

Mogućnosti primene pivskog tropa u biotehnologiji

Jelena D. Pejin¹, Miloš S. Radosavljević¹, Olgica S. Grujić¹, Ljiljana V. Mojović², Sunčica D. Kocić-Tanackov¹, Svetlana B. Nikolić², Aleksandra P. Djukić-Vuković²

¹Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

Izvod

Pivski trop čini najveći deo sporednih proizvoda proizvodnje piva. Na 100 L proizvedenog piva, dobija se oko 20 kg tropa. Trop nastaje u velikim količinama tokom cele godine, jeftin je ili besplatan i zbog visokog sadržaja proteina i ugljenih hidrata može se upotrebljavati kao sirovina u biotehnologiji. Hemijski sastav pivskog tropa varira od sorte ječma koja se koristi, zatim od vremena žetve, uslova sladovanja i ukomljavaanja i tipa i kvaliteta nesladovanih sirovina koje se koriste u proizvodnji piva. Pivski trop je lignocelulozni materijal, bogat proteinima i vlaknima koji čine 20%, odnosno 70% sastava pivskog tropa. Sve više prisutna svest o zaštiti okoline i smanjenju zagađenja dovodi do razvoja novih tehnologija za iskorišćenje sporednih proizvoda. Primena pivskog tropa je ograničena. Do sada se trop primenjivao kao stočna hrana. Moguće primene pivskog tropa su kao: dodatak proizvodima namenjenim za ljudsku ishranu, sirovina u biotehnologiji, sirovina za proizvodnju energije, uglja, papira, građevinskog materijala i adsorbens.

Ključne reči: pivski trop, biotehnologija, mlečna kiselina, enzimi, bioetanol.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Pivo je jedno od najčešće konzumiranih alkoholnih pića u svetu. Bogato je hranljivim sastojcima, ugljenim hidratima, aminokiselinama, mineralima, vitaminima i fenolnim jedinjenjima [1]. Pivo je osvežavajuće piće nastalo alkoholnom fermentacijom iz vodenog ekstrakta sladovanog ječma sa hmeljom. Proizvodnja piva je višestepeni proces, koji obuhvata biološku konverziju sirovina u finalni proizvod [2]. Na slici 1 data je šema proizvodnje piva.

Sirovine koje se koriste u proizvodnji piva su: ječam, voda, hmelj, nesladovane sirovine i pivski kvasac. Slad se proizvodi iz pivskog ječma. Proces sladovanja obuhvata: močenje zrna ječma, klijanje namočenih zrna i sušenja iskljalih zrna. Pivo se proizvodi fermentacijom sladovine. Komljenje je najznačajniji proces u proizvodnji sladovine, tokom kojeg se obavlja mešanje usitnjenog slada i vode (ukomljavaanje), nakon čega se sastojci slada ekstrahuju u rastvor, odnosno u sastojke ekstrakta. Komina koja se dobija na kraju procesa komljenja predstavlja mešavinu nerazgrađenih i rastvorenih sastojaka u vodi. Vodeni rastvor ekstrahovanih sastojaka je sladovina, a nerazgrađeni sastojci čine trop. U osnovi, trop čine plevica, klica i drugi sastojci zrna slada koji se ne rastvore prilikom komljenja. Za proizvodnju piva se koristi samo sladovina i zbog toga je potrebno da se trop odvoji što je moguće bolje. Postupak odvajanja tropa se zove ceđenje [3,4].

Prepiska: J.D. Pejin, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija.

E-pošta: jpejin@uns.ac.rs

Rad primljen: 10. april, 2012

Rad prihvaćen: 11. jun, 2012

PREGLEDNI RAD

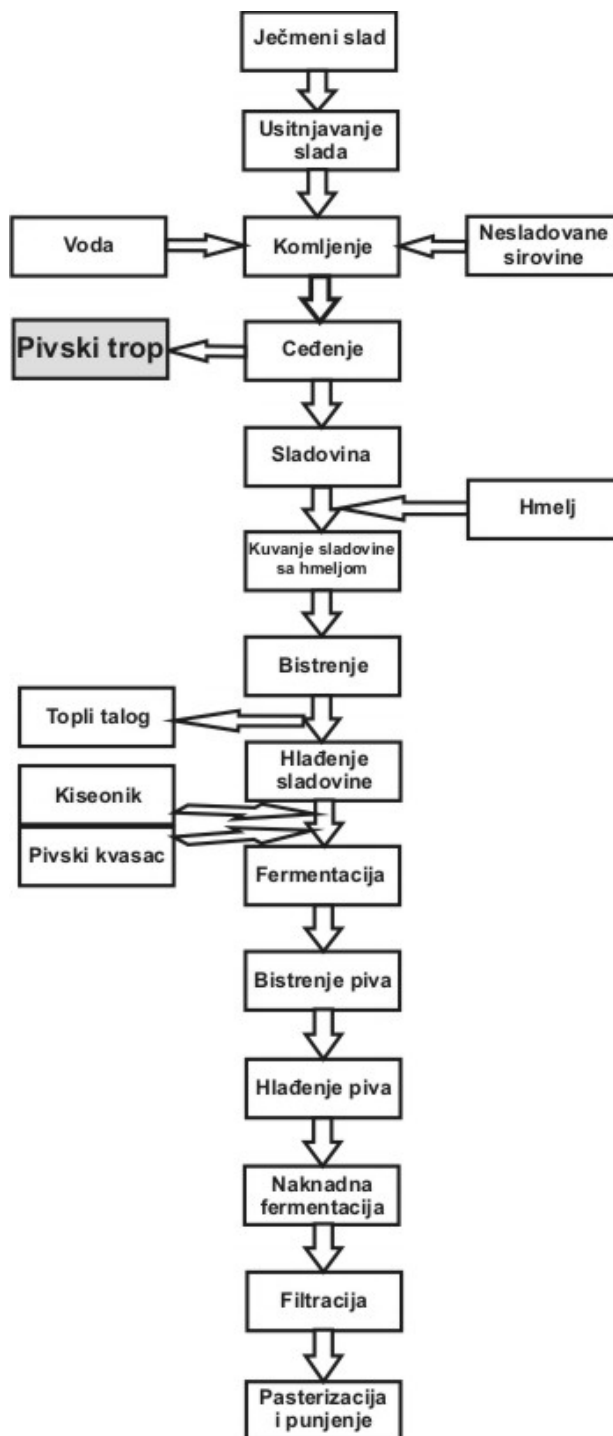
UDK 663.4:60:663.44

Hem. Ind. 67 (2) 277–291 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120410065P

U toku proizvodnje piva nastaje značajna količina različitih sporednih proizvoda. U zavisnosti od količine najzastupljeniji sporedni proizvodi su: pivski trop i pivski kvasac. Sve više prisutna svest o zaštiti okoline i smanjenju zagađenja dovodi do razvoja novih tehnologija za iskorišćenje sporednih proizvoda. Pivski trop se može primeniti kao: stočna hrana [5–8], dodatak proizvodima namenjenim za ljudsku ishranu [9,10], sirovina u biotehnologiji, sirovina za proizvodnju građevinskog materijala [11], proizvodnju uglja [12], papira [13], energije [14–17] i adsorbens [18–22]. Na slici 2 dat je pregled primene tropa u biotehnologiji, što je detaljnije opisano u ovom radu.

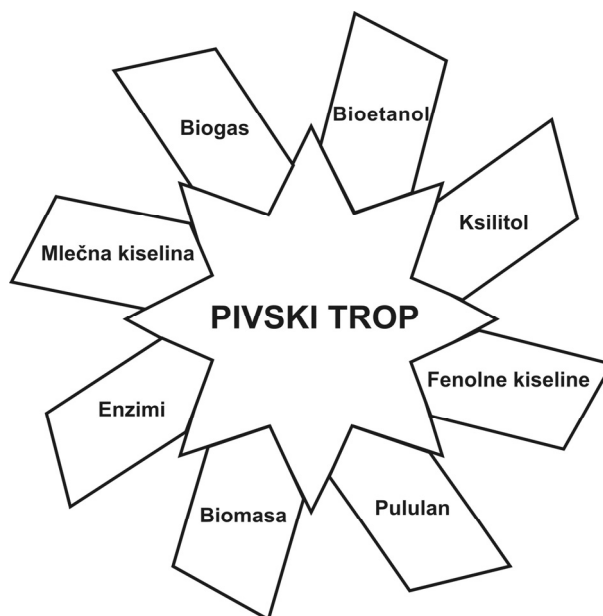
Od 100 kg slada utrošenog za proizvodnju sladovine dobija se 100 do 130 kg tropa sadržaja vlage 70–80%. Pivski trop čini najveći deo sporednih proizvoda proizvodnje piva; približno 85% od ukupnih sporednih proizvoda. Na 100 L proizvedenog piva, dobija se oko 20 kg tropa [4,23,24]. Nutritivna vrednost tropa iznosi 20% nutritivne vrednosti jednake količine ječma [4]. Trop nastaje u velikim količinama tokom cele godine, jeftin je ili besplatan i njegov visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata čini ga isplativim za upotrebu u biotehnologiji. U zavisnosti od tipa piva koji se proizvodi, pivski trop u svom sastavu može sadržati ostatke ječmenog slada ili nesladovanih sirovina, tzv. surogata. Hemijski sastav pivskog tropa varira od sorte ječma koja se koristi, zatim od vremena žetve, uslova ukomljavaanja i tipa i kvaliteta surogata koji se koriste u proizvodnji sladovine. Pivski trop je lignocelulozni materijal, bogat proteinima i vlaknima koji čine 20%, odnosno 70% sastava pivskog tropa [24,25].



Slika 1. Šema proizvodnje piva.
Figure 1. Beer production scheme.

Istraživanja Agencije za zaštitu okoline pokazuju da pivare u Velikoj Britaniji proizvode godišnje više od pola miliona tona tropa, dok u celoj Evropi količina tropa iznosi negde oko 3,5 miliona tona [26]. Sjedinjene Američke Države su najveći proizvođač piva u svetu sa 23 milijarde litara godišnje, za njima slede Kina (18 milijardi), Nemačka (10,5 milijardi) i Brazil (8,5 milijardi) [24]. U Srbiji se godišnje proizvede oko 500 miliona

piva. Prema Republičkom zavodu za statistiku, proizvodnja piva za 2010. godinu iznosila je 5.289.263 hL [27]. Na osnovu toga se može zaključiti da se u Srbiji godišnje proizvede oko 100000 tona pivskog tropa. Količina pivskog tropa u Srbiji obavezuje istraživače da ispitaju mogućnosti primene tropa za dobijanje drugih vrednih proizvoda.



