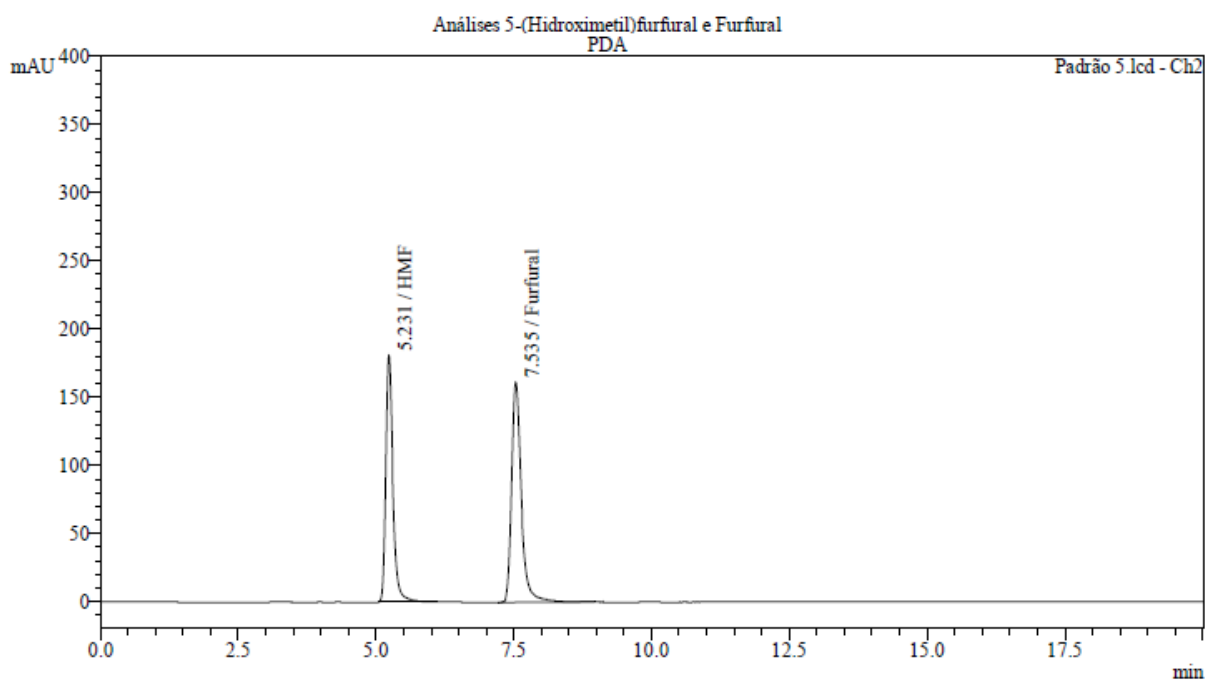
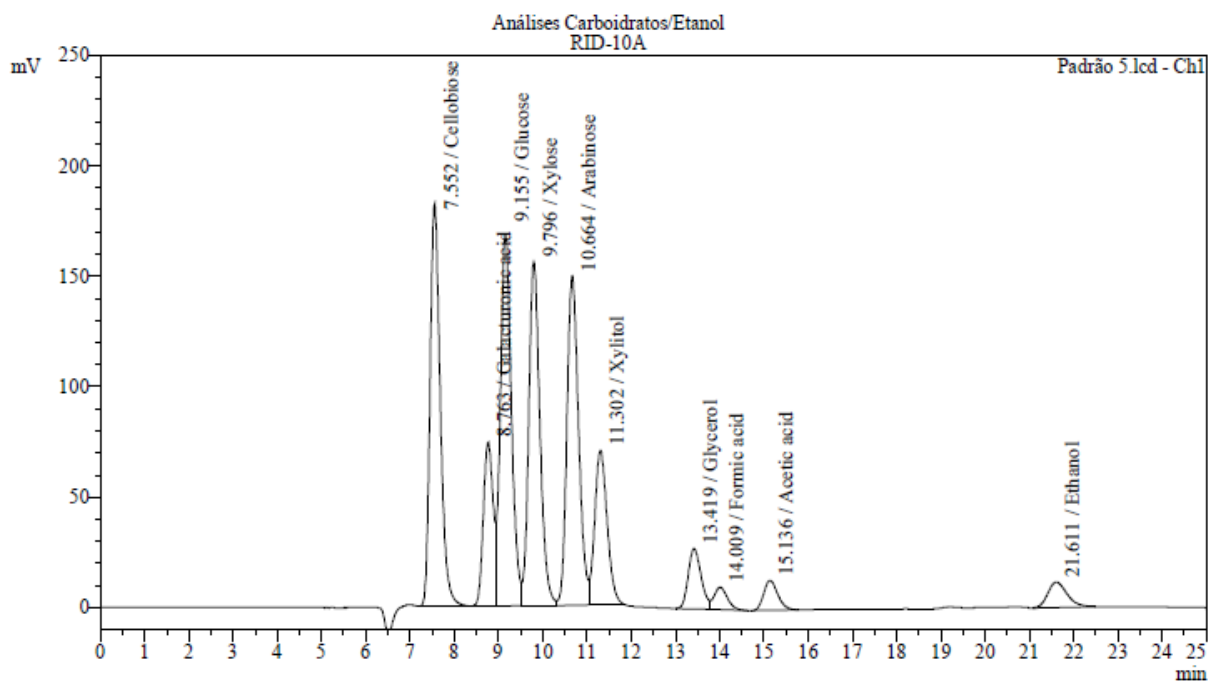
ZHANG, B. et al. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 10, p. 4105–4118, 1 out. 2021.

ZHANG, Q. H. et al. Biocatalytic kinetic resolution of D,L-pantolactone by using a novel recombinant D-lactonase. **RSC Advances**, v. 11, n. 2, p. 721–725, 24 dez. 2020.

ZHANG, T.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Sugar yields from dilute oxalic acid pretreatment of maple wood compared to those with other dilute acids and hot water. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 334–344, 30 jan. 2013.

ZHANG, X.; YANG, W.; BLASIAK, W. Modeling Study of Woody Biomass: Interactions of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin. **Energy and Fuels**, v. 25, n. 10, p. 4786–4795, 20 out. 2011.

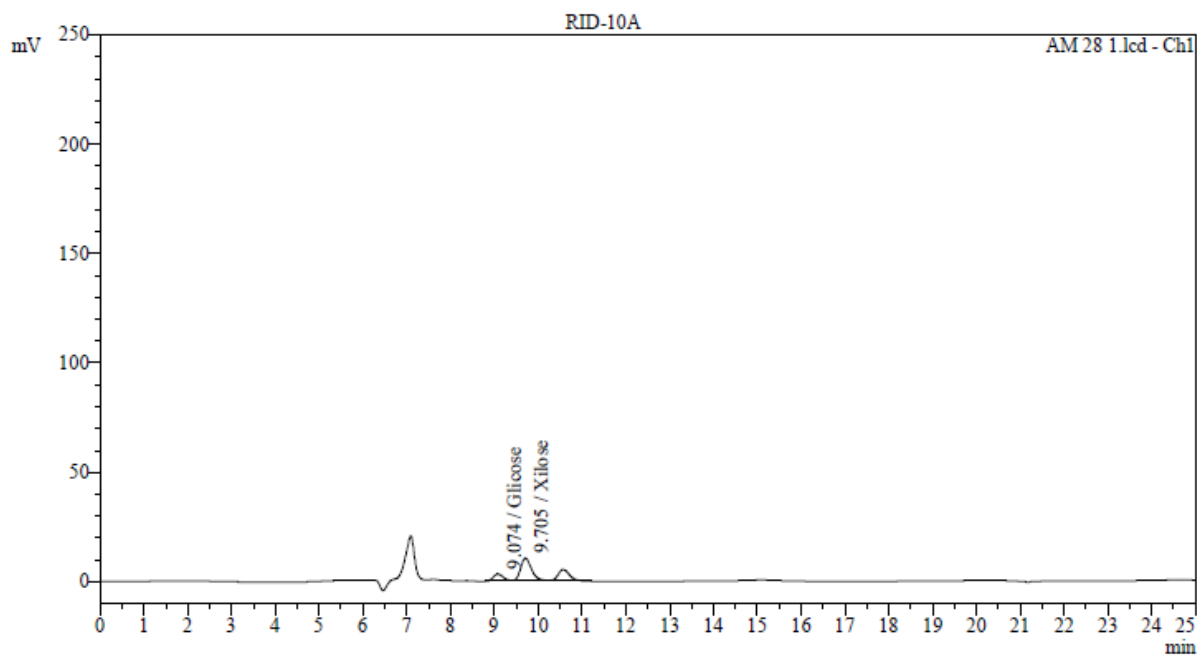
**APÊNDICE A – CROMATOGRAMA DAS CURVAS PADRÃO DE
CARBOIDRATOS, ETANOL, ÁCIDO ACÉTICO, HIDROXIMETILFURFURAL E
FURFURAL**



