

Разработка инновационного способа получения биологически активных соединений пивной дробины



К. В. Кобелев^{ORCID}, М. В. Гернет^{ORCID}, И. Н. Грибкова*^{ORCID}

Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности^{ROR}, Москва, Россия

Дата поступления в редакцию: 21.01.2021

Дата принятия в печать: 22.02.2021



*e-mail: institut-beer@mail.ru

© К. В. Кобелев, М. В. Гернет, И. Н. Грибкова, 2021

Аннотация.

Введение. Пивная дробина является отходом пивоваренного производства и содержит в себе ценные биологически активные вещества, извлечение которых затруднено по причине присутствия различных полимеров, осложняющих экстракцию. Исследование направлено на решение проблемы использования отходов производства, накапливающихся в больших количествах и требующих материальных затрат на переработку или утилизацию. Целью работы является разработка технологических подходов глубокой переработки пивной дробины как источника вторичных сырьевых ресурсов (ВСР) для получения экстрактов, обогащенных полифенольными соединениями.

Объекты и методы исследования. Солодовая пивная дробина, подвергнутая обработке с помощью ЭХА-активированной воды (католитом с рН 9,6 ± 0,1), с последующим ферментативным гидролизом целлюлолитическими ферментными препаратами и экстракцией полярным растворителем образовавшихся свободных полифенольных веществ. В работе применялись общепринятые методы оценки содержания различных биологически активных веществ.

Результаты и их обсуждение. Исследование органических экстрагентов для извлечения из дробины полифенольных соединений различных групп показало перспективность применения 70 % водно-этанольного раствора при соотношении дробина:экстрагент 2:1, температуре процесса 50 ± 2 °С и длительности 60 ± 5 мин. Применение 70 % об. дистиллята пива при прочих условиях позволило извлечь из матрицы дробины фенольные кислоты, флавоноид рутин, незаменимые и заменимые аминокислоты, некрахмальный полисахарид β-глюкан. Обработка дробины 1М раствором NaOH позволила получить вязкие гидролизаты, обогащенные флавоноидами рутин и кверцетин, в отличие от кислотного гидролиза. Комбинированное применение ЭХА-обработанной воды (католита с рН 9,6 ± 0,1) в течение 24 ± 0,05 ч, совмещенное с биокатализом ферментным препаратом Вискофло МГ в течение 2 ± 0,05 ч, позволило получить обогащенные экстракты пивной дробины с повышенным содержанием фенольных кислот и альдегидов, а также флавоноида рутина.

Выводы. Проведенные исследования позволили сделать заключение о механизме гидролитического распада некрахмальных полисахаридов пивной дробины с учетом содержащихся соединений в экстрактах. Полученные обогащенные различными фенольными соединениями гидролизаты дробины можно использовать в различных пищевых технологиях (например, в технологии ферментированных напитков).

Ключевые слова. Пиво, зерно, ЭХА-вода, биокатализ, экстракция, фенольные соединения

Финансирование. Работа выполнена на базе Всероссийского научно-исследовательского института пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности (ВНИИПБиВП)^{ROR}.

Для цитирования: Кобелев, К. В. Разработка инновационного способа получения биологически активных соединений пивной дробины / К. В. Кобелев, М. В. Гернет, И. Н. Грибкова // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 1. – С. 113–124. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-113-124>.

Original article

Available online at <http://fptt.ru/eng>

Innovative Method for Obtaining Biologically Active Compounds from Brewery Mash

Konstantin V. Kobelev^{ORCID}, Marina V. Gernet^{ORCID}, Irina N. Gribkova*^{ORCID}

All-Russian Research Institute of Brewing, Non-alcoholic and Wine Industry^{ROR}, Moscow, Russia

Received: January 21, 2021

Accepted: February 22, 2021



*e-mail: institut-beer@mail.ru

© K.V. Kobelev, M.V. Gernet, I.N. Gribkova, 2021

Abstract.

Introduction. Brewery mash, or brewer's spent grain (BSG), is a by-product of brewing industry. It is known to contain valuable biologically active substances. However, their extraction is complicated by the presence of various polymers. The research featured various physicochemical methods for obtaining valuable biological compounds from brewery waste. The new method modified complex non-starch polysaccharides, lignin, arabinoxylans, and other high-molecular compounds associated with phenolic compounds. The research objective was to solve the problem of recycling industrial by-products that accumulate in large quantities and require expensive processing or disposal. The paper introduces new technological approaches for deep processing of BSG as a source of secondary raw materials in order to obtain extracts fortified with polyphenolic compounds.

Study objects and methods. The research featured BSG from malt subjected to treatment with ECA-activated water (catholyte with pH 9.6 ± 0.1), followed by enzymatic hydrolysis of cellulolytic enzyme preparations and extraction with a polar solvent of the resulting free polyphenolic substances. The experiments were based on standard methods for assessing the content of various biologically active substances.

Results and discussion. A 70% water-ethanol solution proved to be optimal at the BSG:extractant ratio of 2:1, process temperature = $50 \pm 2^\circ\text{C}$, and extraction time = 60 ± 5 min. Under the same conditions, 70 %vol. of beer distillate made it possible to extract phenolic acids, flavonoid rutin, irreplaceable and nonessential amino acids, and non-starch polysaccharide β -glucan from the BSG matrix. The BSG treatment with 1M NaOH solution delivered viscous hydrolysates fortified with flavonoids rutin and quercetin, which did not happen when acid hydrolysis was used. The combined use of ECA-treated water (catholyte with pH 9.6 ± 0.1) for 24 ± 0.05 h, combined with biocatalysis with the enzyme preparation Viskoflo MG for 2 ± 0.05 h, made it possible to obtain BSG extracts with a high content of phenolic acids and aldehydes, as well as flavonoid rutin.

Conclusion. The study revealed the mechanism of hydrolytic decomposition of BSG non-starch polysaccharides, considering the compounds contained in the extracts. The BSG hydrolysates fortified with various phenolic compounds can be used in various food technologies, e.g., in fermented drinks.

Keywords. Beer, grain, ECA-water, biocatalysis, extraction, phenolic compounds

Funding. The research was performed on the premises of the All-Russian Research Institute of Brewing, Non-alcoholic and Wine Industry (VNIIPBiVP) .

For citation: Kobelev KV, Gernet MV, Gribkova IN. Innovative Method for Obtaining Biologically Active Compounds from Brewery Mash. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(1):113–124. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-113-124>.

Введение

Пивная дробина является вторичным сырьевым ресурсом в технологии пивоварения, утилизация или переработка которой актуальны. Во-первых, это дает возможность дальнейшего применения биологически активных соединений, не задействованных по причине затрудненного извлечения из матрицы дробины. Во-вторых, позволяет решить вопросы экологизации производства, чему в последнее время уделяется много внимания по ряду причин [1].