Slika 2. Moguće primene pivskog tropa u biotehnologiji.
Figure 2. Possible applications of brewer's spent grain in biotechnology.

PROIZVODNJA TROPA I NJEGOV SASTAV

Zrno ječma se sastoji iz: klice (embrio), endosperma (aleuronski sloj i skrob) i opni zrna. Opne zrna se sastoje od sedam različitih slojeva od kojih su tri najznačajnija: unutrašnja opna (semenjača) – smeštena neposredno iznad aleuronskog sloja i deluje kao polupropustljiva membrana; oplodnjača – obavija semenjaču i srasla je sa njom, a plevica obavija oplodnjaču. Plevica predstavlja spoljašnji zaštitni sloj zrna, i sastoji se od lignoceluloze i malih količina polifenolnih jedinjenja, proteina i smola [28].

U zavisnosti od tipa piva koje se proizvodi, trop može da sadrži ostatke klice, delimično razgrađene delove endosperma, u vodi nerastvorljive proteine i ostatke plevice, oplodnjače i semenjače [26]. Hemijski sastav tropa može varirati, u zavisnosti od sorte ječma, uslova sladovanja i komljenja i vrste i kvaliteta nesladovanih sirovina koje se koriste u proizvodnji piva.

Pregled sastava pivskog tropa dat je u tabeli 1. Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 1 može se zaključiti da sastav tropa može varirati, što zavisi od sorte ječma, vrste i kvaliteta nesladovanih sirovina i parametara proizvodnje slada i piva. Takođe sadržaj pojedinih ispitivanih komponenti zavisi od metode određivanja. Hemiceluloza, celuloza i skrob tropa čine najveći deo suve materije (oko 50–60%).

Glavne komponente vlakana tropa su hemiceluloza, lignin (trodimenzionalni polifenolni makromolekul) i celuloza (linearni homopolimer glukoze) [25]. Polisaharidi tropa se sastoje od arabinoksilana, celuloze, β -glukana i tragova skroba [29]. Celuloza je homopolisaharid velike molekulske mase sastavljen od velikog broja jedinica

celobioze (dve glukopiranoze povezane β -1,4 vezom) [30]. Hemiceluloza je linearni i razgranati heteropolisaharid sastavljen najčešće od pet različitih monosaharida L-arabinoze, D-galaktoze, D-manoze, D-glukoze i D-ksiloze, kao i drugih komponenti kao što su sirćetna, glukuronska i ferulna kiselina. Hemiceluloza tropa je sastavljena najvećim delom od ksiloze (70%) i arabinoze (30%) [31,32]. Lignin je složeni molekul sastavljen od jedinica fenilpropana povezanih u veliku trodimenzionalnu strukturu. Trifenilpropil alkoholi su monomerne jedinice lignina: *p*-kumaril alkohol, konferil alkohol i sinapil alkohol. Zbog svoje molekulske konfiguracije lignin je veoma otporan na hemijsku i enzimsku razgradnju. Trop sadrži proteine velike biološke vrednosti bogate glutaminom [25]. Proteini tropa su poreklom iz aleuronskog sloja ječma i čine ih: albumin, globulin, glutelin i hordein [33]. Najzastupljeniji monosaharidi u tropu su: ksiloza, glukoza i arabinoza [34,35].

U tabeli 2 dat je hemijski sastav ječma (sadržaja vlage 10%), slada (sadržaja vlage 5%), i osušenog, samlevenog i prosejanog pivskog tropa (sadržaja vlage 4%) dobijenog nakon izdvajanja sladovine. Sladovina je proizvedena iz slada čiji su rezultati dati u tabeli 2. Približno 65% proteina slada ostaje u tropu. U suvom tropu je utvrđen znatno viši sadržaj arabinoksilana, celuloze i lignina kao i masti nego u ječmu i sladu [33].

Minerali, vitamini i aminokiseline se takođe nalaze u pivskom tropu. U tropu se u visokim koncentracijama nalaze: kalcijum (103,8 mg/kg), magnezijum (687,5 mg/kg), silicijum (242 mg/kg) i fosfor (1977 mg/kg) dok se u nižim koncentracijama nalaze i drugi minerali: bakar, kobalt, gvožđe, mangan, kalijum, selen, natrijum i sumpor [35]. Od vitamina su zastupljeni (mg/kg): biotin

(0,1), holin (1800), folna kiselina (0,2), niacin (44), pantotenska kiselina (8,59), riboflavin (1,5), tiamin (0,7) i piridoksin (0,7). Aminokiseline tropa obuhvataju: leucin, prolin, alanin, serin, glicin, vanilin, fenilalanin, arginin, glutaminsku i asparaginsku kiselinu u višim koncentracijama, i tirozin, izoleucin, treonin i lizin u nižim koncentracijama. Cistein, histidin, metionin, hidroksi-prolin i triptofan takođe mogu biti prisutni u tropu [34]. Aminokiselinski sastav u pivskom tropu prikazan je u tabeli 3 [33]. U tropu je utvrđen najviši sadržaj glutamina i glutaminske kiseline i prolina dok je najniži sadržaj utvrđen za triptofan i cistein.

Tehnike čuvanja pivskog tropa

Zbog visoke koncentracije vlage i fermentabilnih šećera, pivski trop je veoma nestabilan materijal i pogodan je za razvoj mikroorganizama. Predloženo je nekoliko metoda, kako bi se produžila stabilnost i vreme čuvanja pivskog tropa. Dodatkom mlečne, sirćetne, mravlje i benzojeve kiseline i kalijum-sorbata može se efikasno sačuvati kvalitet i nutritivna vrednost pivskog tropa u trajanju od 3 meseca [39,40]. Drugi način čuvanja pivskog tropa je sušenje. Sušenjem se osim produženja stabilnosti smanjuje i zapremina tropa, čime se smanjenju troškovi transporta i skladištenja. Proces sušenja sastoji se iz: presovanja (do postizanja sadržaja

vlage ispod 65%) i sušenja (do postizanja sadržaja vlage nižeg od 10%) [25,35]. Santos i saradnici [25] ispitivali su tri postupka za čuvanje kvaliteta pivskog tropa: sušenje u statičnim sušnicama, sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) i zamrzavanje. Istraživanje je pokazalo da zamrzavanje nije zadovoljavajući postupak: zapremina tropa je velika i može doći do promena u sadržaju arabinoze. Sušenjem u statičnim sušnicama i liofilizacijom se smanjuje zapremina tropa pri čemu sastav ostaje nepromenjen. Liofilizacija je blaži način sušenja, ali je ekonomski neprihvatljiv, zbog čega se u praksi najviše koristi sušenje u statičnim sušnicama [25]. Sušenje pivskog tropa u statičnim sušarama mora se voditi na temperaturama ispod 60 °C, jer na višim temperaturama dolazi do formiranja neprijatnih mirisa [24]. Pri sušenju u statičnim sušarama postoji rizik od pregrevanja i karamelizacije ugljenih hidrata tropa zbog povišenja temperature. Alternativni postupak sušenja koji bi mogao da uštedi energiju je sušenje u tankom sloju pomoću pregrejane vodene pare [41]. Prednosti ovog postupka sušenja u poređenju sa tradicionalnim sušenjem toplim vazduhom su: manja potrošnja energije, manja emisija štetnih gasova, poboljšanje efikasnosti sušenja, eliminacija rizika od eksplozije i požara i zaštita vrednih isparljivih organskih jedinjenja. Sušenje pregrejanom vodenom parom ima mali uticaj na promene sastava pivskog tropa [41]. Takođe se za smanjenje

Tabela 1. Hemijski sastav pivskog tropa (% suve materije) prema različitim autorima
Table 1. Brewer's spent grain chemical composition (% of dry matter) according to various authors

Komponenta	Bogar i saradnici [36]	Mussatto i Roberto [31]	Serena i Knudsen [37]	Dehnavi [38]
Celuloza	15	16,8	14,7±2,2	15,1
Hemiceluloza	23	28,4	–	32,5
Lignin	22	27,8	12,6±0,6	13,4±1,9
Proteini	18	15,25	21,5±2,1	–
Mineralne materije	–	4,6	4,8±0,5	3,4±0,1
Ugljeni hidrati	–	–	52,5±4,0	–
Sirova vlakana	–	–	–	–
Masti	–	–	11,7±0,5	–
Skrob	12	–	6,0±1,4	12,5

Tabela 2. Hemijski sastav (% suve materije) ječma, slada i osušenog samlevenog pivskog tropa (prosejanog kroz sita sa otvorima 250 µm) [33]
Table 2. Chemical composition (% dry matter) of barley, malt, and dried and milled brewer's spent grain (passed through a 250 µm sieve) [33]

Komponenta	Ječam	Slad	Osušeni, samlevani i prosejani pivski trop (čestice manje od 250 µm)
Proteini	10,1	10,4	30,7
Arabinoksilan	6,5	7,0	22,5
Necelulozni polimeri glukoze	68,2	64,5	10,4
Ukupni skrob	55,2	46,5	1,0
(1→3;1→4)-β-glukan	4,2	0,1	0,3
Celuloza i lignin	10,9	13,6	24,0
Masti	2,1	2,5	8,8
Mineralne materije	2,2	2,0	3,6

sadržaja vlage koriste i membranske filter prese. Tokom ovog procesa se pivski trop meša s vodom i filtrira pri pritisku od 3 do 5 bar, nakon čega se ispira toplom vodom (65 °C), filtrira pomoći membranskog filtra i suši u vakuumu, radi snižavanja vlage na 20–30%. Ovakvo osušeni trop je čuvan na otvorenom 6 meseci, pri čemu nije primećena nikakva mikrobiološka aktivnost [42].

