

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532646

(P2004-532646A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004. 10. 28)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 C 11/00

C 1 2 C 13/00

F I

C 1 2 C 11/00

C 1 2 C 13/00

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 409 頁)

(21) 出願番号	特願2003-506416 (P2003-506416)	(71) 出願人	593180468
(86) (22) 出願日	平成14年6月20日 (2002. 6. 20)		ラバット・ブルウィング・カンパニー・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月22日 (2003. 12. 22)		LABATT BREWING COMPANY LIMITED
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/000970		カナダ国オンタリオ州エヌ6エイ・4エム3、ロンドン、シンコエ・ストリート150番
(87) 国際公開番号	W02002/102961		
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002. 12. 27)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	60/299, 153		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成13年6月20日 (2001. 6. 20)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	60/299, 186	(74) 代理人	100116311
(32) 優先日	平成13年6月20日 (2001. 6. 20)		弁理士 元山 忠行
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み合わせ連続／バッチ発酵プロセス

(57) 【要約】

飲用に適したアルコール類の製造において、連続発酵段階を用いて、発酵可能な糖類を処理し、そして／あるいは主発酵させる。典型的な連続段階は、超フロック形成子酵母および厳密な酸素制御を用いたガスリフトバイオリアクターを用いることを包含する。次いで、連続段階の後で、連続プロセスからの少なくとも部分的に発酵された生成物を、仕上げるためにバッチ処理段階に送る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

飲用に適したアルコール類の製造方法において、連続発酵段階を用いて発酵可能な糖類を含む麦汁を先ず発酵させ、次いで、連続発酵プロセスからの「少なくとも部分的に発酵された」発酵物を仕上げのためのバッチ処理工程に移すことを特徴とする方法。

【請求項 2】

該飲用に適したアルコール類がビールである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ビールがペールスタイルのビールである請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

該ビールがラガーである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

該ビールが北アメリカスタイルのビールである請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

酸素供給を制限してフロック形成酵母株を用いてガスリフトバイオリアクターにおいて麦汁が少なくとも部分的に発酵される、ビールの連続発酵方法。

【請求項 7】

該発酵が主発酵である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

連続段階がガスリフトバイオリアクター中で行われる請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

該連続発酵段階が担体に固定化された酵母またはフロック形成酵母からなる群より選択されるいずれかの「固定化」細胞を用いるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

フロック形成酵母が使用のために選択される請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

主発酵の完了が該バッチホールド段階において行われるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

ダイアセチル濃度の低下が行われる請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

アセトアルデヒド濃度の低下が行われる請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

バッチホールドプロセッシング段階において高級フーゼルアルコール濃度が実質的に維持される請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

連続発酵段階からの生成物が多岐管を通して複数のバッチホールド容器に分配され、そこで該バッチホールドプロセスが行われる請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

該連続プロセスが、その後のバッチ発酵をバッチホールド段階にて開始させるためのものである請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、詳細には、連続およびバッチ発酵処理段階を含むハイブリッドプロセスを用いた飲用に適したアルコール製品、特にビールの製造に関する。

【0002】

発明の背景

この分野における最近の多数の刊行物は、固定化に関する醸造業界の関心を記載したものである。醸造業界の一般的状況に関するいくつかのレビュー (Enari, 1995; Iserentant, 1995; Masschelein, 1997; Mensour et al., 1997; Stewart, 1996; Virkajarvi & Link

10

20

30

40

50

o, 1999) において、ビール製造における固定化の可能な革新的役割が脚光を浴びている。セクション 3. 1 から 3. 5 までに述べるグループのほかに、他の多くの機関が醸造に適用される固定化細胞の研究および開発に関与している。アメリカ合衆国の Miller Brewing Company (Duncombe et al., 1996; Tata et al., 1999) は、Meura Delta テストユニットならびに Schott Engineering により流通させられている流動床バイオリアクターに関するいくつかの予備的評価を行った。Coors Brewing もまた、Meura Delta システムに関する予備実験を行った。

【0003】

Heineken と共同研究している Slovak Technical University は、ビール製造用のエアリフトシステムにおけるペクチン酸カルシウムの使用について検討した (Domeny, 1996)。より最近になって、Slovak Technical University のグループは、彼らが行っている研究に関するいくつかの論文を発表した (Smogrovicova et al., 1997; Smogrovicova & Domeny, 1999)。Guinness は、種々の吸着担体の使用およびその後の流動床バイオリアクター中での発酵について最初に調べた (Donnelly, 1998)。1999 年には、Donnelly および共同研究者は、彼らの流動床バイオリアクター内部での糖代謝のキネティクスを記載した論文を発酵した (Donnelly et al., 1999)。かれらの実験のセットアップは、上面発酵酵母用固定化担体としてシラン多孔性ガラスビーズの使用を包含する。Guinness は、セクション 2. 2. 5 に記載された Immocon Consortium の一部となっている。