Согласно Постановлению Правительства РФ от 03.03.2017 № 255 (ред. от 17.08.2020) «Об исчислении и взимании платы за негативное воздействие на окружающую среду» производитель вынужден нести дополнительные экономические затраты за отчисление налогов на утилизацию различных отходов производства. Это снижает рентабельность предприятия и повышает актуальность проблемы переработки пивной дробины, т. е. создания малоотходного производства.

Дробина является ценным зерновым сырьем с точки зрения ее дальнейшей переработки для

различных нужд. Отмечается, что нативная дробина не токсична, но в ней содержится малое количество витаминов. Также нативная пивная дробина имеет высокое содержание белковых веществ (12–15 %), углеводов (до 70 %), липидов, жирнокислотный состав которых биологически высокоэффективен [2]. Поэтому одним из способов переработки дробины является ее сушка и применение в кормлении скота и домашних животных [3].

В состав углеводов пивной дробины входят высокомолекулярные некрахмальные полисахариды – целлюлоза, лигнин, арабиноксиланы, остатки нерастворенного крахмала; азотистые вещества представлены белками и аминокислотами; в составе присутствуют свободные и связанные фенольные соединения различной молекулярной массы и др. [4].

Поэтому исследования, направленные на изучение возможности переработки пивной дробины различными физико-химическими и биотехнологическими способами, а также получения увеличенного выхода различных связанных в растительной матрице дробины соединений, значимы.

Для нужд пищевой и комбикормовой промышленности посредством применения биокатализаторов различного действия удается достичь накопления в гидролизатах различных низкомолекулярных соединений. Так, применение биокатализаторов целлюлолитического действия, позволяющее накопить в жидкой фазе смеси из 9 и более глюкозных остатков некрахмальных углеводов или декстринов различных моносахаров (арабиноза и ксилоза), муравьиную, уксусную и левулиновую кислоты, позволило обогатить белком гидролизаты за счет последующего выращивания микроорганизмов-продуцентов белков [5–8].

С помощью кислотного гидролиза, в том числе комбинированного с обработкой ЭХА-водой (катионитом и анионитом) некрахмальных полисахаридов, из дробины получают гидролизаты, обогащенные ксилозой для применения в технологии получения подсластителя ксилита [9].

Щелочной гидролиз позволяет добиться высвобождения сахаров и небольшого количества фенольных соединений (феруловой и кумаровой кислот), поскольку щелочь воздействует на лигнин и разрывает связи между различными некрахмальными сахарами, делая их доступными для гидролиза разными способами [10, 11]. Щелочной гидролиз также позволяет высвободить из связанного состояния гордеины и глютелины дробины, а также приводит к ограниченному гидролизу липидные вещества [12].

Учитывая связанное состояние высокомолекулярных соединений (арабиноксиланов, лигнина, белков), т. е. наличие связей различной природы, доступ ферментных препаратов к полимерам затруднителен при осуществлении гидролиза. Поэтому применяют принципы физической предобработки, способствующие разрыву межмолекулярных связей: экстракцию жидкости под давлением, сверхкритическую экстракцию, экстракцию с помощью СВЧ и ультразвук [13, 14].

Учитывая вышесказанное, для извлечения необходимых соединений, в том числе полифенольной природы, необходимо применять

комплексную обработку с учетом сложного строения полимеров пивной дробины.

Целью работы является разработка технологических подходов глубокой переработки пивной дробины как источника вторичных сырьевых ресурсов (ВСР) для получения экстрактов, обогащенных полифенольными соединениями, и дальнейшем их применении в технологии напитков брожения.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлась влажная солодовая дробина, полученная при настойном способе производства пивоваренного суслу из светлого солода. После дополнительного промывания водой от остатков редуцирующих веществ, дробина обсушивалась фильтровальной бумагой, раскладывалась в полиэтиленовые крафт пакеты и хранилась при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильной камере. На серию экспериментов использовалась одна партия солодовой дробины с влажностью $65 \pm 1\%$.

Производство электро-химически активированной воды осуществлялось на установке «СТЭЛ-20» с производительностью 20 дм^3 воды в час.

В работе применялись ферментные препараты фирмы Novozymes (Дания), характеристики которых представлены в таблице 1.

Для решения целей исследования применялись физико-химические методы анализа:

- определение общего количества полифенолов – по методу [15];
- определение содержания антоцианогенов (МЕВАК, 2.16.2) – по методу [16];
- определение содержания β -глюкана – по методу [17];
- определение содержания летучих соединений – по методу [18];
- определение содержания аминокислот – по методу [19];
- определение содержания флавоноидов – по методу [20].

Таблица 1. Характеристики ферментных препаратов, применяемых в работе

Table 1. Enzyme preparations

Название ферментного препарата	Вискофло MG	Церемикс Плюс	Ультрафло XL
Имеющиеся активности в составе	эндо-(1,3-(4))- β -глюканаза целлюлаза α -амилаза ксилаза арабиноксидаза пентозаназа арабиназа гемицеллюлаза	эндо-(1,3-(4))- β -ксилаза эндо-(1,3-(4))- β -глюканаза протеаза нейтральная α -амилаза	эндо-(1,3-(4))- β -глюканаза ксилаза α -амилаза пентозаназа
Рекомендуемая норма задачи, г/кг	0,15	0,10	0,20

Эксперименты проводились в 3-х повторностях для получения лучшей сходимости результатов испытаний.

Результаты и их обсуждение

Поставленная цель исследований требовала решения ряда задач: для наиболее полного извлечения полифенолов пивной дробины подобрать условия ее предварительной обработки с помощью физических методов; обеспечить подбор условий для осуществления гидролиза высокомолекулярных полимеров; подобрать эффективный экстрагент и условия экстракции на конечном этапе переработки дробины.

На первом этапе осуществлялся подбор эффективного растворителя и условий экстракции. В качестве экстрагентов выступали органические полярные и неполярные растворители: мирамистин (бензилдиметил – катионное поверхностно-активное вещество со свойствами антисептика; концентрация 0,1 %), водно-этанольные растворы (полярный растворитель; концентрация 30–70 %) и водно-пропиленгликолиевые растворы (полярный растворитель; концентрация 30–70 %). Длительность экстракции на первом этапе составила 60 мин. Данные представлены в таблице 2.