Tabela 3. Sastav aminokiselina pivskog tropa [33]
Table 3. Amino acid composition of brewer's spent grain [33]

Aminokiselina	Količina, mol%
Hidrofobne aminokiseline	
Glicin	7,4
Alanin	7,3
Valin	6,2
Leucin	8,0
Izoleucin	4,2
Prolin	11,4
Fenilalanin	4,6
Triptofan	0,7
Metionin	1,9
Hidrofilne aminokiseline	
Serin	5,2
Treonin	4,3
Cistein	1,1
Tirozin	2,3
Asparagin+asparaginska kiselina	7,2
Glutamin+glutaminska kiselina	18,5
Osnovne aminokiseline	
Lizin	3,8
Arginin	4,0
Histidin	1,9

POTENCIJALNE PRIMENE PIVSKOG TROPA U BIOTEHNOLOGIJI

Pivski trop kao sirovina za proizvodnju mlečne kiseline

Mlečna kiselina (2-hidroksipropionska kiselina) ima široku primenu u farmaceutskoj, hemijskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i kožarskoj industriji. Poslednjih godina se uočava intenzivan rast potražnje za mlečnom kiselinom, prvenstveno zbog razvoja biorazgradnih laktidnih polimera koji se koriste za kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci [43]. Procenjeno je da će godišnja potražnja za mlečnom kiselinom do kraja 2011. godine biti 200000 tona [44]. Najveći proizvođači mlečne kiseline i polilaktidnih polimera u svetu: Cargill Dow (SAD), Purac (Holandija), Galactic (Belgija), Musa-shino Chemical Laboratory Ltd. (Japan), uglavnom koriste mlečnu kiselinu dobijenu fermentacijom [45–47]. Industrijski se mlečna kiselina može proizvoditi hemijskim (10% svetske proizvodnje) ili fermentacionim (90% svetske proizvodnje) postupcima [48]. Hemijska sinteza se uglavnom

zasniva na hidrolizi laktonitrila korišćenjem jakih kiseline. Fermentacioni postupci se zasnivaju na biokonverziji rastvora šećera (glukoze, fruktoze, saharoze i laktoze) pomoću bakterija mlečne kiseline [49]. Velike kompanije koje proizvode i polimere na bazi mlečne kiseline koriste fermentacioni postupak jer selektivno nastaje L(+) ili D(–) izomer, dok hemijskom sintezom nastaje racemat [43,50]. Bakterije mlečne kiseline za svoj rast zahtevaju čitav niz jedinjenja, zbog svoje ograničene sposobnosti za sintezu vitamina B-kompleksa i aminokiselina. Homofermentativni sojevi bakterija mlečne kiseline daju maksimalne količine mlečne kiseline [51]. Takođe, kontrola pripreme supstrata i pH smanjuje nastajanje sporednih proizvoda i inhibitora čime se postiže povećanje produktivnosti bakterija mlečne kiseline. Jedan od najvećih problema u industrijskoj proizvodnji mlečne kiseline je cena sirovina. Upotreba glukoze, saharoze ili skroba kao izvora ugljenika nije ekonomski isplativa zbog njihove cene, a cena proizvedene mlečne kiseline je relativno niska [52]. Lignocelulozni i skrobni materijali, poljoprivredni sporedni proizvodi, predstavljaju alternativu zbog svoje niske cene, hemijskog sastava, obnovljivosti i ekološkog uticaja. Ove sirovine imaju složen i promenljiv hemijski sastav kao i čistoću. Bakterije mlečne kiseline u pogledu nutrijenata imaju visoke zahteve što je glavna prepreka za njihovu primenu u proizvodnim procesima [43]. Do sada su ostvareni dobri laboratorijski prinosi mlečne kiseline na tečnoj džibri žitarica [53–60].

Pivski trop je kao lignocelulozni materijal ispitivan u proizvodnji mlečne kiseline. Mussatto i saradnici [52] ispitivali su uticaj količine inokuluma na proizvodnju mlečne kiseline na pivskom tropu pomoću *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. Pivski trop je tretiran sa H₂SO₄ (1,25% m/v) u autoklavu na 120 °C u trajanju od 17 min radi razgradnje hemiceluloze. Nakon toga je čvrsti ostatak ispiran vodom dok pH vrednost vode za ispiranje nije bila neutralna. Čvrsti ostatak je osušena na 50 °C do sadržaja vlage do 50% nakon čega je pomešan sa 2% (m/v) NaOH u odnosu 1:20 (g:g – čvrsto:tečno) i termički tretiran u autoklavu na 120 °C u trajanju od 90 min radi rastvaranja lignina. Na ovaj način dobijena celulozna pulpa koja je ispirana destilovanom vodom do neutralne reakcije, osušena je na 50 °C do sadržaja vlage od 10%. Nakon toga celulozna pulpa je tretirana sa komercijalnim celulaznim kompleksom (Celluclast 1,5L; Novozymes, Denmark) 8% (m/v) na 45 °C pri brzini mešanja od 100 obrt/min u trajanju od 96 h zbog razgradnje celuloze do glukoze. Posle toga, čvrsti ostatak je odvojen centrifugiranjem, a tečna frakcija – hidrolizat je korišćen za proizvodnju mlečne kiseline. Vrednost pH hidrolizata pivskog tropa je podešena na 6 dodatkom NaOH i hidrolizat je sterilisan na 112 °C u trajanju od 15 min. Sadržaj glukoze u hidrolizatu pivskog tropa je podešen na 50 g/L i inokulacija hidrolizata je

izvršena s koncentracijom ćelija od: 0,5, 0,75 i 1,0 g/L. Fermentacija je vođena na 37 °C u trajanju od 48 h. Prinos mlečne kiseline rastao je sa povišenjem koncentracije inokuluma (sa 0,5 na 1,0 g/L), čime je postignuto povećanje prinosa mlečne kiseline od 20%, ali je takođe povećanje koncentracije inokuluma prepоловило prinos mlečne kiseline po jedinici ćelijske mase (g/g). Najviši prinos mlečne kiseline iznosio je 0,73g/g i ostvaren je kada je hidrolizat pivskog tropa inokulisan sa 1g ćelija/L. Sporedni proizvodi, uključujući etanol, sirćetnu i mravlju kiselinu nisu bili utvrđeni.

Mussatto i saradnici [49] u daljim istraživanjima ispitivali su proizvodnju mlečne kiseline iz: 1) hidrolizata pivskog tropa, 2) hidrolizata pivskog tropa s dodatkom ekstrakta kvasca, 3) hidrolizata pivskog tropa s dodatkom komponenata de Man, Rogosa i Sharpe (MRS) bujona osim izvora ugljenika i 4) MRS bujona u kojem je sadržaj glukoze bio približno isti kao i u hidrolizatu pivskog tropa (približno 50 g/L). Hidrolizati pivskog tropa su pripremljeni kako su opisali Mussatto i saradnici [52]. Frakcija celuloze dobijena hemijskim predtretmanom pivskog tropa je razgrađena komercijalnim preparatom celulaze pri čemu je dobijeni hidrolizat sadržao 50 g/L glukoze. Mlečna kiselina je proizvođena iz dobijenog hidrolizata pomoću *Lactobacillus delbrueckii*. Dodatak ekstrakta kvasca u koncentraciji od 5 g/L je povećao prinos mlečne kiseline za 18%. Kao kontrolni eksperiment izvođena je mlečno-kisela fermentacija MRS bujona, s istom početnom koncentracijom glukoze, kao u hidrolizatu pivskog tropa. Dodatkom komponenti MRS bujona (izuzev izvora ugljenika) u hidrolizat pivskog tropa ostvarena je najviša produktivnost mlečne kiseline od 0,79 g/Lh. U svim slučajevima, prinos mlečne kiseline je iznosio 0,7 g po gramu utrošene glukoze, ali se fermentacija zaustavila nakon 24 h usled pada pH vrednosti sa 6,0 na 4,2 što je prouzrokovalo velike količine zaostale glukoze: 38–41 g/L.

Takođe, ispitivan je uticaj korekcije pH vrednosti hidrolizata tropa i MRS bujona tokom fermentacije. Fermentacioni proces koji se odvijao pri kontrolisanoj pH vrednosti (6,0) dao je bolje rezultate u poređenju sa fermentacionim procesima u kojima nije korigovana pH vrednost. Najbolji rezultat, gde je prinos mlečne kiseline iznosio 35,54 g/L (pri čemu po gramu utrošene glukoze nastaje 0,99 g mlečne kiseline) postignut je fermentacijom hidrolizovanog tropa obogaćenog komponentama MRS bujona. Produktivnost mlečne kiseline na kraju fermentacije je iznosila 0,59 g/Lh, sa maksimumom od 0,82 g/Lh tokom prvih 12 časova [49]. Do proizvodnje mlečne kiseline je došlo i pri korišćenju hidrolizata bez dodataka, što ukazuje na činjenicu da su neki izvori nutrijenata prisutni u hidrolizatu pivskog tropa.

Ako je u podlogu dodato više nutrijenata, postignut je viši prinos mlečne kiseline. Usvajanje glukoze i prinos mlečne kiseline su bili bolji tokom fermentacije hidro-

lizata pivskog tropa s dodatkom komponenata MRS bujona, u odnosu na rezultate dobijene kada je izvođena fermentacija samo MRS bujona.

Ovo ukazuje na to da hidrolizat pivskog tropa poseduje neke, do sada neidentifikovane komponente u svom sastavu, koje deluju sinergistički sa komponentama MRS bujona, i podstiču proizvodnju mlečne kiseline. Drugo objašnjenje za visok prinos mlečne kiseline dobijene iz hidrolizata pivskog tropa u odnosu na MRS bujon, jeste potencijalni puferski kapacitet hidrolizata (koji direktno utiče na fermentaciju), budući da je hidrolizat dobijen enzimskom razgradnjom pivskog tropa uz dodatak Na-citratnog pufera (pH 4,8), koji nije bio prisutan u sastavu MRS bujona.

Pivski trop kao dodatak ili nosač za imobilizaciju kvasca u fermentaciji piva

Ekstrakt tropa dobijen pod visokim pritiskom, pokazao se kao dobar antipenušavac u fermentaciji piva. Dodatak ekstrakta pivskog tropa nije uticao negativno na karakteristike piva kao finalnog proizvoda [24].