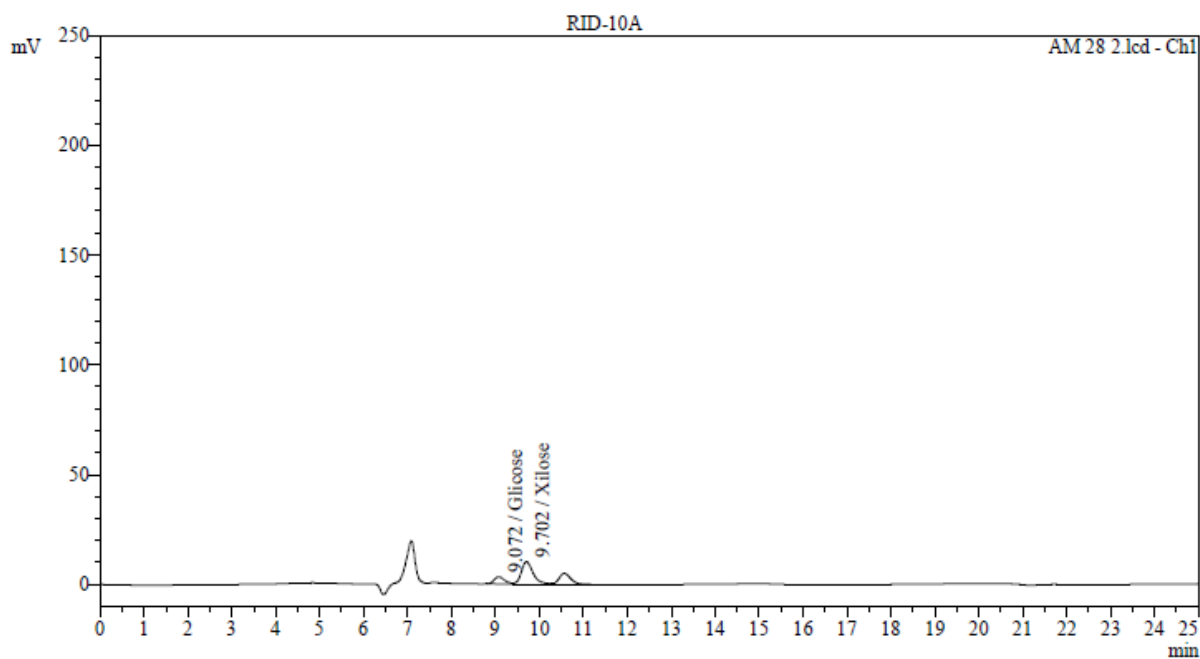
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES ÀS PORÇÕES LÍQUIDA E SÓLIDA DO ENSAIO DE PRÉ-TRATAMENTO PE8 (CLAE)

Porção líquida – carboidratos e etanol (triplicata)

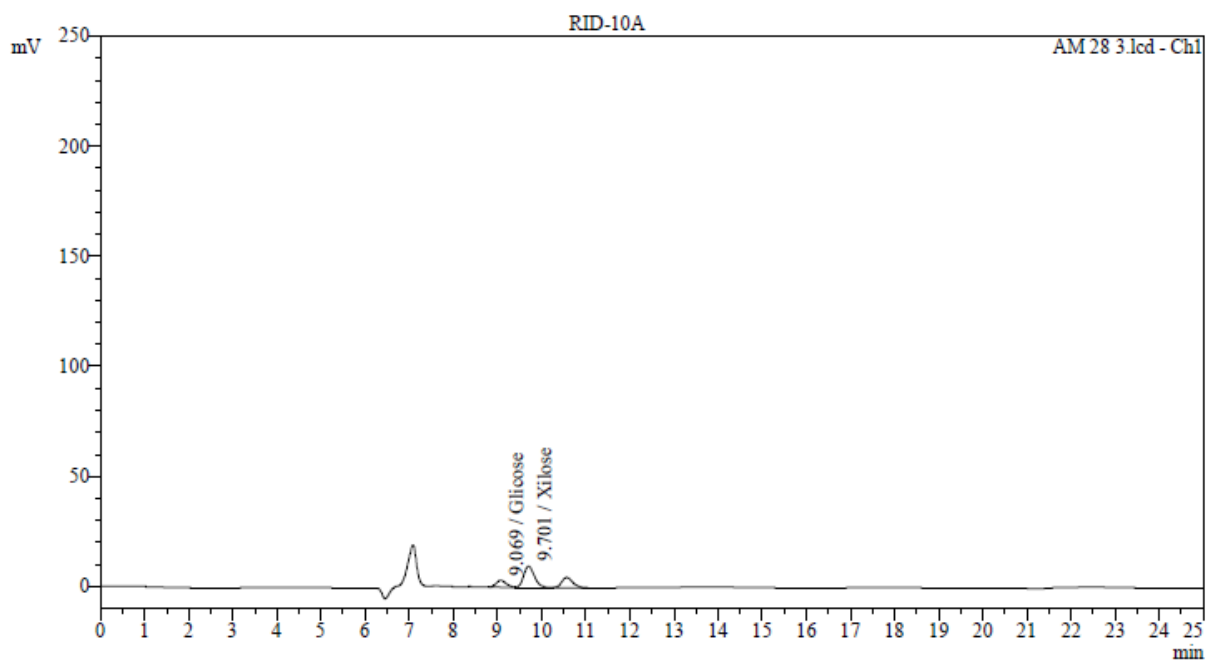
1.



2.

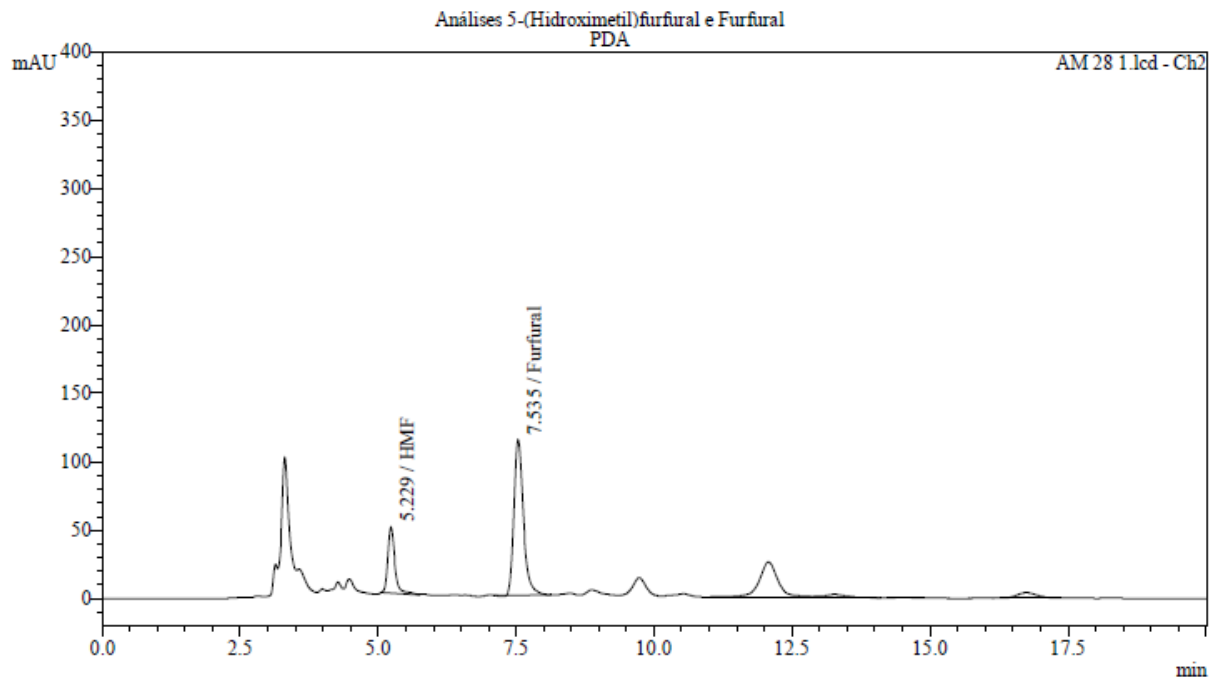


3.