Применение различных экстрагентов эффективно относительно экстракции водой, несмотря на низкие значения содержания полифенолов различных групп (табл. 2). Применение раствора мирамистина в различных концентрациях незначительно повышало выход полифенолов дробины, несмотря на его заявляемую эффективность применения [21]. Относительно полярных экстрагентов (водно-этанольные и водно-пропиленгликолиевые растворы различных концентраций) можно констатировать, что извлечение общего количества полифенолов повышается относительно извлечения водой и мирамистином с повышением температуры извлечения и концентрации основного вещества, что наглядно представлено в таблице 2. Однако антоцианогенные вещества наиболее полно извлекаются водно-пропиленгликолиевыми растворами, что связано с коэффициентом проницаемости пропиленгликолиевых растворов в растительную матрицу дробины [22, 23]. Данные таблицы 2 показали, что оптимальная температура извлечения полифенолов различных групп – 50 ± 2 °С, что подтверждается литературными данными [24].

Количественная оценка содержания полифенольных веществ показала, что оптимальным гидромодулем при экстракции полифенольных соединений дробины 70 % раствором этанол:вода

Таблица 2. Содержание полифенольных веществ в зависимости от условий экстракции

Table 2. Effect of extraction conditions on the content of polyphenolic substances

Тип экстрагента	Концентрация основного вещества в водном растворе экстрагента, %	Содержание полифенолов, %, при гидромодуле (1:10) и температуре извлечения, °С			
		25 ± 2	35 ± 2	50 ± 2	60 ± 2
Общие полифенолы					
Вода	–	0,015 ± 0,001	0,030 ± 0,003	0,060 ± 0,001	0,060 ± 0,001
Мирамистин	0,050 ± 0,010	0,015 ± 0,001	0,030 ± 0,003	0,038 ± 0,003	0,038 ± 0,003
	0,100 ± 0,020	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,041 ± 0,004
Этанол	30,000 ± 2,000	0,030 ± 0,003	0,044 ± 0,001	0,088 ± 0,008	0,250 ± 0,023
	50,000 ± 2,000	0,176 ± 0,020	0,235 ± 0,020	0,280 ± 0,020	0,325 ± 0,030
	70,000 ± 2,000	0,220 ± 0,020	0,280 ± 0,020	0,294 ± 0,020	0,368 ± 0,033
Пропиленгликоль	30,000 ± 2,000	0,060 ± 0,001	0,088 ± 0,008	0,103 ± 0,010	0,250 ± 0,023
	50,000 ± 2,000	0,103 ± 0,001	0,103 ± 0,001	0,176 ± 0,020	0,310 ± 0,028
	70,000 ± 2,000	0,176 ± 0,020	0,235 ± 0,020	0,310 ± 0,030	0,325 ± 0,030
Антоцианогены, ×10 ³					
Вода	–	н/о*	н/о	0,041 ± 0,004	0,647 ± 0,065
Мирамистин	0,050 ± 0,010	н/о	н/о	0,041 ± 0,004	0,010 ± 0,001
	0,100 ± 0,020	1,000 ± 0,100	1,000 ± 0,100	1,000 ± 0,100	1,000 ± 0,100
Этанол	30,000 ± 2,000	0,882 ± 0,090	0,882 ± 0,090	1,110 ± 0,110	1,411 ± 0,140
	50,000 ± 2,000	1,000 ± 0,100	1,110 ± 0,110	1,705 ± 0,170	1,880 ± 0,190
	70,000 ± 2,000	1,530 ± 0,150	1,550 ± 0,156	1,650 ± 0,165	2,180 ± 0,220
Пропиленгликоль	30,000 ± 2,000	2,410 ± 0,240	2,410 ± 0,240	2,600 ± 0,260	2,650 ± 0,270
	50,000 ± 2,000	2,700 ± 0,270	2,700 ± 0,270	2,820 ± 0,282	2,940 ± 0,290
	70,000 ± 2,000	3,350 ± 0,350	3,600 ± 0,360	4,760 ± 0,476	4,820 ± 0,480

н/о* – не определяется.

н/о* – not determined.

является 2:10. Это позволило на 33 % увеличить количество экстрагируемых полифенолов и в 5 раз количество извлекаемых антоцианогенов. Также исследования показали, что длительное время экстракции (более 1 ч) существенным образом не влияет на выход полифенольных веществ.

С одной стороны, обращение спиртосодержащих жидкостей на предприятиях пивобезалкогольной отрасли требует наличия лицензионного соглашения, специальных аппаратов для хранения, устройств для учета и ведения отчетности, а с другой – скопление брака пива, некондиционного пива, а также прочих отходов, связанных с невозвратными потерями продукции. С целью использования невозвратных отходов, содержащих спирт в своем составе, исследовалось влияние дистиллята пива с содержанием объемной доли этилового спирта 70 % об. на количество экстрагируемых полифенолов. Состав летучих соединений дистиллята представлен в таблице 3, количество экстрагируемых групп полифенолов – в таблице 4.

Как показывают данные таблицы 3, дистиллят пива содержит характерные летучие соединения для состава пива.

Таблица 3. Летучие соединения дистиллята пива

Table 3. Volatile compounds of beer distillate

Наименование вещества	Содержание, мг/дм ³
Высшие спирты	
метанол	29,860 ± 0,300
2-пропанол	3,120 ± 0,030
1-пропанол	130,970 ± 1,310
2-бутанол	0,320 ± 0,003
изобутанол	204,990 ± 2,050
изоамилол	851,280 ± 8,510
Карбонильные соединения	
ацетальдегид	101,150 ± 1,000
изобутиральдегид	6,040 ± 0,060
ацетон	5,440 ± 0,054
изоамилацетат	23,920 ± 0,240
фенилэтиловый спирт	16,470 ± 0,165
Эфиры	
этилацетат	239,870 ± 2,400
этилформиат	0,600 ± 0,006
этиллактат	1,540 ± 0,002

Таблица 4. Полифенольные вещества пивной дробины, извлекаемые органическими растворителями

Table 4. Polyphenolic substances of brewer's grain recovered by organic solvents

Наименование групп полифенолов	Содержание соединений, %, при экстракции		
	70 % водно-этанольным раствором	70 % об. дистиллятом пива	70 % водно-пропиленгликолиевым раствором
Общие полифенолы	0,193 ± 0,020	0,280 ± 0,030	0,187 ± 0,020
Антоцианогены, ×10 ³	4,023 ± 0,400	4,400 ± 0,440	7,530 ± 0,750

Данные таблицы 4 свидетельствуют о том, что дистиллят пива экстрагирует большее количество общих полифенолов, по сравнению с водно-этанольным раствором и водно-пропиленгликолиевым, при одной и той же концентрации основного экстрагента. Это объясняется меньшим коэффициентом полярности пивного дистиллята по отношению к водно-этанольному раствору, что увеличивает диффузию полифенолов в жидкую фазу [25]. Коэффициент полярности дистиллята снижается за счет присутствующих в его составе высших спиртов и эфиров (табл. 3), привносящих в раствор большее количество водородных связей.