Čestice pivskog tropa su nepravilnog oblika i nehomogenog hemijskog sastava, sadrže aktivne centre za vezivanje i imobilizaciju kvasca [24]. Pivski trop je ispitivan kao nosač za ćelije pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) u kontinualnoj fermentaciji piva [61]. Pivski trop je prethodno pripremljen na sledeći način: 100 g osušenog tropa pomešano je sa 1500 mL 0,35M rastvora HCl i zagrevano na 60 °C u trajanju od 2 časa s ciljem razgradnje skrobnog endosperma i klice ječmenog zrna koji su prisutni u tropu. Smeša je ohlađena i ispirana sa vodom i nakon toga osušena. Čvrsti ostatak (oko 30 g), koji se sastajao uglavnom od plevice ječmenog zrna, pomešan je sa 500 mL 0,5M rastvora NaOH i mešan pri brzini od 120 obrt/min na 30 °C u trajanju od 24 h. Preostali čvrsti ostatak ispiran je vodom do neutralne reakcije i osušen. Rezultati su pokazali da je pivski trop dobra alternativa za komercijalne nosače koji se koriste u kontinualnoj fermentaciji piva, zbog sledećih prednosti: velika mogućnost vezivanja ćelija kvasca za pivski trop (430 mg/g suve materije tropa u poređenju sa 100 mg/g suve materije za nemodifikovanu DEAE celulozu), jednostavna primena bez potrebe za hemijskom modifikacijom, regeneracija ispiranjem u rastvoru baze, nema negativnih uticaja na proces fermentacije, nije toksičan i za njegovu primenu nisu potrebne dodatne investicije [61]. Brányik i saradnici [62] istraživali su mogućnost vođenja kontinualne fermentacije piva pomoću imobilisanog pivskog kvasca na tropu koji je pripremljen na već opisan način [61]. Optimalni uslovi kontinualne fermentacije su bili vreme zadržavanja u fermentoru od 18–25 h (brzina razblaživanja 0,04–0,055/h). Pri ovim uslovima je postignuta visoka fermentabilnost ugljenih hidrata od 70–80% i sadržaj etanola oko 4,2% u mladom pivu. U daljim istraživanjima Brányik i saradnici [63] ispitivali su uticaj aeracije i tem-

perature glavne fermentacije piva sa imobilisanim ćelijama kvasca na pivskom tropu na produktivnost i senzorne osobine mladog piva. Imobilisane biomase pivskog kvasca bilo je 2–7 puta više od biomase slobodnih ćelija. Produktivnost ovog kontinualnog sistema je bila 5 puta viša u odnosu na diskontinualnu fermentaciju. Utvrđeno je da je pri ovim uslovima fermentacije optimalna količina rastvorenog kiseonika bila oko 2 mg/L dok je optimalna temperatura bila 13–16 °C. Brányik i saradnici [64] takođe su ispitivali moguće mehanizme vezivanja ćelija kvasca za čestice pivskog tropa: adhezija ćelija kvasca na pivski trop, međusobno vezivanje ćelija kvasca na tropu i adsorpcija ćelija (akumulacija) unutar prirodnih pora na površini tropa i dokazali da se ćelije putem adhezije vezuju za pivski trop kao i da se adsorbuju unutar pora tropa.

Pivski trop kao sirovina za proizvodnju bioetanola

Sirovine za proizvodnju bioetanola mogu se podeliti u tri grupe: 1) sirovine sa saharozom (melasa, šećerna repa, sirak šećerac i šećerna trska), 2) sirovine sa skrobom (pšenica, kukuruz, pirinač, tritikale, raž, krompir i ječam) i 3) lignocelulozna biomasa (drvo, slama i trave) [65]. Bioetanol se koristi kao gorivo za vozila i dobijanje toplotne energije, sirovina u farmaceutskoj i hemijskoj industriji i za proizvodnju alkoholnih pića. Bioetanol je gorivo koje se širom sveta koristi kao zamena za fosilna goriva. Upotrebom bioetanola može se značajno smanjiti potreba za naftom i emisija gasova staklene bašte odnosno zagađenje životne sredine. Danas se intenzivno istražuju tehnologije za proizvodnju bioetanola iz lignocelulozne biomase (poljoprivredni i šumski sporedni proizvodi) [66–70].

White i saradnici [71] ispitivali su proizvodnju bioetanola na pivskom tropu pomoću *Pichia stipitis* (metaboliše ksilozu) i *Kluyveromyces marxianus* (odlično metaboliše glukozu i ksilozu). Pivski trop je pre inokulacije hidrolizovan. Hidroliza pivskog tropa se sastojala iz: kiseline hidrolize pomoću H_2SO_4 , HCl ili HNO_3 na 121 °C u autoklavu u trajanju od 15 min. Nakon toga hidrolizovanom tropu su dodati enzimi (celulaza, β -glukozidaza, hemicelulaza i ksilanaza) pri pH 5–6 na temperaturi od 50 °C i brzini mešanja od 130 obrt/min. Enzimska hidroliza je izvođena u toku 18 h. Prinos bioetanola u fermentaciji izvođenoj sa *Pichia stipitis* je iznosio 8,3 g/L, a za *Kluyveromyces marxianus* 5,9 g/L hidrolizata pivskog tropa.

Xiros i saradnici [72] pomoću mezofilne plesni *Neurospora crassa* proizvodili su bioetanol iz pivskog tropa. Osušen pivski trop (na 65 °C u trajanju od 48 h) samleven je i pomešan sa NaOH u odnosu 1:8 (čvrsto:tečno) i termički tretiran u autoklavu na 121 °C u trajanju od 30 min radi rastvaranja lignina. Nakon toga je u pivski trop dodata 1 M H_2SO_4 . Fermentacija je izvođena submeržno na 30 °C i pH 5 uz mikroaerobne uslove. Pri ovim uslovima je ostvaren prinos bioetanola od 74 g/kg suve

materije tropa. U daljim istraživanjima Xiros i saradnici [73] pomoću mezofilne plesni *Fusarium oxysporum* proizvodili su bioetanol na alkalno hidrolizovanom pivskom tropu na 30 °C uz mikroaerobne uslove i ostvarili prinos bioetanola od 65g/kg suve materije tropa.

Pivski trop kao podloga za kultivaciju mikroorganizama, gljiva i proizvodnju enzima

Visok sadržaj vlage i hemijski sastav pivskog tropa čine ga idealnim za rast mikroorganizama. Novik i saradnici [74] ispitivali su mogućnost primene frakcija (proteinskih i ugljeno hidratnih) pivskog tropa kao podloge za rast probiotskih bakterija. Frakcije pivskog tropa su pomešane sa vodom i termički tretirane na 121 °C u trajanju od 15 min nakon čega je smeša ohlađena i filtrirana. pH vrednost filtrata je podešena na 7,2 pomoću 0,5 M rastvora NaOH. Na ovaj način je dobijena podloga za umnožavanje probiotskih bakterija. Ostvareni su visoki prinosi biomase, vijabilnost ćelija i proizvodnje organskih kiselina. Pored frakcija pivskog tropa podloge za rast su sadržale laktozu, askorbinsku kiselinu, kvasni ekstrakt i mineralne materije [74].

Pivski trop je takođe korišćen za kultivaciju sledećih rodova *Pleurotus*, *Agrocybe* i *Lentinus* [24]. Pivski trop poseduje biološku i nutritivnu vrednost, kao podloga za rast *Pleurotus ostreatus* [75]. Smatra se da podstiče rast ovih pečuraka, ne samo zbog visoke koncentracije proteina, već i zbog visoke koncentracije vlage i fizičkih osobina poput veličine čestica, specifične gustine, poroznosti i kapaciteta zadržavanja vode [76]. Wang i saradnici [76] ispitivali su rast *Pleurotus ostreatus* na pivskom tropu koji nije prethodno pripremljen. Ispitivan je uticaj vrste tropa (u zavisnosti od vrste slada i nesladovanih sirovina), dodataka (pšenične, kukuruzne i pirinčane mekinje) i sadržaja vlage tropa na prinos rasta ove pečurke. Zaključeno je da se trop može koristiti kao podloga za rast ovih pečurki. Prinos pečurki je bio viši kada su pivskom tropu dodate mekinje žitarica.

Szponar i saradnici [77] ispitivali su proteinsku frakciju pivskog tropa kao vrednu i ekonomičnu podlogu za kultivaciju i izolaciju aktinomiceta roda *Streptomyces*. Proteinska frakcija osušenog pivskog tropa je pripremljena na sledeći način: trop je pomešan sa destilovanom vodom i termički tretiran u autoklavu u trajanju od 30 min. Smeša je ohlađena i filtrirana, a pH vrednost dobijenog filtrata je podešena na 7,2 pomoću 0,5 M rastvora NaOH. Filtrat je termički tretiran u autoklavu u trajanju od 25 min i korišćen kao podloga za proizvodnju biološki aktivnih supstanci. Istraživanja su pokazala da je proteinska frakcija pivskog tropa odlična podloga za proizvodnju biološki aktivnih supstanci pomoću aktinomiceta izolovanih iz zemljišta.

Godinama se sporedni proizvodi poljoprivrede i prehrambene industrije, sličnog hemijskog sastava i strukture kao pivski trop, koriste kao podloga za proizvodnju komercijalnih enzima pomoću „solid-state“ fermenta-

cije (fermentacije u čvrstom stanju) [78,79]. Tokom poslednjih godina su započeta ispitivanja primene pivskog tropa u proizvodnji enzima. Hemijski sastav podloge i upotrebljeni soj mikroorganizma određuju tip enzima i njegovu aktivnost. Pivski trop (kao izvor ugljenika) pomešan sa vodom od namakanja kukuruza (kao izvor azota) je pogodna podloga za proizvodnju celulolitičkih enzima (karboskimetilcelulaza) pomoću mikroorganizma *Streptomyces malaysiensis* [80]. Kompleks celulolitičkih enzima može se proizvoditi pomoću *Trichoderma reesei* na pivskom tropu kao podlozi, bez prethodne pripreme [81].

Francis i saradnici [82,83] ispitivali su proizvodnju α -amilaze na pivskom tropu pomoću *Aspergillus oryzae* NRRL 6270. Maksimalna proizvedena količina α -amilaze (6870 jedinica/g suve materije supstrata) postignuta je vođenjem „solid-state“ fermentacije na 30 °C u trajanju od 96 h na pivskom tropu, koji je imao početni sadržaj vlage od 70% i inokulisan je suspenzijom spora koncentracije 1×10^7 spora/ml. Dodavanje mono-, di- i polisaharida u pivski trop izazvalo je inhibiciju sitneze enzima. Optimizacijom parametara „solid-state“ fermentacije (temperature inkubacije, početnog sadržaja vlage tropa i količine inokuluma) postignuto je 20% više prinosa enzima [83].

Pivski trop se kao supstrat pokazao bolji od netretiranog omotača kukuruznog zrna u proizvodnji α -amilaze pomoću „solid-state“ fermentacije uz proizvodni mikroorganizam *Aspergillus oryzae* [36]. Predloženo je da se celokupni supstrat nakon „solid-state“ fermentacije (sirovi enzimi nastali u „solid-state“ fermentaciji) može koristiti kao biokatalizator u stočnoj hrani ili za proizvodnju bioetanola iz skrobnih sirovina.