【0004】

いずれもドイツの Holsten Brauerei AG および Lurgi AG は、アルコール不含ビールの連続製造のためのパイロットプラントを開発し、運転した (Dziondziak, 1995)。シングルステージループ流動床ファーマンター (130 L) 中においてアルギン酸カルシウムビーズを発酵に用い、シーブボトムカラム (7 シーブボトム) を用いてビールを脱アルコールした。このプロセスの全製造時間は 8. 5 時間であった。

【0005】

日本にある Sapporo Breweries Ltd. Brewing Research Laboratories のチームは、ビールの主発酵用流動床リアクターにおける固定化細胞の使用に関して研究した。彼らの研究は、ポリビニルアルコールゲルビーズ (Shindo & Kamimur, 1990)、C a - アルギネートゲルビーズ (Shindo et al., 1994a)、二重層ゲルファイバー (Shindo et al., 1994b) およびキトサンゲルビーズ (Shindo et al., 1994c) を固定化マトリックスとして用いることを包含していた。後者の研究において、25 体積% の Chitopearl (登録商標) タイプ II ベーズ (キトサンビーズ) を含む 1 リットルの有効体積のバイオリアクターを、グルコアミラーゼ処理された麦汁とともに連続運転した。この酵素処理は、慣用的なバッチ発酵と同様に固定化細胞システム中において酢酸エステルの生成を引き起こし、かくしてプロダクトマッチングに 1 段階近いものとなった。

【0006】

Sapporo の研究グループは、現在、繰り返しバッチモードで運転されるキトサンビーズ流動床ファーマンターの開発に力を注いでいる。該システムは大きな問題もなく 75 日間作動し、得られたビールは通常の製品と品質が同様であった。非フロック形成株はフロック形成株よりもずっと効果的であることが示された (Maeba et al., 2000; Umemoto et al., 1998)。

【0007】

ダイアセチルを減少させるための他の 2 つのアプローチは、1997 年に Maastricht で開催された EBC Congress において示された。フランスの研究者ら (Dulieu et al., 1997) は、□-アセトラクテートをアセトインに迅速に変換するために □-アセト乳酸デカルボキシラーゼの使用を提案した。Meura Delta は、アセトラクテートのアセトインへのコールドかつ直接変換のための触媒としてアルミノシリケートゼオライトの使用に関する予備的結果に脚光を浴びせた (Andries et al., 1997)。かかる処理は、有効で、消費者に受け入れられるものであり、Cultor および Alfa Laval により提案された熟成システムの低価格な代替物であり、現実味を帯びてきた。

10

20

30

40

50

【0008】

ビール製造のための固定化の分野における他の非工業的研究はSingapore Institute of Standards and Industrial Researchの研究であり、そこでは充填床リアクター中に用いられる糸状のアルギネートゲル粒子の使用について研究され、アルギネートビーズよりも好ましいことがわかった (Que, 1993)。Universidade do Minho in PortugalのMafraおよび共同研究者らは、ビールの連続的熟成のための超フロック形成酵母株の使用について議論した (Mafra et al., 1997)。これと同じ研究グループは、エタノール製造のためのエアリフトバイオリアクター中での彼らのフロック形成酵母の使用に関する研究も発表している (Vicente et al., 1999; Domingues et al., 2000)。

【0009】

種々の学術的な機関の研究者らも、最近になって、ビール製造のための固定化の利用について検討している (Argiriou et al., 1996; Bardi et al., 1996; Cashin, 1996; Moll & Duteurtre, 1996; Nedovic et al., 1996a; Nedovic et al., 1996b; Norton et al., 1995; Scott et al., 1995; Wackerbauer et al., 1996a; Wackerbauer et al., 1996b)。中国の研究グループ (Chao et al., 1990; Yuan, 1987; Zhang et al., 1988)、ロシアの研究グループ (Kolpachki et al., 1980; Sinitsyn et al., 1986) およびチェコスロバキアの研究グループ (Chladek et al., 1989; Curin et al., 1987; Polednikova et al., 1981) もまた固定化細胞法を用い、1980年代に結果を発表した。

【0010】

Numerous references were considered during the background work to the studies upon which the present invention is based. These include:

Abbott, B.J. 1978. Immobilized cells. In: *Annual Reports on Fermentation Processes*, Ed. Perlman, D., New York: Academic Press, 2: 91.

Anon. 1994. Maturex® L. *Novo Nordisk publication*. B 560c-GB.

Anon. 1996. Table Curve 2D. *User's Manual*, Jandel Scientific.