Представляло интерес исследовать состав экстрактов пивной дробины, полученных с различными экстрагентами. Данные представлены в таблице 5.

Состав экстрактов пивной дробины, представленный в таблице 5, говорит о том, что 70 % об. пивной дистиллят позволяет извлечь из дробины большее, по сравнению с другими экстрагентами, количество аминокислот, в том числе незаменимых, фенольных кислот и флаваноидов в виде рутина. Кверцетин, присутствующий в составе сложных целлюлоз дробины, не извлекается простой полярной экстракцией. Содержание фенольных кислот превышает контрольное значение (при экстракции водой) на 30 % в случае галловой кислоты, а содержание синаповой кислоты увеличивается в 11 раз.

Второй этап исследования был связан с подбором условий гидролиза пивной дробины различными способами: кислотный, щелочной и ферментативный.

Гидролиз осуществлялся при гидромодуле 2:10 в течение 1 ± 0,05 ч и температуре 50 ± 2 °С. После окончания гидролиза смеси доводились до pH 7,0 ± 0,1, далее следовала экстракция 70 % об. дистиллятом пива. Содержание полифенольных соединений гидролизатов представлено в таблицах 6 и 7.

Представленные результаты исследований из таблицы 6 подтверждают литературные данные об эффективности щелочного гидролиза по сравнению с кислотным. В условиях щелочного гидролиза происходит разрыв этерифицированных полифенольных соединений пивной дробины,

Таблица 5. Содержание соединений в экстрактах дробины

Table 5. Content of compounds in extracts of brewer's spent grain

Наименование	Содержание веществ в экстрактах с			
	Вода	0,01 % раствор мирамистина	70 % об. дистиллят пива	70 % водно-пропи- ленгликолиевый раствор
Некрахмальные полисахариды (β -глюкан), мг/100 см ³	1,630 \pm 0,110	1,670 \pm 0,110	2,720 \pm 0,200	1,630 \pm 0,110
Всего аминокислот, мг/дм ³ незаменимых, в том числе	53,700 \pm 2,500	45,000 \pm 2,250	122,800 \pm 6,150	96,700 \pm 4,830
	21,500 \pm 1,070	16,900 \pm 8,450	56,100 \pm 2,850	40,600 \pm 2,050
Фенольные кислоты, мг/дм ³ : галловая	0,510 \pm 0,050	0,630 \pm 0,060	0,660 \pm 0,065	0,580 \pm 0,058
ванилиновая	н/о	0,440 \pm 0,040	1,840 \pm 0,180	1,170 \pm 0,115
сиреневая	н/о	0,260 \pm 0,025	1,160 \pm 0,110	0,340 \pm 0,0350
синаповая	0,175 \pm 0,020	0,050 \pm 0,005	2,060 \pm 0,210	1,530 \pm 0,150
Полифенолы, мг/дм ³ :				
рутин	н/о	н/о	15,000 \pm 1,500	8,550 \pm 0,850
кверцетин	н/о	н/о	н/о	н/о

Таблица 6. Содержание различных групп полифенолов в гидролизатах

Table 6. Content of various groups of polyphenols in hydrolysates

Тип гидролиза	Действующее вещество	Содержание, %
Общих полифенолов		
Без гидролиза	–	0,28 \pm 0,02
Кислотный	раствор лимонной кислоты, 1М	0,38 \pm 0,03
	раствор соляной кислоты, 1М	0,44 \pm 0,04
Щелочной	раствор гидроксида натрия, 0,8 %	0,67 \pm 0,07
	раствор гидроксида натрия 1М	1,10 \pm 0,10
Антоцианогенов, $\times 10^3$		
Без гидролиза	–	4,40 \pm 0,44
Кислотный	раствор лимонной кислоты, 1М	4,40 \pm 0,44
	раствор соляной кислоты, 1М	4,40 \pm 0,44
Щелочной	раствор гидроксида натрия, 0,8 %	4,70 \pm 0,44
	раствор гидроксида натрия, 1М	7,35 \pm 0,75

что объясняется строением предшественника дробины – ячменного зерна [10]. Лигнин, входящий в оболочку зерна, состоит из гваяцильных мономерных единиц с соотношением сирингилов и гваяцилов, связанных в структуре полимера с феруловой и п-кумаровой кислотами, причем внутримолекулярные субструктуры представлены подавляющим большинством β -О-4 ариловых эфиров и меньшинством β -5 фенилкумаранов, этерифицированных между собой [26, 27].

Результаты исследований таблицы 7 согласуются с литературными данными и свидетельствуют о глубоком гидролизе целлюлозы (лигнина) дробины, поскольку в гидролизатах присутствует большее количество (в 10 раз) синаповой и галловой (в 8 раз) кислот по сравнению с этанольными экстрактами [11]. Щелочной гидролиз позволяет извлечь кверцетин и в 3 раза большее количество рутина по сравнению с этанольными экстрактами.

Основываясь на данных таблиц 6 и 7, можно отметить, что содержание различных групп полифенолов в щелочных гидролизатах прямо пропорционально количеству растворенного действующего вещества, определяющего глубину гидролиза.

Однако, несмотря на положительные результаты исследований по применению щелочного гидролиза, важно отметить, что внешний вид, структура и консистенция полученных гидролизатов дробины без применения дополнительной обработки не могли способствовать дальнейшему ее использованию в пищевой промышленности. Щелочной гидролиз позволил высвободить из связанного состояния арабиноксиланы оболочек зерна, которые обуславливали вязкость и мутность гидролизатов дробины.

Далее было исследовано влияние ферментативного гидролиза пивной дробины на количество высвобождаемых полифенолов.

Необходимо отметить, что для облегчения доступа ферментных препаратов к некрахмальным полисахаридам пивной дробины на первом этапе применялась обработка сырья католитом с рН $9,6 \pm 0,1$, полученным в результате обработки воды на ЭХА-установке. Данные приведены на рисунке 1.

Данные исследований, отображенные на рисунке 1, свидетельствуют о том, что обработанная вода

Таблица 7. Сравнительный качественный и количественный состав полифенолов в экстрактах пивной дробины

Table 7. Comparative qualitative and quantitative composition of polyphenols in the extracts of brewer's spent grain

Наименование	Содержание после спиртовой экстракции	
	без щелочного гидролиза	с применением щелочного гидролиза
Фенольные кислоты, мг/дм ³ :		
галловая	0,660 ± 0,070	4,010 ± 0,400
ванилиновая	1,840 ± 0,200	2,160 ± 0,220
сиреневая	1,160 ± 0,120	1,150 ± 0,110
синаповая	2,060 ± 0,200	20,860 ± 2,100
Полифенолы, мг/дм ³ :		
рутин	15,000 ± 1,500	43,400 ± 4,300
кверцетин	н/о	6,710 ± 0,650

на ЭХА-установке или католит с рН $9,6 \pm 0,1$ способствует высвобождению различных связанных полифенольных веществ дробины. Наибольшая концентрация полифенолов достигается через 26–30 ч от начала выдержки дробины в католите.