Hashemi i saradnici [84] ispitivali su dodatak pivskog tropa podlozi za submerznu fermentaciju u proizvodnji α -amilaze pomoću *Bacillus* sp. KR-8104. U istraživanjima su u podlogu koja je sadržala dekstrin, kvasni i mesni ekstrakt dodavali rastvorljivi ekstrakt pivskog tropa, nerastvorljivi ekstrakt pivskog tropa kao i kompletan pivski trop. Najviši prinos α -amilaze ostvaren je dodatkom kompletnog pivskog tropa (5 puta viši prinos α -amilaze u poređenju sa kontrolnom podlogom).

Xu i saradnici [85] ispitivali su uticaj dodatka nutrijenata u pivski trop za proizvodnju α -amilaze „solid-state“ fermentacijom pomoću *Aspergillus oryzae* As 3951 kao proizvodnog mikroorganizma. Ostvareno je povećanje prinosa α -amilaze od 17,5% uz dodatak 1,8% vode od namakanja kukuruza, 0,22% CaCl_2 i 0,2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nakon 96 h na 30 °C [85].

Adeniran i saradnici [86] primenom „solid-state“ fermentacije na pivskom tropu proizveli su α -amilazu i amiloglukozidazu pomoću izolata plesni iz pivskog tropa: *Helminthosporium oxysporium*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger*.

Panagiotu i saradnici [87] ispitivali su proizvodnju kompleksa enzima za razgradnju arabinoksilana (feruloil esteraze, ksilanaze i α -L-arabinofuranozidaze) na pivskom tropu pomoću plesni *Penicillium brasilianum* „solid-state“ fermentacijom. U radu je optimizovan početni sadržaj vlage i pH, temperatura i sadržaj izvora azota da bi se se postigla maksimalna proizvodnja feruloil esteraze, ksilanaze i α -L-arabinofuranozidaze. Optimalni uslovi za rast su bili: sadržaj vlage od 80%, pH 6, temperatura 26,5 °C i dodatak 5 g/L izvora azota. Maksimalna količina feruloil esteraze dobijena je nakon 196 h, dok su maksimalne količine ksilanaze i α -L-arabinofuranozidaze dobijene nakon 108 odnosno 96 časova.

Pivski trop je upotrebljen i kao izvor ugljenika za proizvodnju enzima feruloil esteraze i ksilanaze pomoću *Talaromyces stipitatus* i *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Maksimalna aktivnost ksilanaze je ostvarena nakon 8 dana kada je kao proizvodni mikroorganizam korišćen *Humicola grisea* var. *thermoidea* odnosno 9 dana kada je korišćen *Talaromyces stipitatus*. Primenom *Humicola grisea* var. *thermoidea* za proizvodnju feruloil esteraze maksimalna aktivnost ostvarena je nakon 8 dana fermentacije [88]. Sposobnost da proizvede ove enzime na pivskom tropu pokazao je i *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 [89].

Celulozna frakcija pivskog tropa je sa uspehom korišćena i za imobilizaciju *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 u kontinualnoj proizvodnji endopoligalakturonaze [90,91]. Pivski trop je korišćen kao nosač za ćelije *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 a trop je pripremljen pod uslovima koje su opisali Brányik i saradnici [61,62].

Pivski trop je korišćen kao izvor ugljenika za proizvodnju lignoceluloznih enzima (ksilanaza i endoglukanaze) pomoću *Fusarium oxysporum*. Ispitivane su različite koncentracije tropa (od 1 do 6% m/v) na aktivnost lignoceluloznih enzima. Rezultati submerzne fermentacije su pokazali da se najviša aktivnost ovih enzima dobija pri koncentraciji tropa od 4% m/v [92].

Pivski trop kao sirovina za proizvodnju ksilitola

Ksilitol je veštački zaslađivač koji se može proizvesti biotehnološkim putem. On ima ekonomsku prednost (zbog manjeg utroška energije) u odnosu na hemijski proces proizvodnje. Ksilitol ima višestruku primenu u prehrambenoj industriji. Proizvodnja ksilitola fermentacijom na jeftinim sporednim proizvodima prehrambene industrije i poljoprivrede doprinosi zaštiti životne sredine [31].

Duarte i saradnici [93] ispitivali su proizvodnju ksilitola na hidrolizatu pivskog tropa. Pivski trop je hidrolizovan u dva koraka: 1) autohidroliza (razgradnja hemieluloza do oligosaharida i 2) enzimaska hidroliza ili blaga kiselinska hidroliza sumpornom kiselinom (razgradnja oligosaharida do monosaharida). Pivski trop je pomešan sa vodom u odnosu 1:8 (m/m) i tretiran u autoklavu na 100 °C u trajanju od 1 h u cilju uklanjanja

skroba. Čvrsti deo je odvojen filtracijom, ispran vodom i sušen na 50 °C do sadržaja vlage ispod 10%. Autohidroliza je izvedena na 190 °C u trajanju od 2,5 min pri odnosu pivskog tropa i vode od 1:8 (m/m). Nakon hlađenja tečnost koja je sadržala oligosaharide je odvojena filtracijom i hidrolizovana je enzimski ili kiselinom. Za enzimsku hidrolizu podešena je pH vrednost tečnosti sa oligosaharidima na 5,5 i centrifugirana je na 6000g u trajanju od 20 min. Nakon toga je sterilisana u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 min. Enzimsku hidrolizu je izvedena na 35 °C, uz mešanje pri 150 obrtaja/min, u trajanju od 96 h i uz dodatak sedam komercijalnih enzima za razgradnju hemiceluloze i celuloze: Celluclast 1,5L, Novozym 342, Viscozyme L, Pentopan 500BG i Pulpzyme HC (Novozymes, Denmark) i Multifect Xylanase i Multifect GC (Genencor, Rochester, NY). Enzimi su rablaženi u 0,05 M natrijum-citratnom puferu (pH 5,5) i u uzorak (25 ml) dodavan je 1 ml rastvora enzima. Kiselinska hidroliza je izvedena dodatkom određene zapremine 72% (m/m) H₂SO₄ tako da se postignu sledeće koncentracije sumporne kiseline u tečnosti sa oligosaharidima: 1, 2, 3 i 4% m/m. Hidroliza je izvedena u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 ili 60 min. Primenom kiselinske hidrolize na 121 °C u trajanju od 15 min ostvaren je viši prinos pentozna i niži sadržaj inhibitora nego enzimskom hidrolizom. Dobijeni hidrolizat je primenjen za fermentaciju pomoću *Debaryomyces hansenii* CCMI 941 za proizvodnju ksilitola i arabitola. Dodatkom aminokiselina u podlogu za fermentaciju ostvaren je najbolji prinos ksilitola od 0,29 g/g tropa.

Carvalho i saradnici [94] pivski trop su hidrolizovali kako su opisali Duarte i saradnici [93]. Ispitivan je uticaj dodatka nutrijenata u hidrolizat pivskog tropa (vitamini, minerali, izvori azota, fosfora i magnezijuma, pepton, ekstrakt kvasca, ekstrakt slada, voda od namakanja kukuruza) na prinos ksilitola ostvaren fermentacijom pomoću *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Najviši prinos ksilitola od 0,55 g/g dobijen je dodatkom ekstrakta kvasca (ostarena produktivnost je bila 0,36 g/Lh). Uklanjanje inhibitora fermentacije pomoću aktivnog uglja nije povećalo prinos ksilitola. U daljim istraživanjima Carvalho i saradnici [95] su ispitali uticaj dodatka ekstrakta kvasca (3,0; 4,5 i 6,0 g/L), amino-kiselina, vode od namakanja kukuruza, smeše vitamina i minerala ili smeše ekstrakta kvasca (3 g/L) i vode od namakanja kukuruza (5 g/L) u hidrolizat pivskog tropa na prinos ksilitola. Pivski trop je hidrolizovan pomoću razblažene sumporne kiseline (3% m/m) na 130 °C u trajanju od 15 min. Razblažena sumporna kiselina je dodata tako da se dobije 8% rastvor tropa. Nakon toga hidrolizat je filtriran i dobijenom filtratu je korigovana pH vrednost na 5,5. Ovako pripremljen hidrolizat pivskog tropa je korišćen za ispitivanje uticaja dodatka na prinos ksilitola dobijenog fermentacijom pomoću *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. Visok prinos ksilitola od 0,57 g/g je ostvaren dodatkom 6 g/L ekstrakta kvasca.

Dodatkom 6 g/L ekstrakta kvasca u hidrolizat tropa postignut je 1,4–1,8 puta viši prinos ksilitola od prinosa ostvarenog u hidrolizatu bez dodatka ekstrakta kvasca. Najviši prinos ksilitola od 0,58 g/g ostvaren je kombinovanjem ekstrakta kvasca i vode od namakanja kukuruza.

Mussatto i Roberto [31] ispitali su proizvodnju ksilitola iz pivskog tropa pomoću *Candida guilliermondii*. Hemicelulozna frakcija tropa je hidrolizovana razblaženom kiselinom. Ispitivani su uslovi kiselinske hidrolize tj. odnos kiseline i tropa (8–12 g/g), vreme trajanja hidrolize (17–37 min) kao i koncentracija sumporne kiseline (100–140 mg/g suve materije tropa). Pri optimalnim uslovima kiselinske hidrolize (odnos tropa i kiseline 8 g/g, 100 mg H₂SO₄/g suve materije tropa i trajanju hidrolize od 17 min) ostvaren je prinos ksilitola od 0,70 g/g i produktivnost od 0,45 g/Lh.

Pivski trop kao sirovina za proizvodnju pululana

Pululan je homopolisaharid glukoze koji se sastoji od α -(1→6) povezanih maltotrioza. Pululan može sintetisati soj plesni *Aureobasidium pullulans*. Zahvaljujući sastavu, pululan stvara vlakna i filmove koji su nerastvorljivi u uljima i ne propuštaju kiseonik. Pululan i njegovi derivati se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i elektro industriji [96,97].

Roukas [96] ispitivao je uticaj dodatka nutrijenata i početne vrednosti pH na sintezu pululana pomoću *Aureobasidium pullulans*. Pivski trop je obogaćen K₂HPO₄ (0,5% m/v), L-glutaminskom kiselinom (1% m/v), ili rastvorom maslinovog ulja (2,5%, v/v) i Tween 80 (0,5%, v/v). Pored toga pivski trop je obogaćen i smešom svih ovih nutrijenata u navedenim koncentracijama. Najveći prinos pululana (11 g/L, tj. 48,2%) je postignut dodatkom smeše navedenih nutrijenata. Uticaj početne pH vrednosti je ispitan podeševanjem na 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 ili 8,5. Najbolji rezultati prinosa pululana su ostvareni na pH vrednostima 6,5 i 7,5 (11,0 g/L tj. 48,2%). Iskorišćenje šećera kod dodatka smeše nutrijenata i optimalne pH vrednosti je bilo 99%.