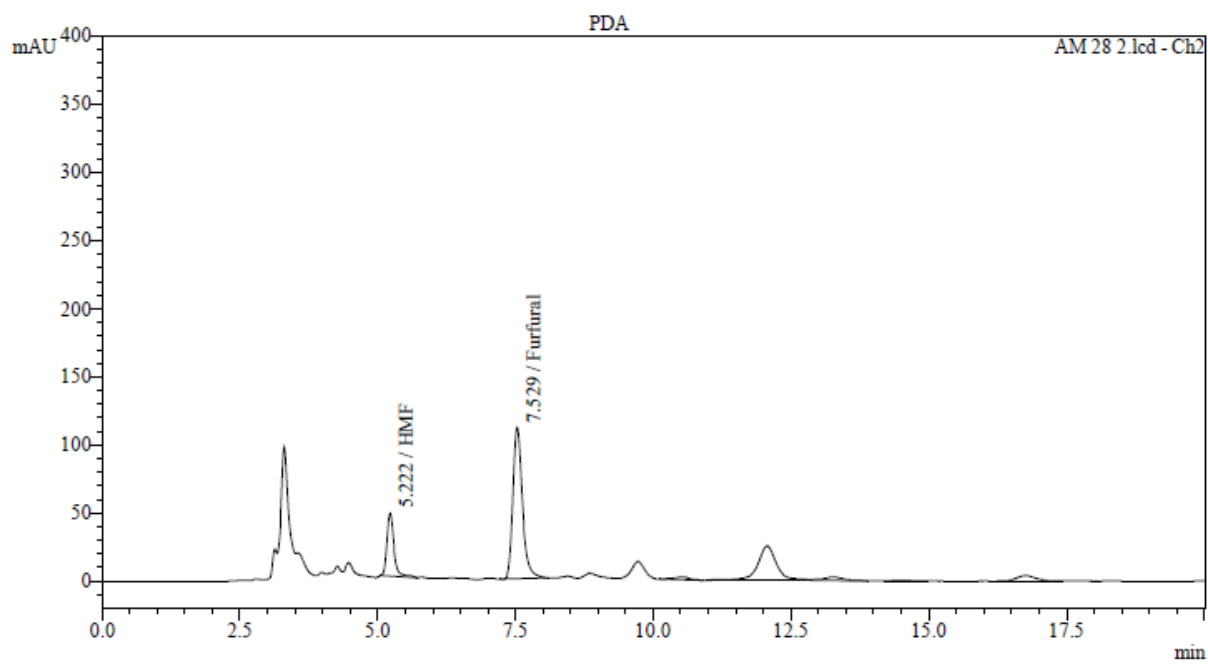


Porção líquida – Hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (triplicata)

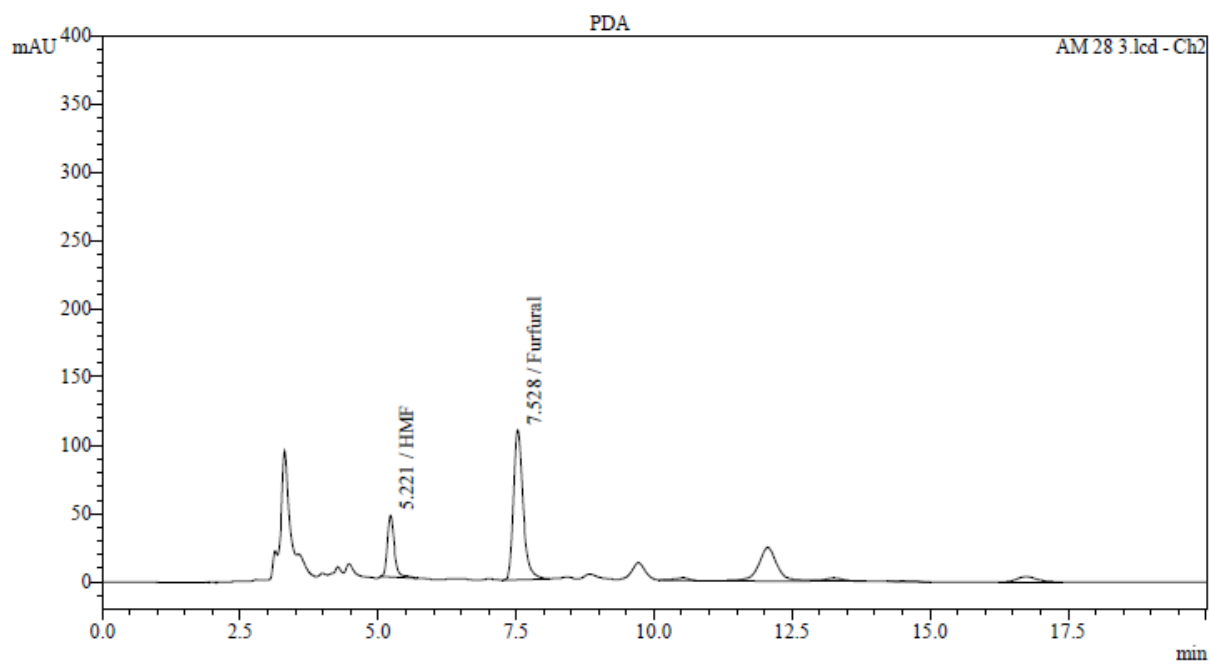
1.



2.

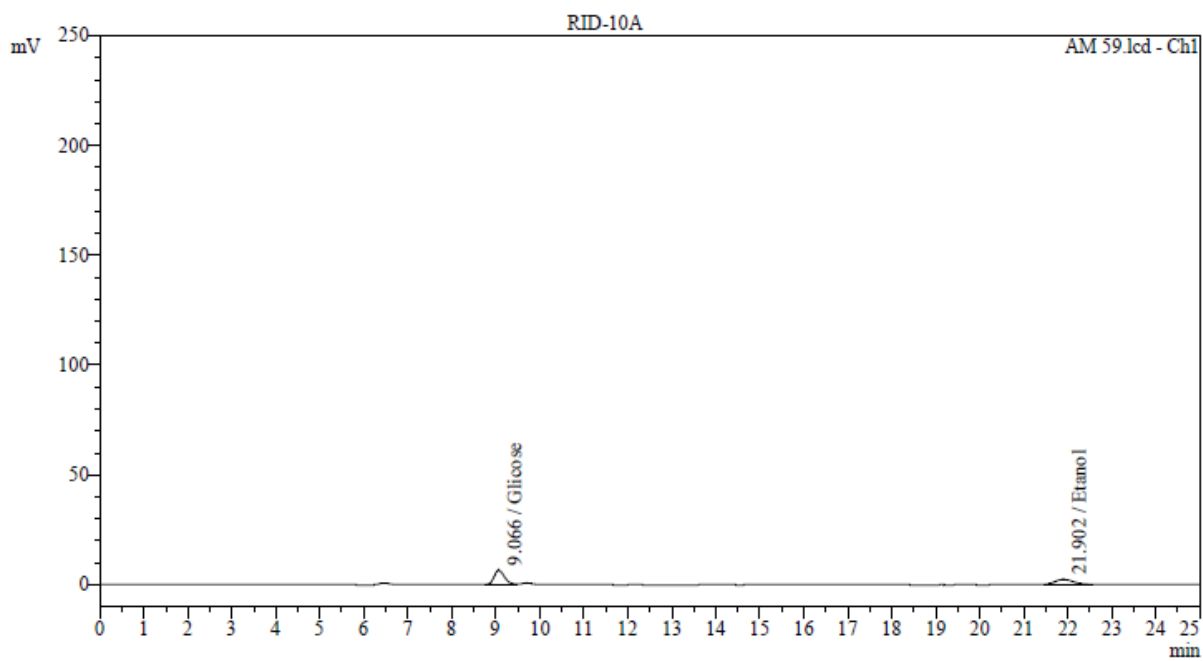


3.