Увеличение концентрации экстрагируемых полифенолов объясняется щелочной природой католита – он обладает отрицательным зарядом окислительно-восстановительного потенциала за счет накопления ионов H^+ , т. е. в среде поддерживается реакция восстановления [28]. Этерифицированные полифенольные соединения лигнина дробины взаимодействуют с ионами активированной воды с разрывом карбонильных и эфирных связей в данных условиях [29]. Соответственно, можно говорить о положительном влиянии предобработки ЭХА-водой на высокомолекулярные соединения растительной матрицы дробины, что будет способствовать лучшему контакту ферментных препаратов и субстрата.

На рисунке 2 представлена динамика накопления полифенолов в зависимости от продолжительности выдержки с католитом и ферментным препаратом Вискофло.

Полученные результаты, представленные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что оптимальные условия переработки пивной дробины достигаются при продолжительности обработки ЭХА-водой $4 \pm 0,05$ ч и продолжительности обработки препаратом Вискофло в течение $2 \pm 0,05$ ч. Более длительный гидролиз при той же продолжительности выдержки с католитом приводили к незначительным потерям содержания полифенолов в гидролизатах.

Полученные результаты исследования относительно комплексной обработки пивной дробины

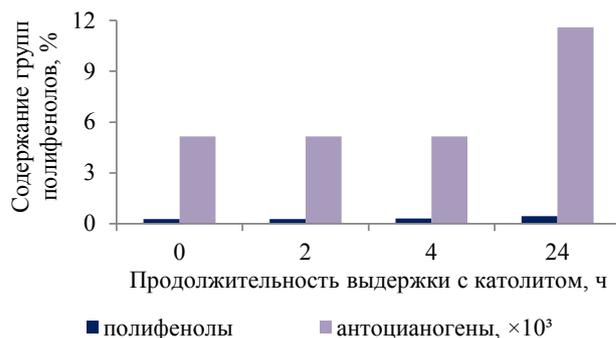


Рисунок 1. Динамика накопления в экстрактах полифенолов в зависимости от длительности обработки ЭХА-водой

Figure 1. Effect of ECA-water treatment time on the accumulation of polyphenols in extracts

показали первоочередность длительной стадии предподготовки, осуществляемой в условиях щелочного рН католита, чем более продолжительного времени биокатализа. Это, на наш взгляд, логично, поскольку длительность предподготовки цитолитических полимеров отработанного зерна влияет на доступность биополимеров ферментным препаратам, вносимым после.

Были проведены исследования, касающиеся количественного внесения ферментных препаратов к массе обрабатываемой дробины. Из трех норм задачи биокатализатора Вискофло (30, 50 и 100 % от нормы внесения, рекомендуемой производителем) наиболее целесообразным оказалось 100 % применение биокатализатора.

В дальнейшем за условия исследования действия других биокатализаторов нами были приняты условия их 100 % задачи от рекомендуемой

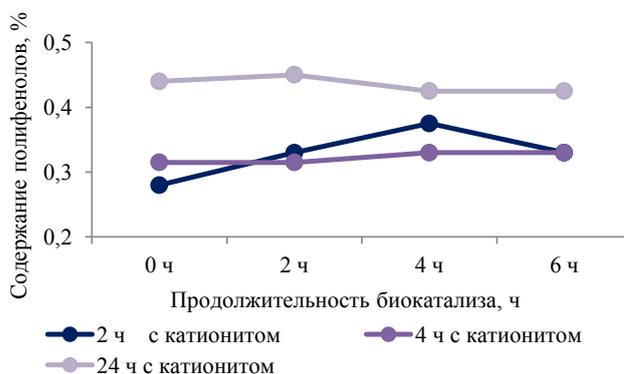


Рисунок 2. Динамика накопления полифенолов в процессе комбинированной обработки дробины ЭХА-водой и биокатализатором Вискофло

Figure 2. Accumulation of polyphenols during combined processing of brewer's spent grain with ECA-water and Viskoflo biocatalyst

Таблица 8. Содержание различных групп полифенолов в гидролизатах с различными биокатализаторами

Table 8. Effect of various biocatalysts on the content of polyphenols in hydrolysates

Продолжительность обработки биокатализатором пивной дробины, ч	Содержание, %		
	полифенолов	антоцианогенов, $\times 10^{-3}$	
Без биокатализатора	2 \pm 0,05	0,281 \pm 0,020	5,150 \pm 0,500
	4 \pm 0,05	0,281 \pm 0,020	5,150 \pm 0,500
	6 \pm 0,05	0,313 \pm 0,030	5,150 \pm 0,500
Церемикс плюс	2 \pm 0,05	0,281 \pm 0,020	5,150 \pm 0,500
	4 \pm 0,05	0,410 \pm 0,030	14,800 \pm 1,500
	6 \pm 0,05	0,410 \pm 0,030	14,800 \pm 1,500
Ультрафло XL	2 \pm 0,05	0,281 \pm 0,020	5,150 \pm 0,500
	4 \pm 0,05	0,281 \pm 0,020	5,150 \pm 0,500
	6 \pm 0,05	0,317 \pm 0,030	5,700 \pm 0,500
Вискофло MG	2 \pm 0,05	0,450 \pm 0,030	17,900 \pm 1,800
	4 \pm 0,05	0,425 \pm 0,030	11,600 \pm 1,150
	6 \pm 0,05	0,425 \pm 0,030	11,600 \pm 1,150

доли внесения. Продолжительность выдержки с католитом составила $24 \pm 0,05$ ч. Данные применения комплексной обработки дробины с участием других биокатализаторов представлены в таблице 8.

Полученные в результате исследований данные демонстрируют преимущество применения биокатализатора Вискофло перед Церемиксом и Ультрафло по содержанию полифенолов и антоцианогенов в полученных гидролизатах (табл. 8). Содержание полифенолов в случае применения Вискофло увеличилось относительно контрольного образца на 60 %, а содержание антоцианогенов – в 3,5 раза. Препарат Ультрафло не показал эффективности применения: показатели содержания полифенолов находились на уровне контрольных значений, а

препарат Церемикс позволил увеличить количество экстрагируемых полифенолов после гидролиза на 45 %, а антоцианогенов – в 2,8 раза, по сравнению с контрольным образцом, через 6 ч его применения.