Anon. 1997. Alfa Laval Brewery Systems. *Brewers' Guardian* 126: 26.

Anon. 1998. Digox 5 Operating Manual. *Dr. Theidig publication*.

Aquilla, T. 1997. The biochemistry of yeast: debunking the myth of yeast respiration and putting oxygen in its proper place. *Brewing Techniques* 50.

Aschengreen, N.H., Jepsen, S. 1992. Use of acetolactate decarboxylase in brewing fermentations. *Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section)*, Melbourne 80.

Atkinson, B. 1986. Immobilised cells, their application and potential. In: *Process engineering aspects of immobilized cell systems*. Ed. Webb, C., Black, G.M., Atkinson, B. Manchester: Institution of Chemical Engineers 3.

Audet, P., Paquin, C., Lacroix, C. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with kappa-carrageenan - locust bean gel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 11.

10

20

30

- Austin, G.D., Watson, R.W.J., Nordstrom, P.A., D'Amore, T. 1994. An on-line capacitance biomass monitor and its correlation with viable biomass. *MBAA Technical Quarterly* 31: 85.
- Axcell, B.C., O'Connor-Cox, E.S.C. 1996. The concept of yeast vitality - an alternative approach. *Proceedings of Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Sect.)*. Singapore 24:64.
- Axelsson, A., Sisak, C., Westrin, B.A., Szajani, B. 1994. Diffusion characteristics of a swelling gel and its consequences for bioreactor performance. *The Chemical Engineering Journal* 55: B35.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Bancel, S., Hu, W. 1996. Confocal laser scanning microscopy examination of cell distribution in macroporous microcarriers. *Biotechnology Progress* 12: 398.
- Barker, M.G., Smart, K.A. 1996. Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54(2): 121.
- Bejar, P., Casas, C., Godia, F., Sola, C. 1992. The influence of physical properties on the operation of a three-phase fluidized-bed fermenter with yeast cells immobilized in calcium alginate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34: 467.
- Bickerstaff, G.F. 1997. Immobilization of enzymes and cells. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*, Ed. Bickerstaff, G. F., New Jersey, U.S.A.: Humana Press, Inc. 1.
- Birnbaum, S., Pendleton, R., Larson, P., Mosbach, K. 1981. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of living whole cells. *Biotechnology Letters* 3: 393.
- Budac, D., Margatis, A. 1999. *Personal communication*.
- Büyükgüngör, H. 1992. Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in kappa-carrageenan gels. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53: 173.
- Chahal, P.S. 1992. *Fluorosensor controlled fed-batch production of Cyclosporin-A from Beauveria nivea*. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario.
- Chisti, M.Y. 1989. *Airlift bioreactors*. London: Elsevier Applied Science.
- Chisti, Y., Moo-Young, M. 1993. Improve the performance of airlift reactors. *Chemical Engineering Progress* 6: 38.
- Cho, G.H., Choi, C.Y., Choi, Y.D., Han, M.H. 1982. Ethanol production by immobilised yeast and its carbon dioxide gas effects in a packed bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32: 959.
- Coutts, M.W. 1956. *Britain Patent No. 872,391*.
- Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H., Kahler, M. 1987. Beer production with immobilized yeast. *European Brewing Convention Congress*, Madrid 433.
- Dale, C.J., Hough, J.S., Young, T.W. 1986. Fractionation of high and low molecular weight components from wort and beer by adsorption chromatography using the gel Sephadex LH20. *Journal of the Institute of Brewing* 92(5): 457.
- Daoud, I.S., Searle, B.A. 1986. Yeast vitality and fermentation performance. *Monograph - XII European Brewery Convention - Symposium on Brewers' Yeast*, Helsinki 108.
- de Backer, L., Willaert, R.G., Baron, G.V. 1996. Modelling of immobilized bioprocesses. In: *Immobilized Living Cell Systems Modelling and Experimental Methods*, Ed. Willaert, R. G., Baron, G. V., and de Backer, L., Toronto: John Wiley and Sons. 47.