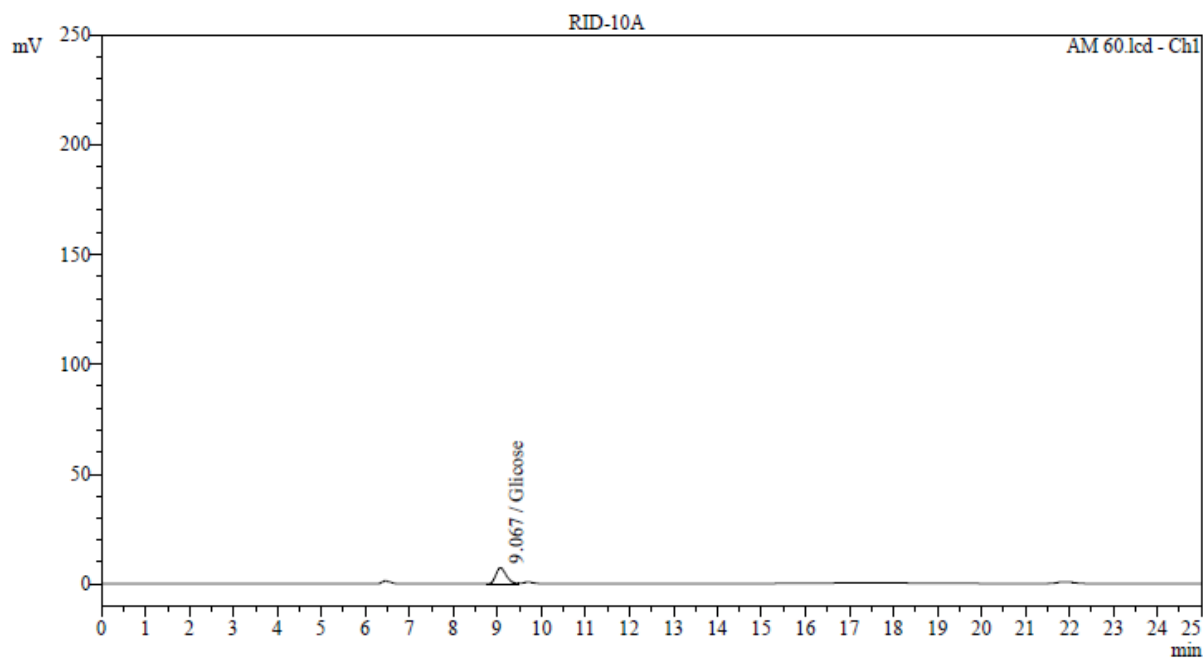


Porção sólida – carboidratos e etanol (quadruplicata)

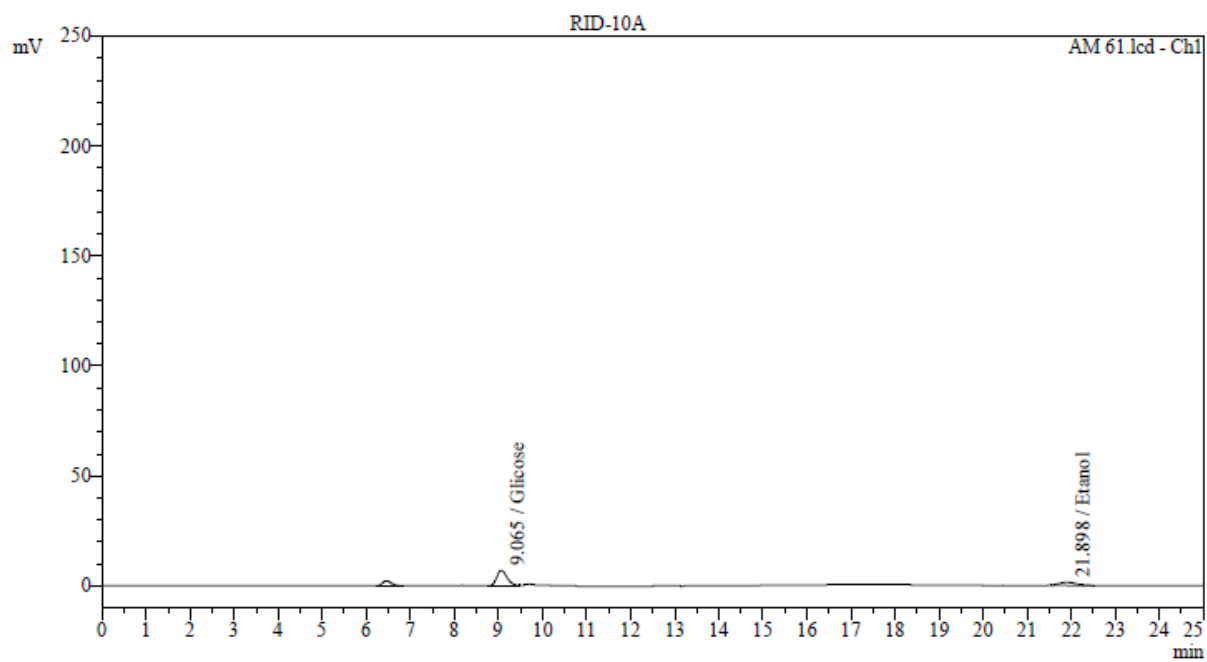
1.



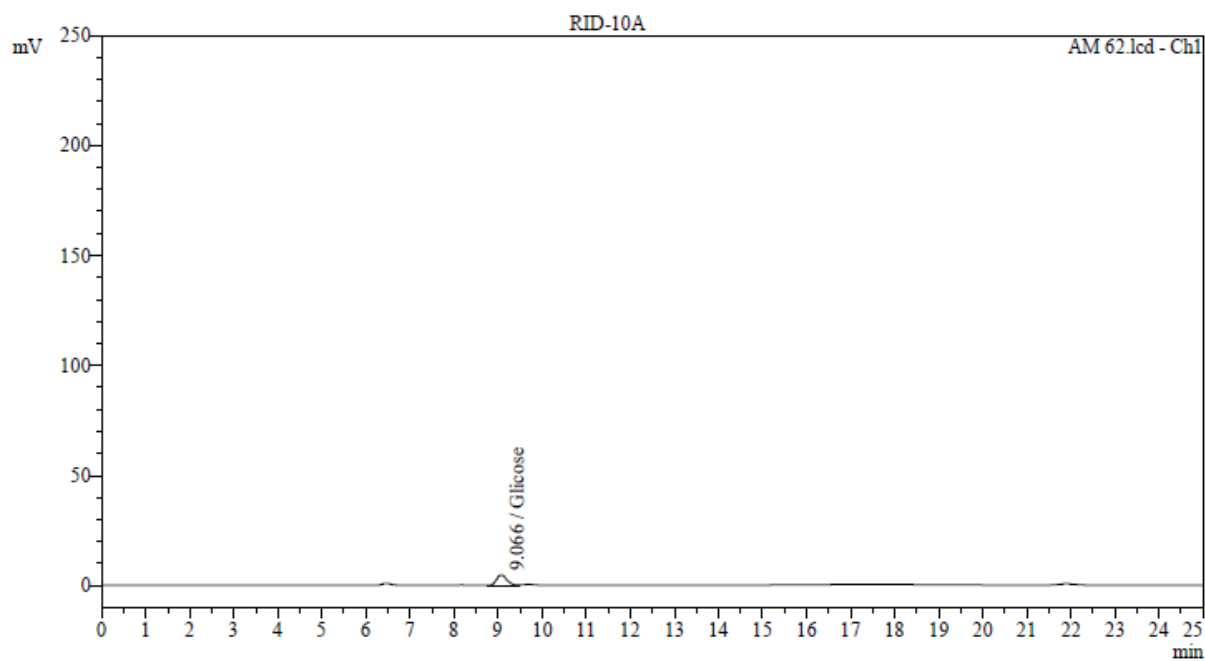
2.



3.