Pivski trop kao sirovina za proizvodnju fenolnih kiselina

Od fenolnih kiselina u ječmu i sladu se u najvećim količinama nalaze ferulna i *p*-kumarinska [98,99]. Fenolne kiseline se uglavnom nalaze u spoljašnjem oмотаču zrna ječma koji sadrži 77,7–82,3% i 79,2–86,8% od ukupnih količina ferulne i *p*-kumarinske kiseline u zrnu ječma [100]. Vanbendenen i saradnici [101] ispitali su sadržaj ferulne i *p*-kumarinske kiseline u devet sorti slada poreklom iz dve sladare i u proizvedenim sladovinama. Dobijeni rezultati su pokazali da je samo mali deo ispitivanih kiselina iz slada (2,3–5,3% *p*-kumarinske kiseline i 7,1–12,5% ferulne kiseline) ekstrahovan u sladovinu tokom komljenja, a najveći deo je zaostao u tropu što je u svojim eksperimentima pokazala i Pejcin [102]. Ferulna kiselina se smatra jednom od najvažnijih

fenolnih kiselina zbog toga što ima fiziološke funkcije kao što su antioksidativna, antimikrobna i antiinflamatorna aktivnost. *p*-Kumarinska kiselina takođe poseduje značajnu antioksidativnu aktivnost. Obe kiseline su potencijalni prekursori biokatalitičke proizvodnje visoko vrednih aroma prirodnog porekla [103].

Bartolomé i saradnici [104] su u pivskom tropu nakon alkalne hidrolize (dodatkom 1M NaOH na 20 °C u trajanju od 16 h) i ekstrakcije sa etil-acetatom, u ekstraktu odredili ferulnu (0,17–0,24% suve materije) i *p*-kumarinsku kiselinu (0,068–0,121% suve materije).

Xiros i saradnici [105] ispitivali su enzime koji razgrađuju sastavne delove pivskog tropa u cilju dobijanja ferulne kiseline. Ispitivana je primena sirovog enzimskog ekstrakta iz *Fusarium oxysporum*. Dobijen je skoro 2,5 puta viši sadržaj ferulne kiseline (1 mg/g suve materije pivskog tropa) u poređenju sa primenom kombinacije feruloil esteraze (FoFaeC-12213) i ksilanaze (*Trichoderma longibrachiatum* M3) (0,37 mg/g suve materije pivskog tropa).

Mussatto i saradnici [103] ispitivali su različite uslove alkalne hidrolize pivskog tropa: koncentracija NaOH (1,0; 1,5 i 2,0%, m/v), temperatura (80, 100 i 120 °C) i trajanje hidrolize (30, 60 i 90 min). U ovim eksperimentima je odnos pivskog tropa i vode bio 1:20 m/m. Najbolji uslovi alkalne hidrolize pivskog tropa u cilju dobijanja ferulne i *p*-kumarinske kiseline su bili 2% m/v NaOH na 120 °C u trajanju od 90 min. Pod ovim uslovima hidrolize dobijeno je u hidrolizatu 145,3 mg/L ferulne kiseline i 138,8 mg/L *p*-kumarinske kiseline.

Faulds i saradnici [106] ispitivali su aktivnost feruloil esteraze iz termofilne plesni *Humicola insolens*. Delovanjem ovog enzima (1 jedinica/g pivskog tropa) na pivski trop nakon 24 h inkubacije na 37 °C uz mešanje utvrđen je sadržaj ferulne i *p*-kumarinske kiseline od 1,40 i 2,55 µg/mg tropa, redom.

U novijim istraživanjima, Szwajgier i saradnici [107] ispitivali su aktivnost esteraze ferulne kiseline iz *Lactobacillus acidophilus* K1. U pripremljeni pivski trop su dodate različite koncentracije esteraze ferulne kiseline i određivan je sadržaj hidroksicimetnih kiselina: ferulne, *p*-kumarinske, sinapinske, kafene i siringinske. Pivski trop je prethodno pripremljen: odmrznuti i fino samleveni pivski trop (10 g) pomešan je sa 100 ml Britton–Robinson pufera (pH 6,3) nakon čega je uzorak stavljen u autoklav (15 min, 115 °C, 0,5 bar) i zatim ohlađen na 30–35 °C. U ovako pripremljene uzorke pivskog tropa su dodate različite koncentracije enzima: 54,5 jedinica/100g pivskog tropa, 116,7 jedinica/100g pivskog tropa i 194,5 jedinica/100g pivskog tropa. Uzorci su inkubirani na 37 °C u trajanju od 3 h, i svakog časa su uzimani alikvoti, koji su centrifugirani i nakon toga je vršena ekstrakcija fenolnih kiselina etil-acetatom. Ferulna kiselina je bila dominantna u odnosu na ostale ispitivane kiseline. Nakon 3 h inkubacije u uzorcima sa

dodatkom enzima u koncentraciji od 194,5 jedinica/100 g pivskog tropa određen je maksimalan sadržaj ferulne kiseline od 7,00 mg/100 g pivskog tropa. Maksimalni sadržaj *p*-kumarinske je takođe dobijen nakon 3 časa i pri dodatku od 116,7 i 194,5 jedinica/100 g pivskog tropa i iznosio je 1,88 mg/100 g pivskog tropa. Nakon 3 časa delovanja enzima (54,5 jedinica/100 g pivskog tropa) utvrđen je najviši sadržaj sinapinske kiseline 1,16 mg/100 g pivskog tropa. Kafena kiselina je određena u svim uzorcima, a najviši sadržaj od 0,37 mg/100 g pivskog tropa je dobijen nakon 3 časa i pri koncentraciji enzima od 194,5 jedinica/100g g pivskog tropa. Maksimalni sadržaj siringinske kiseline od 0,39 mg/100 g pivskog tropa je određen nakon 3 časa inkubacije (koncentracija enzima od 194,5 jedinica/100 g pivskog tropa).

Pivski trop kao sirovina za proizvodnju biogasa

Proizvodnja biogasa anaerobnom fermentacijom iz biogenih organskih sporednih proizvoda ima značaj zbog njihovog ponovnog korišćenja. Pivski trop se može koristiti za proizvodnju biogasa. Biogas je mešavina 60–70% metana, ugljen-dioksida, vodonika, azota i ugljen-monoksida [15,16]. Proizvodnja biogasa obuhvata dve faze: hidrolizu tropa i metanogenezu. Hidroliza vlakana tropa je ograničavajući korak za kompletnu razgradnju tropa. Međutim, postoji nekoliko mogućnosti predtretmana radi povećanja brzine fermentacije. Jedna od mogućnosti je hemijsko-termički (na 70 °C) predtretman fino samlevenog tropa uz dodatak 0,2 M NaOH. Druga mogućnost je enzimski tretman celulazama [14].

U fazi metanogeneze, mikroorganizmi u prvom koraku razgrađuju makromolekule do isparljivih masnih kiselina, acetata, butirata i propionata. Iz ovih isparljivih kiselina, tokom dalje fermentacije metanogeneze, bakterije proizvode metan [15].

Optimizovana je hidroliza u cilju unapređenja isplativosti proizvodnje biogasa. Alkalnom hidrolizom i tropa i anaerobnom fermentacijom dobijenog hidrolizata ostvarena je konverzija 86% organske materije tropa za 8 dana [24]. Ezeonu i Okaka [15] su ispitivali kinetiku procesa i efikasnost dobijanja biogasa anaerobnom diskontinualnom fermentacijom pivskog tropa. Ostvaren je prinos biogasa od 3476cm³/100g tropa nakon 15 dana fermentacije. Ostatak nakon fermentacije može da se koristi kao đubrivo zbog visokog sadržaja azota [94].

Biogas se može koristiti i u pivari kao izvor toplote. Međutim, Acacio i saradnici [108] su utvrdili da je proizvodnja biogasa iz pivskog tropa isplativa samo u pivarama koje proizvode više od 20 miliona L piva godišnje.

ZAKLJUČAK

Pivski trop nastaje u velikim količinama tokom cele godine, jeftin je ili besplatan i zbog visokog sadržaja

proteina i ugljenih hidrata može se upotrebljavati kao sirovina u biotehnologiji: za proizvodnju mlečne kiseline, bioetanol, fenolnih kiselina, ksilitola, pululana, biogasa, kao podloga za kultivaciju mikroorganizama i proizvodnju enzima i kao dodatak ili nosač za imobilizaciju ćelija kvasca u fermentaciji piva. U radu su takođe detaljno opisani postupci pripreme tropa: kiselinska, bazna ili enzimaska hidroliza pivskog tropa za navedene postupke u biotehnologiji kao i proizvodni mikroorganizmi, uslovi i parametri fermentacija. Na osnovu opisanih tehnoloških postupaka, može se zaključiti da je pivski trop pogodna sirovina za navedene proizvode. Primena pivskog tropa u biotehnologiji nije interesantna samo sa ekonomskog aspekta već i sa aspekta zaštite životne sredine.

Zahvalnica

Rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat TR-31017).