Подобный эффект от применения биокатализатора Вискофло объясняется наличием в его составе эндо-(1,3-(4))- β -глюканазы, целлюлазы, ксиланазы, арабиноксидазы, пентозаназы, арабиназы и гемицеллюлазы в комплексе гидролизующих гемицеллюлозы различного строения и молекулярной массы, что приводит к высвобождению из связанного состояния полифенольных веществ [11].

Качественный и количественный состав полученных гидролизатов представлен в таблице 9.

Представленный в таблице 9 качественный и количественный состав полифенольных соединений экстрактов пивной дробины, полученных в результате различной обработки, свидетельствует о различных гидролитических процессах, проходящих в результате простой экстракции полярным растворителем, щелочного или ферментативного гидролиза в совокупности с обработкой ЭХА-водой.

В составе зерновой дробины присутствуют немодифицированная целлюлоза, воска на основе липидов, включающих в себя фенольные соединения, а также запасные белки зерна [4]. Макромолекула целлюлозы построена из микрофибрил линейных цепей целлюлозы, стабилизированных меж- и внутримолекулярными водородными связями, которые окружены арабиноксиланами. Водородные связи целлюлозы обеспечивают ее нерастворимость и устойчивость к действию биокатализаторов. Структура арабиноксилана является разветвленным полимером ксилана с замещенными арабинозными и ацетильными остатками по бокам основной ксилановой цепи [30]. Исследователи отме-

Таблица 9. Качественный и количественный состав экстрактов пивной дробины различной степени обработки

Table 9. Qualitative and quantitative composition of brewer's spent grain extracts of various processing degrees

Наименование	Содержание после экстракции дистиллятом пива при обработке		
	без гидролиза	применение щелочного гидролиза	применение комбинированной обработки ЭХА-водой и Вискофло
Фенольные кислоты, мг/дм ³ :			
галловая	0,660 \pm 0,070	4,010 \pm 0,400	0,670 \pm 0,070
ванилиновая	1,840 \pm 0,020	2,160 \pm 0,210	2,610 \pm 0,250
сиреневая	1,160 \pm 0,010	1,150 \pm 0,110	1,230 \pm 0,120
синаповая	2,060 \pm 0,200	20,860 \pm 2,100	2,390 \pm 0,240
Фенольные альдегиды, мг/дм ³ :			
сиреневый	н/о	н/о	0,400 \pm 0,040
кониферилловый	н/о	н/о	0,955 \pm 0,100
синаповый	н/о	н/о	0,863 \pm 0,100
Полифенолы, мг/дм ³ :			
рутин	15,000 \pm 1,500	43,400 \pm 4,300	32,160 \pm 3,200
кверцетин	н/о	6,71	н/о

чают, что остатки арабинозы могут быть дополнительно замещены феруловой кислотой через сложноэфирную связь и через свои димеры соединять молекулы арабиноксилана вместе, а также связывать арабиноксиланы с лигнином [31, 32]. Лигнин дробины сформирован из фенольных единиц п-кумарилового, кониферилового и синапилового спиртов, объединенные между собой в звенья с последующей полимеризацией [33].

Основываясь на вышесказанном можно сказать, что экстракция этанол-содержащими растворами позволяет выделить свободные полифенолы и прочие соединения, не затрагивая внутреннюю структуру дробины. Щелочная экстракция наибольшим образом воздействует на арабиноксиланы, разрушая их до декстринов различной молекулярной массы, о чем свидетельствовали вязкие непрозрачные гидролизаты. Также при щелочном гидролизе экстрагируются запасные белки зерна и в небольшой степени происходит высвобождение фенольных соединений из лигнина (табл. 8). Необходимо отметить, что только щелочной гидролиз привел к экстракции кверцетина. Таким образом, можно предположить, что кверцетин этерифицирован с арабиноксиланами или запасными белками дробины. Комбинированный способ переработки дробины с помощью ЭХА-воды и биокатализаторов позволил выделить низкомолекулярные фенольные кислоты и их производные, а также рутин. Гидролитический распад макромолекул полисахаридов прошел, учитывая модификацию целлюлозы посредством разрыва водородных связей, ее удерживающих, а также арабиноксиланов. Это привело к повышенной доступности высокомолекулярных полимеров для действия цитолитических ферментов.

Выводы

Рассмотрены различные способы извлечения полифенольных соединений пивной дробины, отмечены различия в механизмах гидролитического разрыва связей между молекулами некрахмальных полисахаридов и других полимеров при участии щелочного и ферментативного гидролиза. Проведенные исследования позволили подобрать оптимальные условия для глубокой физико-химической переработки дробины: продолжительность обработки католитом с pH $9,6 \pm 0,1$ составила $24 \pm 0,05$ ч, длительность биокатализа с помощью препарата Вискофло составила $2 \pm 0,05$ ч, гидромодуль – 2:1, температура процесса – 50 ± 2 °С, раствор экстрагента – дистиллят пива крепостью 70 % об.

Критерии авторства

К. В. Кобелев осуществлял общее руководство проектом исследования. М. В. Гернет осуществляла разработку макета исследований. И. Н. Грибкова обеспечивала исследовательский процесс экспериментальными данными и их обобщением.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

K.V. Kobelev supervised the project. M.V. Gernet developed the layout. I.N. Gribkova provided the research process with experimental data and their synthesis.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Bioprocessing of brewers' spent grain enhances its antioxidant activity: Characterization of phenolic compounds and bioactive peptides / M. Verni, E. Pontonio, A. Krona [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01831>.
2. Technological properties and consumer acceptability of bakery products enriched with brewers' spent grains / T. Amoriello, F. Mellara, V. Galli [et al.] // *Foods*. – 2020. – Vol. 9, № 10. <https://doi.org/10.3390/foods9101492>.
3. Brewer's spent grains – valuable beer industry by-product / M. Jackowski, L. Niedzwiecki, K. Jagiello [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 12. <https://doi.org/10.3390/biom10121669>.
4. Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain / S. Ikram, L. Huang, H. Zhang [et al.] // *Journal of Food Science*. – 2017. – Vol. 82, № 10. – P. 2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>.
5. Lynch, K. M. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health / K. M. Lynch, E. J. Steffen, E. K. Arendt // *Journal of the Institute of Brewing*. – 2016. – Vol. 122, № 4. – P. 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>.
6. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain / A. Bianco, M. Budroni, S. Zara [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, № 20. – P. 8661–8678. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>.
7. Chettrariu, A. Brewer's spent grains: Possibilities of valorization, a review / A. Chettrariu, A. Dabija // *Applied Sciences*. – 2020. – Vol. 10, № 16. <https://doi.org/10.3390/app10165619>.
8. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars / A. Paz, D. Outeiriño, N. P. Guerra [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 275. – P. 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082>.