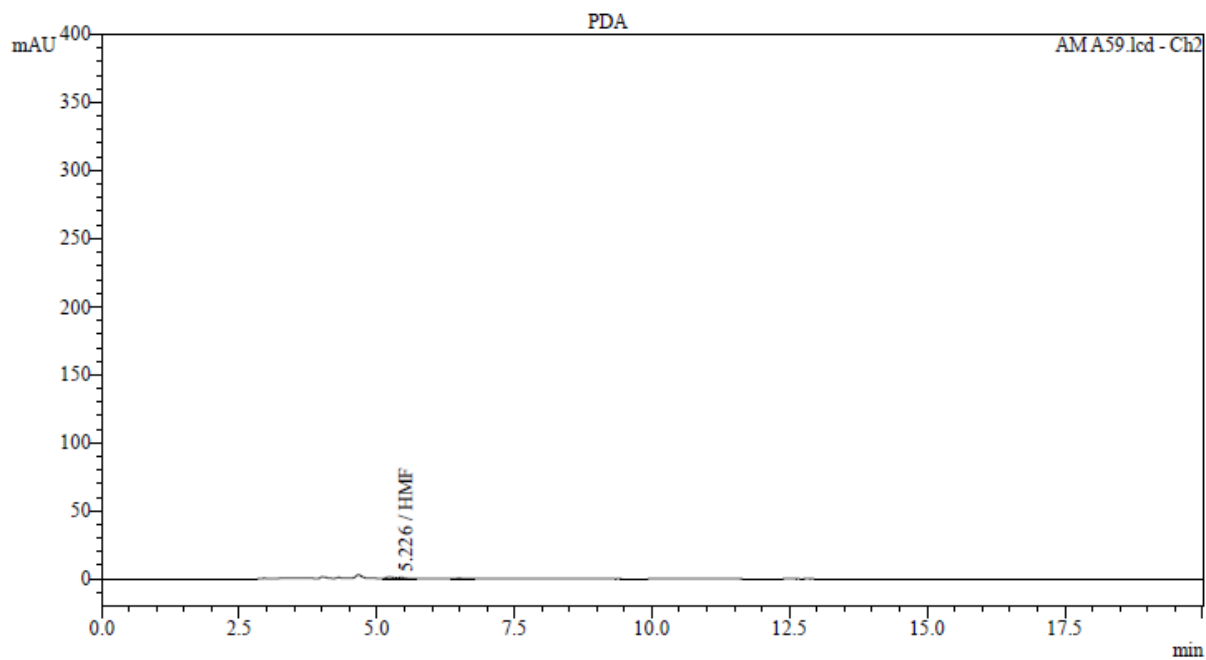


4.

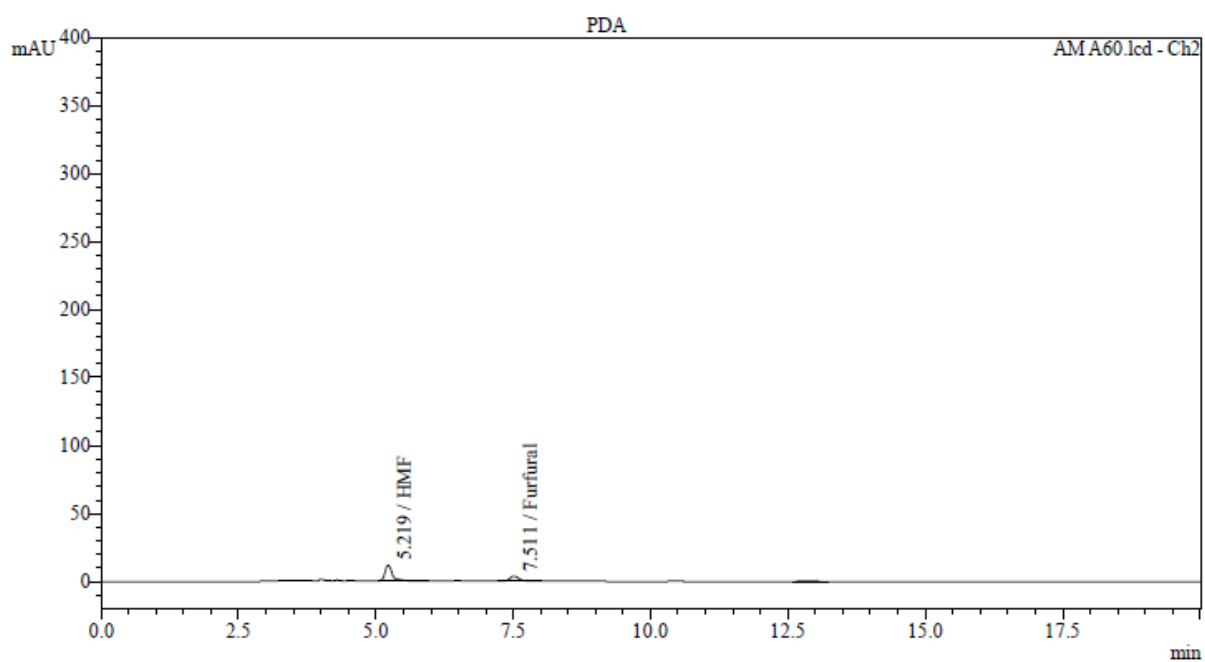


Porção sólida – Hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (quadruplicata)

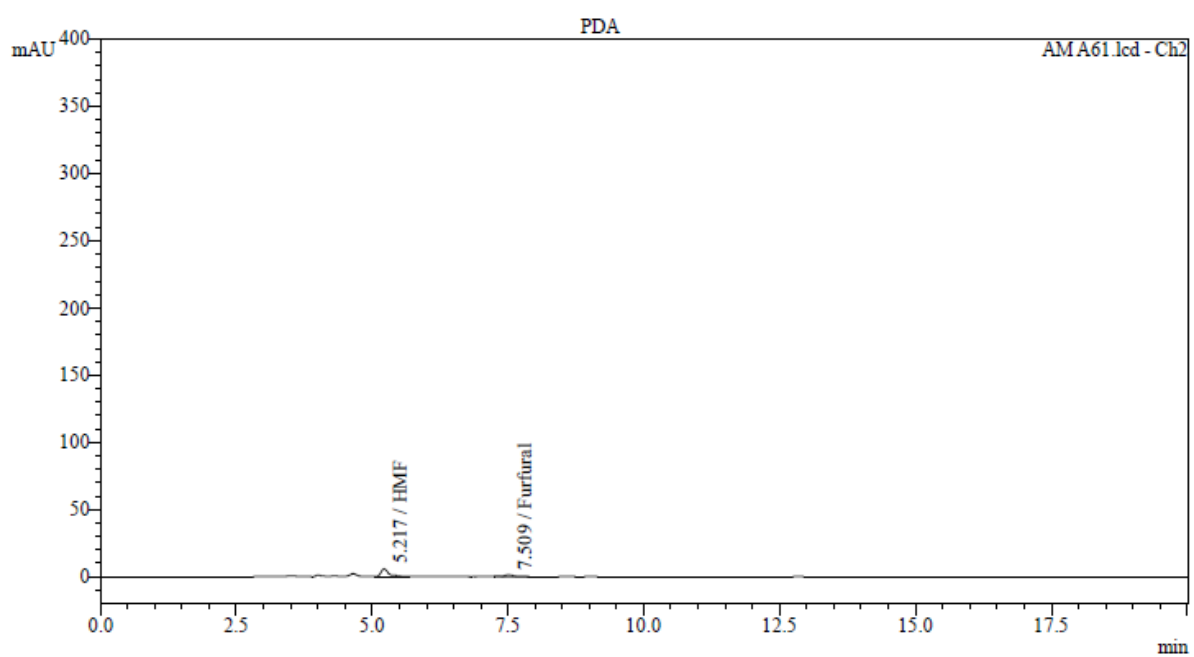
1.