LITERATURA

- [1] C. Gerhäuser, Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents, *Eur. J. Cancer.* **41** (2005) 1941–1954.
- [2] G. Walker, *Yeast physiology and biotechnology*, 1st ed., John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [3] W. Kunze, *Technologie Brauer und Mälzer*, 8. Auflage, VLB Berlin, 1998.
- [4] S. Wunderlich, W. Back, in: V. Preedy (Eds.), *Beer in Health and Disease Prevention* Academic Press, Elsevier, 2008.
- [5] M. Gallo, A. Sommer, R. Mlynar, L. Rajcakova, Effect of dietary supplementation with brewery draff on rumen fermentation and milk production in grazing dairy cows, *J. Farm. Animal Sci.* **34** (2001) 107–113.
- [6] J. Firkins, D. Harvatine, J. Sylvester, M. Eastridge, Lactation performance by dairy cows fed wet brewers grains or whole cottonseed to replace forage, *J. Dairy Sci.* **85** (2002) 2662–2668.
- [7] T. Dhiman, H. Bingham, H. Radloff, Production response of lactating cows fed dried versus wet brewers' grain in diets with similar dry matter content, *J. Dairy Sci.* **86** (2003) 2914–2921.
- [8] V. Kaur, P. Saxena, Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps, *Bioresour. Technol.* **91** (2004) 101–104.
- [9] S. Öztürk, Ö. Özboy, I. Cavidoglu, H. Köksel, Effects of brewers' spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies, *J. Inst. Brew.* **108** (2002) 23–27.
- [10] S. Plessas, M. Trantallidi, A. Bekatoru, M. Kanellaki, P. Nigam, A. Koutinas, Immobilization of *kefir* and *Lactobacillus cesei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making, *Food Chem.* **105** (2007) 187–194.
- [11] W. Russ, H. Mörtel, R. Meyer-Pittroff, Application of spent grain to increase porosity in bricks, *Constr. Build. Mater.* **19** (2005) 117–126.
- [12] K. Sato, N. Yagi, H. Okamoto, M. Inoue, T. Ajiri, J. Shibata, Physical property and burning property of spent grain charcoal, *J. Min. Mater. Proc. Inst. J.* **117** (2001) 587–590.
- [13] N. Ishiwaki, H. Murayama, H. Awayama, O. Kanauchi, T. Sato, Development of high value uses of spent grain by fractionation technology, *MBAA TQ* **37** (2000) 261–265.
- [14] C. Rieker, M. Moeller, K. Sommer, Anaerobic degradation of beer spent grains for biogas production, *Brauwelt* **132** (1992) 716–721.
- [15] F. Ezeonu, A. Okaka, Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG), *Process Biochem.* **31** (1996) 7–12.
- [16] H. Okamoto, Y. Kitagawa, T. Minowa, T. Ogi, Thermal-catalytic conversion of high moisture spent grains to a gaseous fuel, *MBAA TQ* **36** (1999) 239–241.
- [17] G. Zanker, W. Kepplinger, The utilization of spent grains in the brewery integrated system, *Brauwelt* **142** (2002) 1742–1747.
- [18] P. Chiang, P. Chang, J. You, Innovative technology for controlling VOC emissions, *J. Hazard. Mater.* **31** (1992) 19–28.
- [19] K. Low, C. Lee, S. Liew, Sorption of cadmium and lead from aqueous solutions by spent grain, *Process Biochem.* **36** (2000) 59–64.
- [20] K. Low, C. Lee, C. Low, Sorption of chromium (VI) by spent grain under batch conditions, *J. Appl. Polym. Sci.* **82** (2001) 2128–2134.
- [21] J. Silva, S. Sousa, J. Rodrigues, H. Antunes, J. Porter, I. Goncalves, S. Ferreira-Dias, Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains, *Sep. Purif. Technol.* **40** (2004) 309–315.
- [22] J. Silva, S. Sousa, I. Goncalves, J. Porter, S. Ferreira-Dias, Modeling adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions to spent brewery grains, *Sep. Purif. Technol.* **40** (2004) 163–170.
- [23] C. Bamforth, *Brewing New technologies*, 1st ed., Woodhead publishing limited, Cambridge, 2006.
- [24] S. Mussatto, G. Dragone, I. Roberto, Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications, *J. Cereal Sci.* **4** (2006) 1–14.
- [25] M. Santos, J. Jimenez, B. Bartolomé, C. Gomez-Cordoves, J. del Nozal, Variability of brewer's spent grain within a brewery, *Food Chem.* **80** (2003) 17–21.
- [26] A. Jay, M. Parker, R. Faulks, F. Husband, P. Wilde, A. Smith, C. Faulds, K. Waldron, A systematic micro-dissection of brewers' spent grain, *J. Cereal Sci.* **47** (2008) 357–364.
- [27] Privredna Komora Srbije (<http://www.pks.rs/>).
- [28] K. Schuster, F. Weinfurter, L. Narziss, *Die Bierbrauerei: Band I: Die Technologie der Malzbereitung*, 7., Neu bearbeitete Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1999.
- [29] P. Forssell, H. Kontkanen, H. Schols, S. Hinz, V. Eijsink, J. Treimo, J. Robertson, K. Waldron, C. Faulds, J. Buchert, Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes, *J. Inst. Brew.* **114** (2008) 306–314.
- [30] S. Mussatto, J. Teixeira, in: A. Méndez-Vilas (Eds.), *Communicating Current Research, Technology and Edu-*

- cation Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex, Badajoz, 2010.
- [31] S. Mussatto, I. Roberto, Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 2453–2460.
- [32] S. Mussato, M. Fernandes, G. Rocha, J. Órfão, J. Teixeira, I. Roberto, Production, characterization and application of activated carbon from brewer's spent grain lignin, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 2450–2457.
- [33] I. Celus, Characterisation and fractionality of brewer's spent grain proteins and their enzymatic hydrolysates, PhD thesis, Laboratory of Food Chemistry and Biochemistry, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, 2008.
- [34] J. Robertson, K. l'Anson, J. Treimo, C. Faulds, T. Brocklehurst, V. Eijsink, K. Waldron, Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production, *LWT – Food Sci. Technol.* **43** (2010) 890–896.
- [35] S. Aliyu, M. Bala, Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications, *Afr. J. Biotechnol.* **10** (2011) 324–331.
- [36] B. Bogar, G. Szakacs, R. Tengerdy, J. Linden, A. Pandey, Production of α -amylase with *Aspergillus oryzae* on spent brewing grain by solid substrate fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **102–103** (2002) 453–461.
- [37] A. Serena, K. Bach Knudsen, Chemical and physicochemical characterisation of co-products from the vegetable food and agro industries, *Anim. Feed Sci. Technol.* **139** (2007) 109–124.
- [38] G. Dehnavi, Fractionation of the main components of barley spent grains from a microbrewery, Master thesis in Resource Recovery - Sustainable Technology, Department of Chemical Engineering, School of Engineering, University of Borås, 2009.
- [39] A. Al-Hadithi, A. Muhsen, A. Yaser, Study of the possibility of using some organic acids as preservatives for brewery by-products, *J. Agric. Water Resour. Res.* **4** (1985) 229–242.
- [40] U. Kuntzel, H. Sonnenberg, Preservation of pressed brewers' spent grains with potassium sorbate, *Monatschr. Brauwiss.* **50** (1997) 175–181.
- [41] D. Tang, G. Yin, Y. He, S. Hu, B. Li, L. Li, H. Liang, D. Borthakur, Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration, *Biochem. Eng. J.* **48** (2009) 1–5.
- [42] E. El-Shafey, M. Gameiro, P. Correia, J. de Carvalho, Dewatering of brewers' spent grain using a membrane filter press: a pilot plant study, *Separ. Sci. Technol.* **39** (2004) 3237–3261.
- [43] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, D. Pejin, M. Vukašinović-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić, J. Pejin, Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama, *Hem. Ind.* **65** (2011) 411–422.
- [44] G. Reddy, M. Altaf, B. Naveena, M. Venkateshwar, E. Vijay Kumar, Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 22–34.
- [45] Purac Corporate (www.purac.com).
- [46] Galactic Corporate (www.lactic.com).
- [47] F. Mirasol, Lactic acid prices falter as competition toughen, *Chem. Market Reporter* **255** (1999) 16.
- [48] R. Datta, M. Henry, Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81** (2006) 1119–1129.
- [49] S. Mussatto, M. Fernandes, I. Mancilha, I. Roberto, Effect of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain, *Biochem. Eng. J.* **40** (2008) 437–444.
- [50] H. Oh, Y. Wee, J. Yun, S. Han, S. Jung, H. Ryu, Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials, *Bioresour. Technol.* **96** (2005) 1492–1498.
- [51] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Tech.* **26** (2000) 87–107.
- [52] S. Mussatto, M. Fernandes, G. Dragone, I. Mancilha, I. Roberto, Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 1973–1976.
- [53] A. Djukić, L. Mojović, M. Vukašinović-Sekulić, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, S. Nikolić, Uticaj temperature i prisustva kiseonika na mlečno-kiselinsku fermentaciju pomoću *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NRRLB 4654 na tečnoj destilerijskoj džibri, Knjiga celih radova sa Konferencije „Biotehnologija za održivi razvoj”, CD-izdanje, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [54] M. Marković, S. Markov, D. Pejin, L. Mojović, M. Vukašinović, J. Pejin, N. Joković, Primena džibre tritikalea za proizvodnju mlečne kiseline, Knjiga celih radova sa Konferencije „Biotehnologija za održivi razvoj”, CD-izdanje, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [55] S. Nikolić, M. Vukašinović-Sekulić, D. Pejin, L. Mojović, M. Rakin, J. Pejin, A. Djukić, Proizvodnja mlečne kiseline iz kukuruzne tečne džibre pomoću *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, Knjiga celih radova sa Konferencije „Biotehnologija za održivi razvoj”, CD-izdanje, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [56] M. Marković, S. Markov, D. Pejin, L. Mojović, M. Vukašinović, J. Pejin, N. Joković, The possibility of lactic acid fermentation in the triticale stillage, *Chem. Ing. Chem. Eng. Q.* **17** (2011) 153–162.
- [57] L. Mojović, M. Vukašinović-Sekulić, A. Djukić, D. Pejin, M. Rakin, J. Pejin, S. Nikolić, Production of lactic acid on liquid distillery stillage, *J. Process. Energ. Agric.* **15** (2011) 1–5.
- [58] M. Marković, S. Markov, D. Pejin, L. Mojović, O. Grujić, S. Savatović, J. Pejin (2011) Triticale usage in the biotechnological process – bioethanol and lactic acid production, *Zbornik Tehnološkog fakulteta u Leskovcu* **20** (2011) 105–113.
- [59] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, D. Pejin, M. Vukašinović-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić, J. Pejin, Proizvodnja mlečne kiseline na tečnoj destilerijskoj džibri pomoću *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7649, *Zbornik Tehnološkog fakulteta u Leskovcu* **20** (2011) 96–104.
- [60] A. Djukić-Vuković, L. Mojović, M. Vukašinović-Sekulić, M. Rakin, S. Nikolić, J. Pejin, M. Bulatović, Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage, *Food Chem.* **134** (2012) 1038–1043.