9. Process simulation for xylitol production from brewer's spent grain in a Colombian biorefinery. Part 1: Xylose production from arabinoxylans extracted by the alkaline pretreatment of BSG / A. A. Gil-Montenegro, J. S. Arocha-Morales, L. C. Rojas-Pérez [et al.] // *Ingeniería e Investigación*. – 2019. – Vol. 39, № 1. – P. 15–23. <https://doi.org/10.15446/ing.investig.v39n1.70080>.
10. Сравнительный анализ способов гидролиза пивной дробины / В. Я. Пономарев, Э. Ш. Юнусов, Р. П. Ахметшин [и др.] // *Вестник технологического университета*. – 2016. – Т. 19, № 23. – С. 136–138.
11. Bonifacio-Lopesa, T. Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain – A review / T. Bonifacio-Lopesa, J. A. Teixeira, M. Pintado // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2020. – Vol. 60, № 16. – P. 2730–2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>.
12. Characterisation of the *in vitro* bioactive properties of alkaline and enzyme extracted brewers' spent grain protein hydrolysates / A. Connolly, M. Cermeño, D. Crowley [et al.] // *Food Research International*. – 2019. – Vol. 121. – P. 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.008>.
13. Mini-review on brewer's spent grain protein: Isolation, physicochemical properties, application of protein, and functional properties of hydrolysates / C. Wen, J. Zhang, Y. Duan [et al.] // *Journal of Food Science*. – 2019. – Vol. 84, № 12. – P. 3330–3340. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14906>.
14. Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction / S. F. Reis, E. Coelho, M. A. Coimbra [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2015. – Vol. 24. – P. 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasonch.2014.10.010>.
15. Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, first action 2017.13 / S. Kupina, C. Fields, M. C. Roman [et al.] // *Journal of AOAC International*. – 2018. – Vol. 101, № 5. – P. 1466–1472. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>.
16. Wannemacher, J. Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality / J. Wannemacher, M. Gastl, T. Becker // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*. – 2018. – Vol. 17, № 4. – P. 953–988. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>.
17. Грибкова, И. Н. Влияние некрахмальных полисахаридов ячменного пивоваренного солода на качество и безопасность пива / И. Н. Грибкова, И. В. Лазарева, Ю. А. Докучаева // *XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс*. – 2019. – Т. 8, № 1 (45). – С. 103–107.
18. Lim, H.-H. Determination of volatile organic compounds including alcohols in refill fluids and cartridges of electronic cigarettes by headspace solid-phase micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry / H.-H. Lim, H.-S. Shin // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 409, № 5. – P. 1247–1256. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0049-0>.
19. Prasad, K. HPLC analysis of amino acid and antioxidant composition of three medicinal plants of (Pithoragarh) Uttarakhand Himalayas / K. Prasad // *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research*. – 2017. – Vol. 6, № 5. – P. 186–193. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.06.00186>.
20. Comparison of common analytical methods for the quantification of total polyphenols and flavanols in fruit juices and ciders / S. Ma, C. Kim, A. P. Neilson [et al.] // *Journal of Food Science*. – 2019. – Vol. 84, № 8. – P. 2147–2158. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14713>.
21. Ломако, Е. В. Применение поверхностно-активных веществ в анализе лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды / Е. В. Ломако, Н. А. Кузмичева // *Вестник фармации*. – 2014. – Т. 65, № 3. – С. 42–49.
22. Solubility and modeling of hesperidin in cosolvent mixtures of ethanol, isopropanol, propylene glycol, and *n*-propanol + water / R. Xu, Y. Cong, M. Zheng [et al.] // *Journal of Chemical and Engineering Data*. – 2018. – Vol. 63, № 3. – P. 764–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.7b00948>.
23. Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions / O. V. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, K. Hasenkopf [et al.] // *International Journal of Cosmetic Science*. – 2013. – Vol. 35, № 5. – P. 491–501. <https://doi.org/10.1111/ics.12072>.
24. Химический состав, антиоксидантная активность, стандартизация и кинетика получения водно-пропиленгликолевых экстрактов лекарственных растений / В. А. Волков, М. В. Воронков, В. М. Мисин [и др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2020. – Т. 86, № 8. – С. 12–22. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-8-12-22>.
25. Mazur, K. Hydrogen bond dynamics in primary alcohols: A femtosecond infrared study / K. Mazur, M. Bonn, J. Hunger // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119, № 4. – P. 1558–1566. <https://doi.org/10.1021/jp509816q>.
26. Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewer's spent grain / J. Rencoret, P. Prinsen, A. Gutiérrez [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 63, № 2. – P. 603–613. <https://doi.org/10.1021/jf505808c>.
27. Structure of brewer's grain lignin and its interactions with gut microbiota *in vitro* / T. Ohra-aho, P. Niemi, A.-M. Aura [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 64, № 4. – P. 812–820. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05535>.
28. Danylkovych, A. G. Use of electrochemically activated aqueous solutions in the manufacture of fur materials / A. G. Danylkovych, V. I. Lishchuk, O. O. Romaniuk // *SpringerPlus*. – 2016. – Vol. 5, № 1. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1784-6>.

29. Electrochemical degradation of lignin by ROS / H. Jiang, A. Xue, Z. Wang [et al.] // *Sustainable Chemistry*. – 2020. – Vol. 1, № 3. – P. 345–360. <https://doi.org/10.3390/suschem1030023>.
30. Antioxidant and antimicrobial films based on brewers spent grain arabinoxylans, nanocellulose and feruloylated compounds for active packaging / C. Moreirinha, C. Vilela, N. H. C. S. Silva [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2020. – Vol. 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105836>.
31. Ou, J. Feruloylated oligosaccharides: Structure, metabolism and function / J. Ou, Z. Sun / *Journal of Functional Foods*. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.028>.
32. Ferulate and lignin cross-links increase in cell walls of wheat grain outer layers during late development / A.-L. Chateigner-Boutin, C. Lapierre, C. Alvarado [et al.] // *Plant Science*. – 2018. – Vol. 276. – P. 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.022>.
33. Lignin synthesis and accumulation in barley cultivars differing in their resistance to lodging / L. Begovića, I. Abičić, A. Lalić [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 133. – P. 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.036>.