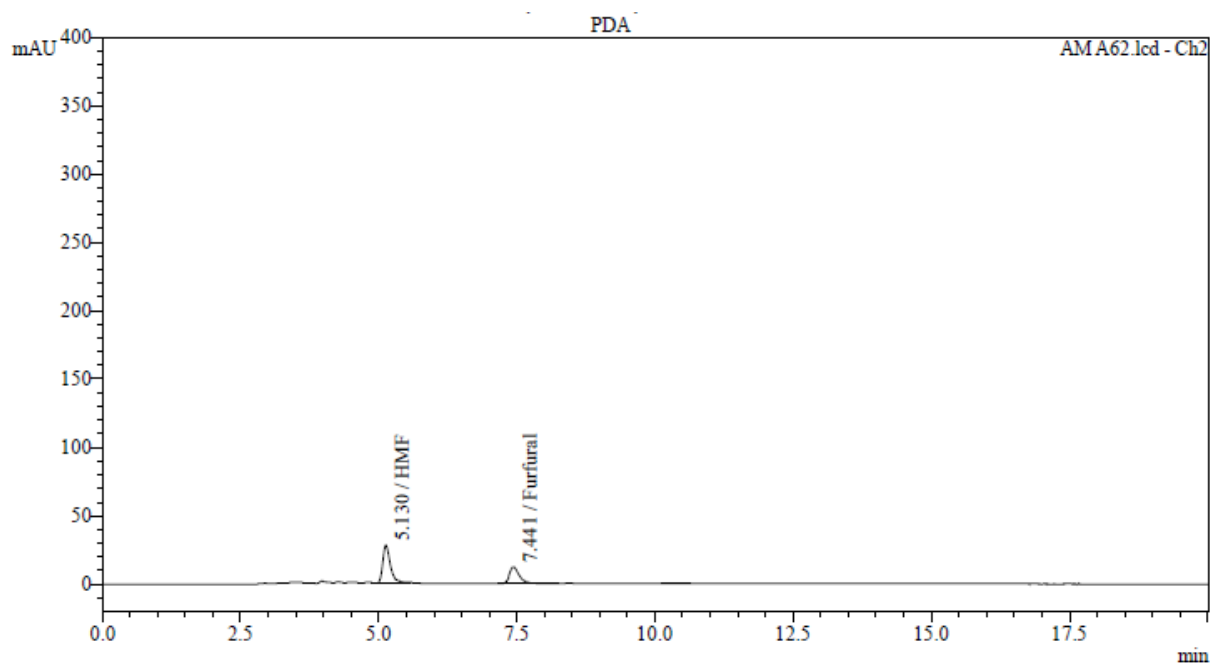
2.



3.



4.

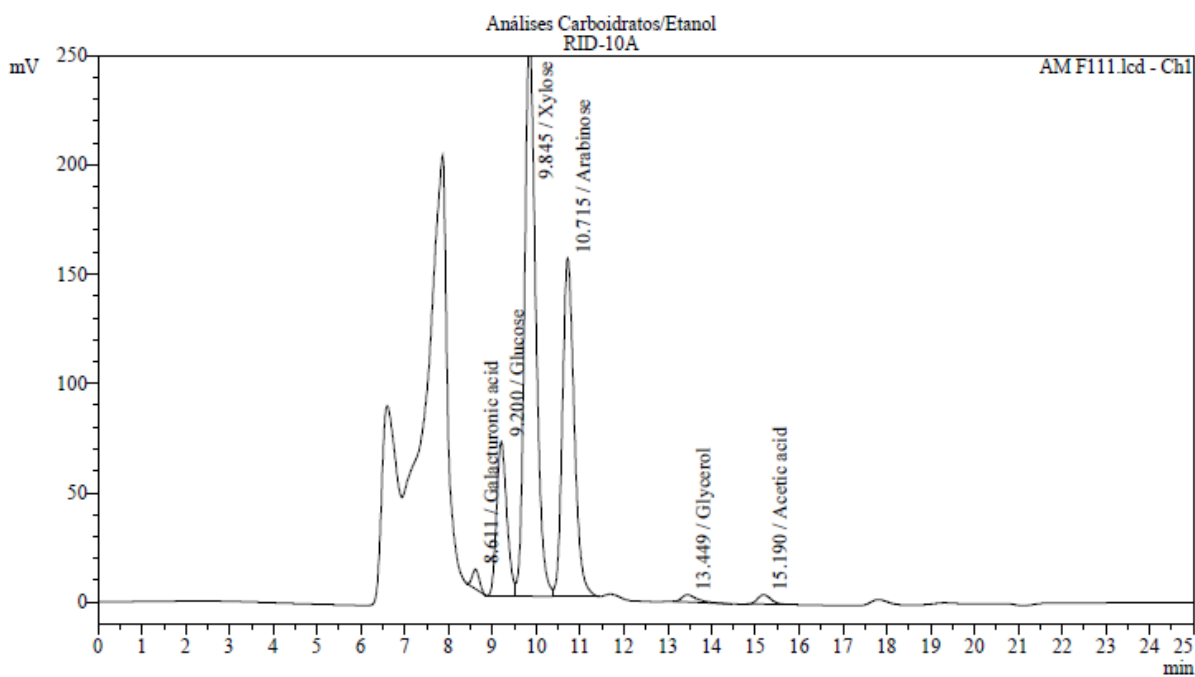


APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO ENSAIO DE FERMENTAÇÃO F12 (CLAE)

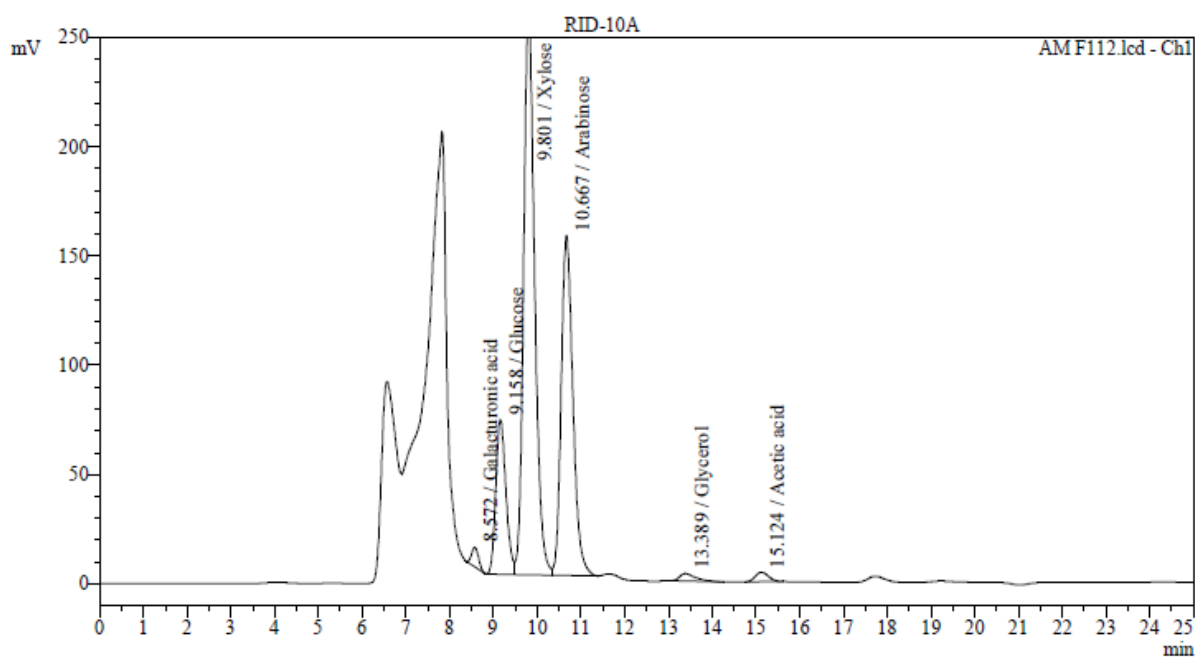
Carboidratos, xilitol e etanol (duplicata)

Tempo 0 h

1.

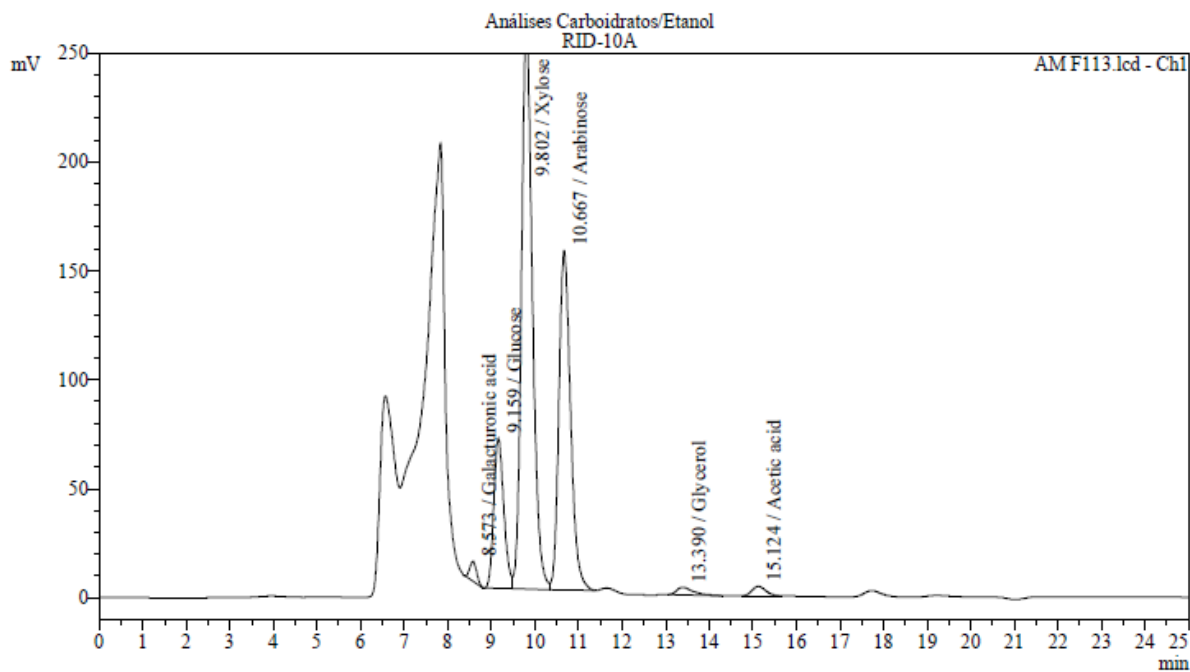


2.