- [61] T. Brányik, A. Vicente, J. Cruz, J. Teixeira, Spent grains – a new support for brewing yeast immobilisation, *Biotechnol. Lett.* **23** (2001) 1073–1078.
- [62] T. Brányik, A. Vicente, J. Cruz, J. Teixeira, Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains, *J. Inst. Brew.* **108** (2002) 410–415.
- [63] T. Brányik, A. Vicente, G. Kuncová, O. Podrazký, P. Dostálek, J. Teixeira, Growth model and metabolic activity of brewing yeast biofilm on the surface of spent grains: a biocatalyst for continuous beer fermentation, *Biotechnol. Progr.* **20** (2004) 1733–1740.
- [64] T. Brányik, A. Vicente, O. Rosario, J. Teixeira, J. Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **88** (2004) 84–93.
- [65] L. Mojović, D. Pejin, O. Grujić, S. Markov, J. Pejin, M. Rakin, M. Vukašinović, S. Nikolić, D. Savić, Progress in the production of bioethanol on starch-based feedstocks, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **15** (2009) 211–226.
- [66] D. Pejin, Lj. Mojović, V. Vučurović, J. Pejin, S. Denčić, M. Rakin, Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study, *Fuel* **88** (2009) 1625–1628.
- [67] S. Nikolić, L. Mojović, M. Rakin, D. Pejin, J. Pejin, Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal, *Food Chem.* **122** (2010) 216–222.
- [68] S. Nikolić, L. Mojović, M. Rakin, D. Pejin, J. Pejin, Utilization of microwave and ultrasound pretreatments in the production of bioethanol from corn, *Clean. Technol. Environ.* **13** (2011) 587–594.
- [69] D. Pejin, L. Mojović, J. Pejin, O. Grujić, S. Markov, S. Nikolić, M. Marković, Increase in bioethanol production yield from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with application of ultrasound, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87** (2012) 170–176.
- [70] V. Semenčenko, L. Mojović, S. Petrović, O. Očić, Novi trendovi u proizvodnji bioetanol, *Hem. Ind.* **6** (2011) 103–114.
- [71] J. White, B. Yohannan, G. Walker, Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol, *FEMS Yeast Res.* **8** (2008) 1175–1184.
- [72] C. Xiros, E. Topakas, P. Katapodis, P. Christakopoulos, Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 5427–5435.
- [73] C. Xiros, E. Topakas, P. Katapodis, P. Christakopoulos, Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production, *Ind. Crop Prod.* **28** (2008) 213–224.
- [74] G. Novik, J. Wawrzynczyk, O. Norrlov, E. Szwajcer-Dey, Fractions of barley spent grain as media for growth of probiotic bacteria, *Microbiology* **76** (2007) 804–808.
- [75] A. Gregori, M. Svagelj, B. Pahor, M. Berovic, F. Pohleven, The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production, *New Biotechnol.* **25** (2008) 157–161.
- [76] D. Wang, A. Sakoda, M. Suzuki, Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain, *Bioresour. Technol.* **78** (2001) 293–300.
- [77] B. Szponar, K. Pawlik, A. Gamian, E. Dey, Protein fraction of barley spent grain as a new simple medium for growth and sporulation of soil actinobacteria, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1717–1721.
- [78] K. Aikat, B. Bhattacharyya, Optimization of some parameters of solid state fermentation of wheat bran for protease production by a local strain of *Rhizopus oryzae*, *Acta Biotechnol.* **20** (2000) 149–159.
- [79] P. Sangeetha, M. Ramesh, S. Prapulla, Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products, *Appl. Microbiol. Biot.* **65** (2004) 530–537.
- [80] R. Nascimento, N. Junior, N. Pereira Jr, E. Bon, R. Coelho, Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrate for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*, *Lett. Appl. Microbiol.* **48** (2009) 529–535.
- [81] T. Sim, J. Oh, Spent brewery grains as substrate for the production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM9414, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **5** (1999) 153–158.
- [82] F. Francis, A. Sabu, K. Nampoothiri, G. Szakacs, A. Pandey, Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, *J. Basic Microb.* **42** (2002) 320–326.
- [83] F. Francis, A. Sabu, K. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs, A. Pandey, Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Biochem. Eng. J.* **15** (2003) 107–115.
- [84] M. Hashemi, S. Razavi, S. Shojaosadati, S. Mousavi, The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system, *New Biotechnol.* **28** (2011) 165–172.
- [85] H. Xu, L. Sun, D. Zhao, B. Zhang, Y. Shi, Y. Wu, Production of α -amylases by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate, *J. Sci. Food Agr.* **88** (2008) 529–535.
- [86] H. Adeniran, S. Abiose, A. Ogunsua, Production of fungal β -amylase and amyloglucosidase on some Nigerian agricultural residues, *Food Bioprocess Technol.* **3** (2010) 693–698.
- [87] G. Panagiotou, P. Granouillet, L. Olsson, Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation, *Appl. Microbiol. Biot.* **72** (2006) 1117–1124.
- [88] G. Mandalari, G. Bisignano, R. Lo Curto, K. Waldron, C. Faulds, Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *Thermoidea* on industrial food processing by-products, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 5130–5133.
- [89] B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés, A. Sancho, N. Díez, P. Ferreira, J. Soliveri, J. Copa-Patiño, Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339, *Enzyme Microb. Tech.* **32** (2003) 140–144.

- [90] C. Almeida, T. Brányik, P. Moradas-Ferreira, J. Teixeira, Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains, *J. Biosci. Bioeng.* **96** (2003) 513–518.
- [91] C. Almeida, T. Brányik, P. Moradas-Ferreira, J. Teixeira, Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain, *Process Biochem.* **40** (2005) 1937–1942.
- [92] C. Xiros, P. Christakopoulos, Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system, *Biotechnology for Biofuels* **2** (2009) 4–15.
- [93] L. Duarte, F. Carvalheiro, S. Lopes, S. Marques, J., Parajó, F. Gírio, Comparison of two posthydrolysis processes of brewer's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium, *Appl. Biochem. Biotech.* **115** (2004) 1041–1058.
- [94] F. Carvalheiro, L. Duarte, S. Lopes, J. Parajó, H. Pereira, F. Gírio, Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **33** (2006) 646–654.
- [95] F. Carvalheiro, L. Duarte, R. Medeiros, F. Gírio, Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 1887–1891.
- [96] T. Roukas, Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*, *World J. Microb. Biot.* **15** (1999) 447–450.
- [97] T. Leathers, Biotechnological production and applications of pullulan, *Appl. Microbiol. Biot.* **62** (2003) 468–473.
- [98] D. Briggs, C. Boulton, P. Brookes, R. Stevens, *Brewing Science and practice*, CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 2004.
- [99] J. Pejin, O. Grujić, J. Čanadanović-Brunet, Đ. Vujić, V. Tumbas, Investigation of phenolic acids content and antioxidant activity in malt production, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **67** (2009) 81–88.
- [100] D. Hernanz, V. Nuñez, A. Sancho, G. Faulds, G. Williamson, B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés, Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley, *J. Agr. Food Chem.* **49** (2001) 4884–4888.
- [101] N. Vanbeneden, F. Gills, F. Delvaux, F. Delvaux, Variability in the release of free and bound hydroxycinnamic acids from diverse malted barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during wort production, *J. Agr. Food Chem.* **55** (2007) 11002–11010.
- [102] J. Pejin, Ispitivanje sadržaja i antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina u toku proizvodnje slada i piva, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2009.
- [103] S. Mussatto, G. Dragone, I. Roberto, Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, *Ind. Crop. Prod.* **25** (2007) 231–237.
- [104] B. Bartolomé, M. Santos, J. Jiménez, M. del Nozal, C. Gómez-Cordovés, Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent Grain, *J. Cereal Sci.* **36** (2002) 51–58.
- [105] C. Xiros, M. Moukoui, E. Topakas, P. Christakopoulos, Factors affecting ferulic acid release from brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 5917–5921.
- [106] C. Faulds, G. Mandalari, R. LoCurto, G. Bisignano, K. Waldron, Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewers' grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*, *Appl. Microbiol. Biot.* **64** (2004) 644–650.
- [107] D. Szwajgier, A. Wasko, Z. Targoński, M. Niedźwiadek, M. Bancarzewska, The use of novel ferulic acid esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the release of phenolic acids from brewer's spent grain, *J. Inst. Brew.* **116** (2010) 293–303.
- [108] K. Acacio, J. Kapaldo, M. Orekoya, S. Sahni, A. Apyan, P. Kim, M. Prusak, S. Zahir, E. Chiem, R. Mares Araiza, A. Smith, S. Tomlin, IPRO 340: Business study of alternative uses for brewer's spent grain, Final Project Report, Faculty advisors: M. Dushay and P. Lewis, Illinois Institute of Technology, 2011 (<http://share.iit.edu/>).

SUMMARY

POSSIBLE APPLICATION OF BREWER'S SPENT GRAIN IN BIOTECHNOLOGY

Jelena D. Pejin¹, Miloš S. Radosavljević¹, Olgica S. Grujić¹, Ljiljana V. Mojović², Sunčica D. Kocić-Tanackov¹, Svetlana B. Nikolić², Aleksandra P. Djukić-Vuković²

¹*University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia*

²*University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Beograd, Serbia*

(Review paper)

Brewer's spent grain is the major by-product in beer production. It is produced in large quantities (20 kg per 100 L of produced beer) throughout the year at a low cost or no cost, and due to its high protein and carbohydrates content it can be used as a raw material in biotechnology. Biotechnological processes based on renewable agro-industrial by-products have ecological (zero CO₂ emission, eco-friendly by-products) and economical (cheap raw materials and reduction of storage costs) advantages. The use of brewer's spent grain is still limited, being basically used as animal feed. Researchers are trying to improve the application of brewer's spent grain by finding alternative uses apart from the current general use as an animal feed. Its possible applications are in human nutrition, as a raw material in biotechnology, energy production, charcoal production, paper manufacture, as a brick component, and adsorbent. In biotechnology brewer's spent grain could be used as a substrate for cultivation of microorganisms and enzyme production, additive or yeast carrier in beer fermentation, raw material in production of lactic acid, bioethanol, biogas, phenolic acids, xylitol, and pullulan. Some possible applications for brewer's spent grain are described in this article, including pre-treatment conditions (different procedures for polysaccharides, hemicelluloses and cellulose hydrolysis), working microorganisms, fermentation parameters and obtained yields. The chemical composition of brewer's spent grain varies according to barley variety, harvesting time, malting and mashing conditions, and a quality and type of unmalted raw material used in beer production. Brewer's spent grain is lignocellulosic material rich in protein and fibre, which account for approximately 20 and 70% of its composition, respectively.

Keywords: Brewer's spent grain • Biotechnology • Lactic acid • Enzymes • Bioethanol