References

1. Verni M, Pontonio E, Krona A, Jacob S, Pinto D, Rinaldi F, et al. Bioprocessing of brewers' spent grain enhances its antioxidant activity: Characterization of phenolic compounds and bioactive peptides. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01831>.
2. Amoriello T, Mellara F, Galli V, Amoriello M, Ciccoritti R. Technological properties and consumer acceptability of bakery products enriched with brewers' spent grains. *Foods*. 2020;9(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101492>.
3. Jackowski M, Niedzwiecki L, Jagiello K, Uchańska O, Trusek A. Brewer's spent grains – valuable beer industry by-product. *Biomolecules*. 2020;10(12). <https://doi.org/10.3390/biom10121669>.
4. Ikram S, Huang L, Zhang H, Wang J, Yin M. Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *Journal of Food Science*. 2017;82(10):2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>.
5. Lynch KM, Steffen EJ, Arendt EK. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*. 2016;122(4):553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>.
6. Bianco A, Budroni M, Zara S, Mannazzu I, Fancello F, Zara G. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104(20):8661–8678. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>.
7. Chetrariu A, Dabija A. Brewer's spent grains: Possibilities of valorization, a review. *Applied Sciences*. 2020;10(16). <https://doi.org/10.3390/app10165619>.
8. Paz A, Outeiriño D, Guerra NP, Domínguez JM. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. *Bioresource Technology*. 2019;275:402–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082>.
9. Gil-Montenegro AA, Arocha-Morales JS, Rojas-Pérez LC, Narváez-Rincón PC. Process simulation for xylitol production from brewer's spent grain in a Colombian biorefinery. Part 1: Xylose production from arabinoxylans extracted by the alkaline pretreatment of BSG. *Ingeniería e Investigación*. 2019;39(1):15–23. <https://doi.org/10.15446/ing.investig.v39n1.70080>.
10. Ponomarev VYa, Yunusov EhSh, Akhmetshin RR, Samigulina LR. Sravnitel'nyy analiz sposobov gidroliza pivnoy drobinny [A comparative analysis of the methods of hydrolysis of brewer's spent grain]. *Bulletin of the Technological University*. 2016;19(23):136–138. (In Russ.).
11. Bonifacio-Lopesa T, Teixeira JA, Pintado M. Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;60(16):2730–2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>.
12. Connolly A, Cermeño M, Crowley D, O'Callaghan Y, O'Brien NM, FitzGerald RJ. Characterisation of the in vitro bioactive properties of alkaline and enzyme extracted brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*. 2019;121:524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.008>.
13. Wen C, Zhang J, Duan Y, Zhang H, Ma H. Mini-review on brewer's spent grain protein: Isolation, physicochemical properties, application of protein, and functional properties of hydrolysates. *Journal of Food Science*. 2019;84(12):3330–3340. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14906>.
14. Reis SF, Coelho E, Coimbra MA, Abu-Ghannam N. Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015;24:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.010>.
15. Kupina S, Fields C, Roman MC, Brunelle SL. Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, first action 2017.13. *Journal of AOAC International*. 2018;101(5):1466–1472. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>.
16. Wannemacher J, Gastl M, Becker T. Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*. 2018;17(4):953–988. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>.

17. Gribkova IN, Lazareva IV, Dokuchaeva UA. The effect of barley malt nonstarch polysaccharides on beer quality and safety. *XXI Century: Resumes of the Past and Challenges of the Present Plus*. 2019;8(1)(45):103–107. (In Russ.).
18. Lim H-H, Shin H-S. Determination of volatile organic compounds including alcohols in refill fluids and cartridges of electronic cigarettes by headspace solid-phase micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016;409(5):1247–1256. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0049-0>.
19. Prasad K. HPLC analysis of amino acid and antioxidant composition of three medicinal plants of (Pithoragarh) Uttarakhand Himalayas. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research*. 2017;6(5):186–193. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.06.00186>.
20. Ma S, Kim C, Neilson AP, Griffin LE, Peck GM, O’Keefe SF, et al. Comparison of common analytical methods for the quantification of total polyphenols and flavanols in fruit juices and ciders. *Journal of Food Science*. 2019;84(8):2147–2158. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14713>.
21. Lomako EV, Kuzmichova NA. Application of surfactants in the analysis of medicinal vegetative raw material containing flavonoids. *Vestnik farmatsii [Pharmacy Bulletin]*. 2014;65(3):42–49. (In Russ.).
22. Xu R, Cong Y, Zheng M, Chen G, Chen J, Zhao H. Solubility and modeling of hesperidin in cosolvent mixtures of ethanol, isopropanol, propylene glycol, and *n*-propanol + water. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2018;63(3):764–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.7b00948>.
23. Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kersch M. Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013;35(5):491–501. <https://doi.org/10.1111/ics.12072>.
24. Volkov VA, Voronkov MV, Misin VM, Fedorova ES, Rodin IA, Stavrianidi AN. Chemical composition, antioxidant activity, standardization and kinetics of production of water-propylene glycol extracts of medicinal plants. *Industrial Laboratory. Diagnostics of Materials*. 2020;86(8):12–22. (In Russ.). <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-8-12-22>.
25. Mazur K, Bonn M, Hunger J. Hydrogen bond dynamics in primary alcohols: A femtosecond infrared study. *Journal of Physical Chemistry B*. 2015;119(4):1558–1566. <https://doi.org/10.1021/jp509816q>.
26. Rencoret J, Prinsen P, Gutiérrez A, Martínez AT, del Río JC. Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewer’s spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(2):603–613. <https://doi.org/10.1021/jf505808c>.
27. Ohra-aho T, Niemi P, Aura A-M, Orlandi M, Poutanen K, Buchert J, et al. Structure of brewer’s grain lignin and its interactions with gut microbiota *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(4):812–820. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05535>.
28. Danylkovych AG, Lishchuk VI, Romaniuk OO. Use of electrochemically activated aqueous solutions in the manufacture of fur materials. *SpringerPlus*. 2016;5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1784-6>.
29. Jiang H, Xue A, Wang Z, Xia R, Wang L, Tang Y, et al. Electrochemical degradation of lignin by ROS. *Sustainable Chemistry*. 2020;1(3):345–360. <https://doi.org/10.3390/suschem1030023>.
30. Moreirinha C, Vilela C, Silva NHCS, Pinto RJB, Almeida A, Rocha MAM, et al. Antioxidant and antimicrobial films based on brewers spent grain arabinoxylans, nanocellulose and feruloylated compounds for active packaging. *Food Hydrocolloids*. 2020;108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105836>.
31. Ou J, Sun Z. Feruloylated oligosaccharides: Structure, metabolism and function. *Journal of Functional Foods*. 2014;7(1):90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.028>.
32. Chateigner-Boutin A-L, Lapiere C, Alvarado C, Yoshinaga A, Barron C, Bouchet B, et al. Ferulate and lignin cross-links increase in cell walls of wheat grain outer layers during late development. *Plant Science*. 2018;276:199–207. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.022>.
33. Begovića L, Abičić I, Lalić A, Lepeduš H, Cesar V, Leljak-Levanić D. Lignin synthesis and accumulation in barley cultivars differing in their resistance to lodging. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;133:132–138. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.036>.