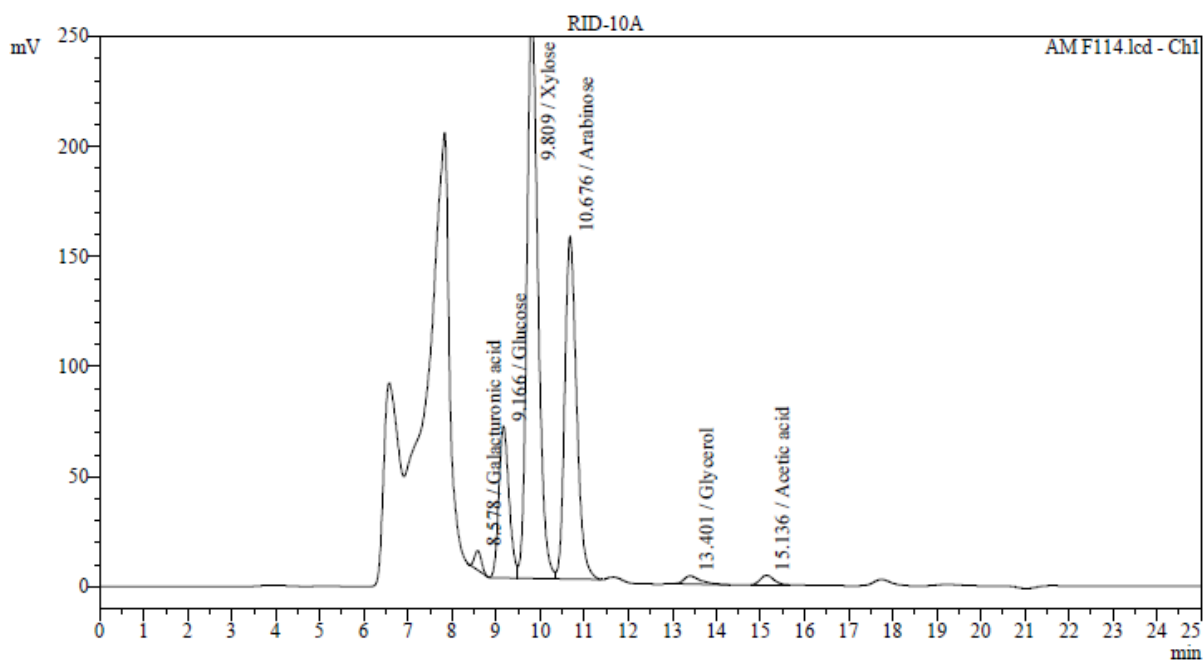


Tempo 12 h

1.

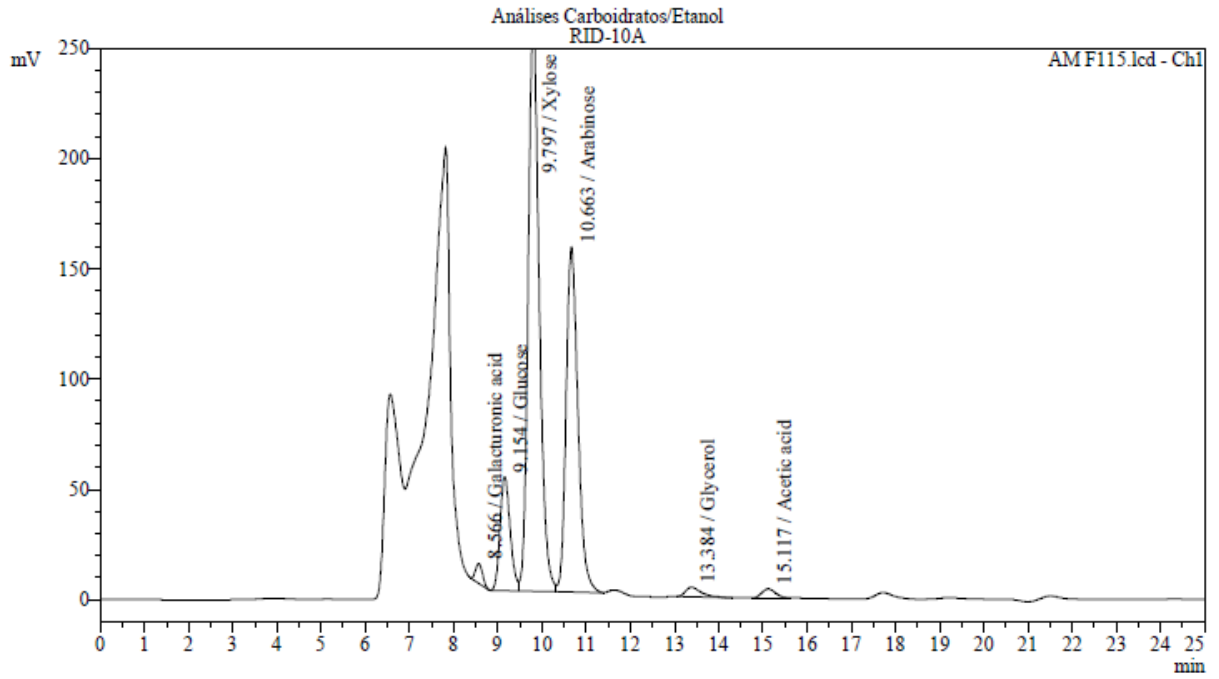


2.

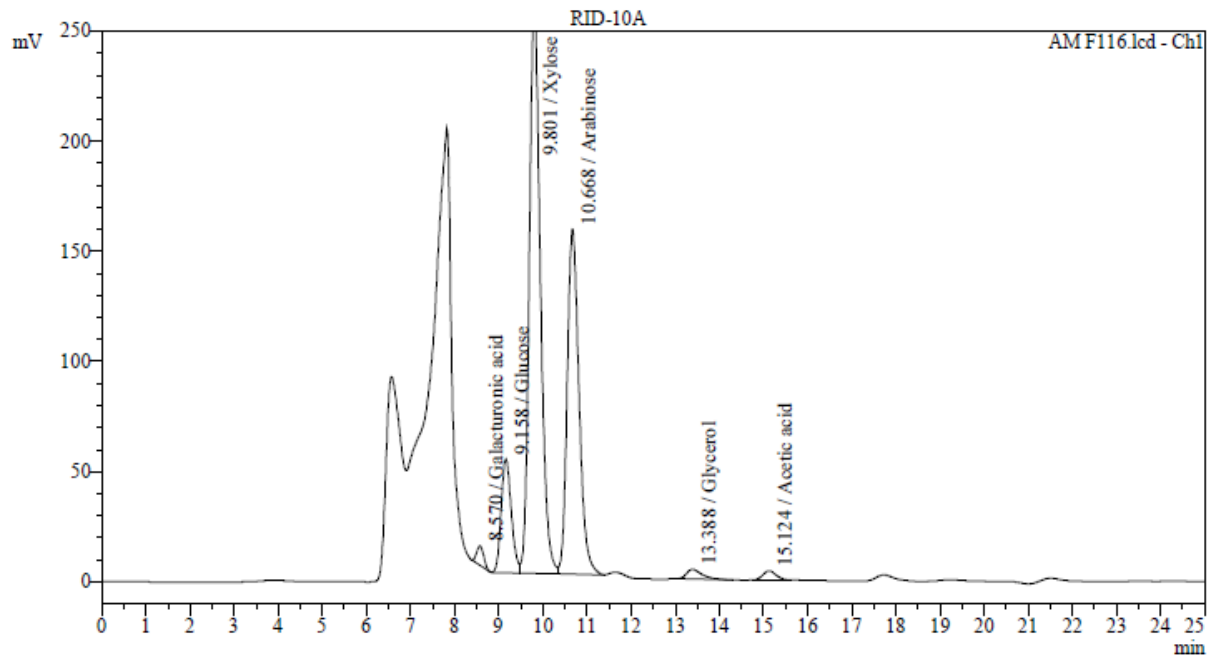


Tempo 24 h

1.

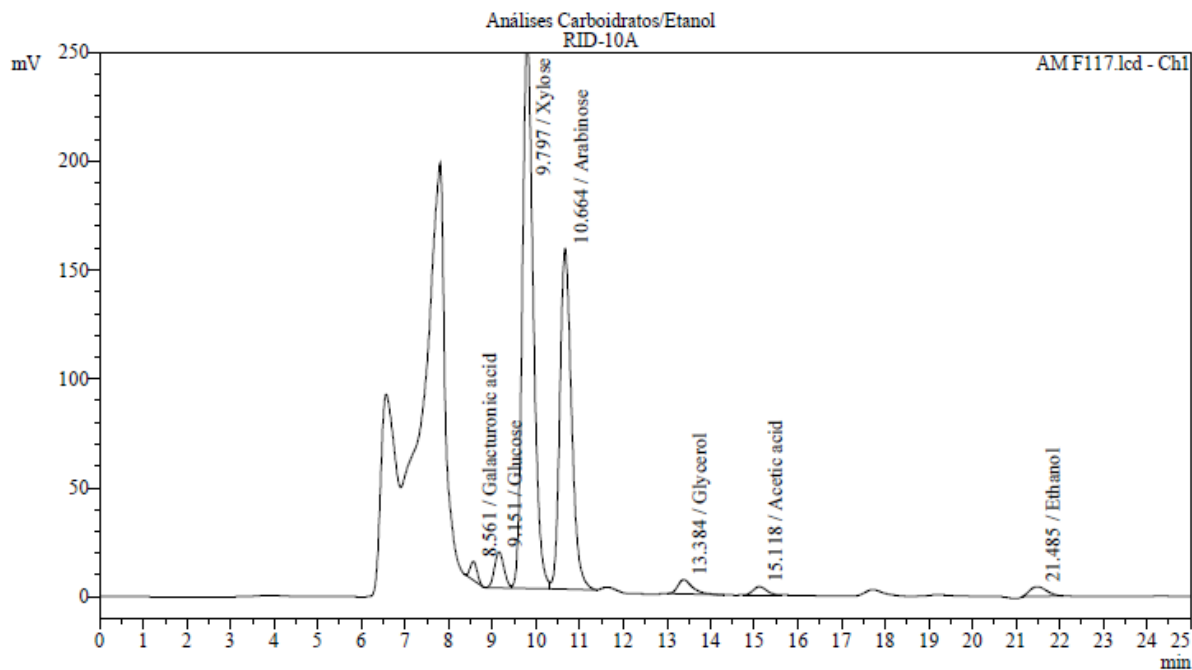


2.

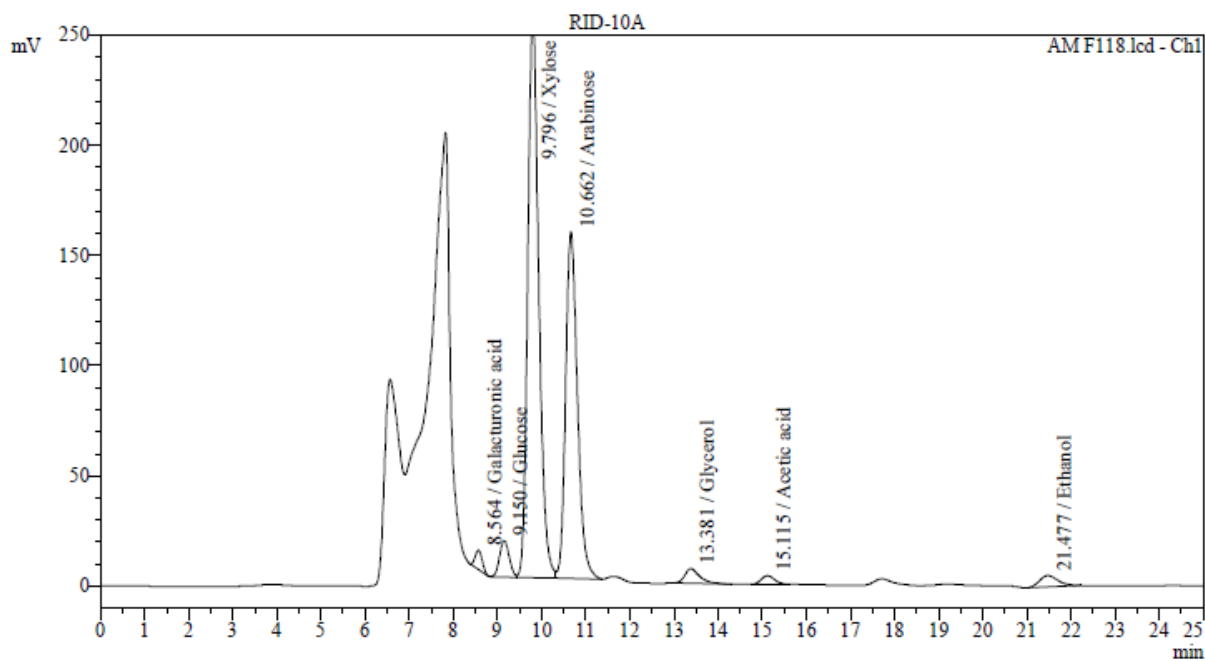


Tempo 36 h

1.

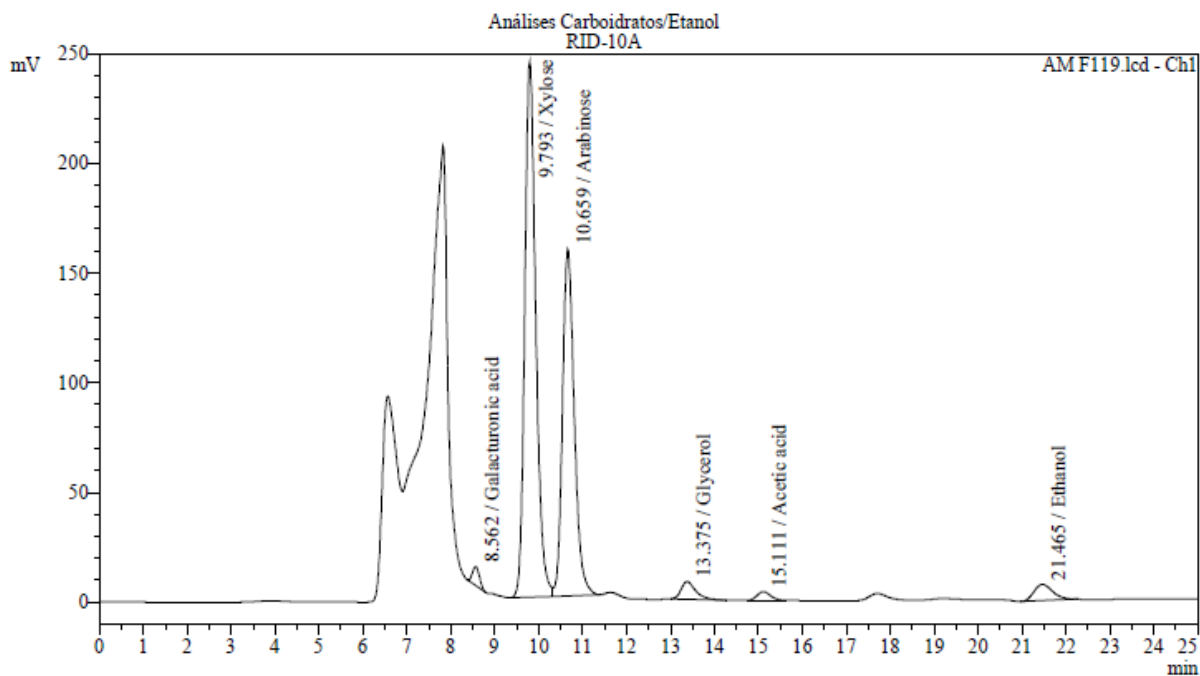


2.



Tempo 48 h

1.



2.