10

20

30

40

- de Beer, D., Van den Heuvel, J.C., Ottengraaf, S.P.P. 1993. Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. *Applied Environmental Microbiology* 59: 573.
- Debourg, A., Laurent, M., Goossens, E., Borremans, E., Van De Winkel, L., Masschelein, C.A. 1994. Wort aldehyde reduction potential in free and immobilized yeast systems. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52: 100.
- Dillenhofer, W., Ronn, D. 1996. Secondary fermentation of beer with immobilized yeast. *Brauwelt International* 14: 344.
- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986a. Effects of hydroxyurea on immobilized and suspended yeast fermentation rates and cell cycle operation. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1814.
- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986b. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 73.
- dos Santos, V.A.P.M., Bruijnse, M., Tramper, J., Wijffels, R.H. 1996. The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized micro-organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 447.
- Driessen, W., Habets, L., Vereijken, T. 1997. Novel anaerobic and aerobic process to meet strict effluent plant design requirements. *Proceedings of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Auckland 148.
- Dulieu, C., Boivin, P., Dautzenberg, H., Poncelet, D. 1996. Immobilized enzyme system to avoid diacetyl formation: a new tool to accelerate beer maturation. *International Workshop on Bioencapsulation*, Potsdam 22.
- Dunbar, J., Campbell, S.L., Banks, D.J., Warren, D.R. 1988. Metabolic aspects of a commercial continuous fermentation system. *Proceedings of the Convention of the Institute of Brewing*, Brisbane 151.
- Estapé, D., Gòdia, F., Solà, C. 1992. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 396.
- Evans, H.A.V., Cleary, P. 1985. Direct Measurement of Yeast and Bacterial Viability. *Journal of the Institute of Brewing* 91: 73.
- Fan, L.-S. 1989. *Gas-Liquid-Solid Fluidization Engineering*. Boston: Butterworths.
- Fernandez, E. 1996. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging. In: *Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods*. Toronto: John Wiley and Sons, Chapter 6.
- García, A.I., García, L.A., Díaz, M. 1994. Prediction of ester production in industrial beer fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 16(1): 66.
- Geankoplis, C.J. 1993. *Transport Processes and Unit Operations*. New Jersey: Prentice Hall P.T.R.
- Gee, D.A., Ramirez, W.F. 1994. A flavour model for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 321.
- Geiger, K.H., Compton, J. 1957. *Canada Patent No. 545,867*.
- Gekas, V.C. 1986. Artificial membranes as carriers for the immobilization of biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 450.
- Gift, E.A., Park, H.J., Paradis, G.A., Demain, A.L., Weaver, J.C. 1996. FACS-based isolation of slowly growing cells: double encapsulation of yeast in gel microdrops. *Nature Biotechnology* 14: 884.
- Gikas, P., Livingston, A.G. 1993. Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1337.

10

20

30

40

- Gikas, P., Livingston, A.G. 1996. Viability of immobilised cells: use of specific ATP levels and oxygen uptake rates. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 11:264.
- Gilson, C.D., Thomas, A. 1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 62: 38.
- Gòdia, F., Casa, C., Castellano, B., Solà, C. 1987. Immobilized cells: behavior of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 342.
- Gopal, C.V., Hammond, J.R.M. 1993. Application of immobilized yeasts for fermenting beer. *Brewing and Distilling International* 24: 72.
- Hannoun, B.J.M., Stephanopoulos, G. 1986. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 829.
- Hardwick, W.A. 1995. *Handbook of Brewing*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hayat, M.A. 1972. *Basic Electron Microscopy Techniques*. Toronto: van Nostrand Reinhold Co. 96.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R., Weltevrede, R., Mulder, A. 1993. Development and scale-up of an aerobic biofilm air-lift suspension reactor. *Water Science and Technology* 27: 253.
- Higbie, R. 1935. The role of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Transactions of the American Institute of Chemical Engineers* 31: 365.
- Hines, A.L., Maddox, R.N. 1985. *Mass Transfer Fundamentals and Applications*. U.S.A.: Prentice-Hall, Inc.
- Hinfray, C., Jouenne, T., Junter, G. 1994. Ethanol production from glucose by free and agar-entrapped batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* at different oxygenation levels. *Biotechnology Letters* 16: 1107.
- Hoekstra, S.F. 1975. Wort composition, a review of known and unknown facts. *Proceedings of the European Brewery Convention*, Nice 465.
- Hooijmans, C.M., Ras, C., Luyben, K.Ch.A.M. 1990. Determination of oxygen profiles in biocatalyst particles by means of a combined polarographic oxygen microsensor. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 178.
- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Young, T.W. 1982. Metabolism of wort by yeast. In: *Malting and Brewing Science Volume 2 Hopped Wort and Beer*, Ed. Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., and Young, T. W., London, U.K.: Chapman and Hall. 566.
- Hüsken, L.E., Tramper, J., Wijffels, R. 1996. Growth and eruption of gel-entrapped microcolonies. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 336.
- Hutter, K.J. 1996. Flow-cytometric analyses for assessment of fermentative ability of various yeasts. *Brauwelt International* 1: 52.
- Hwang, S.-J., Fan, L.-S. 1986. Some design consideration of a draft tube gas-liquid-solid spouted bed. *The Chemical Engineering Journal* 33: 49.
- Imai, T. 1996. Recent advances in the determination of yeast vitality. *Proceedings of the Congress of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Singapore 24: 60.
- Inloes, D.S., Taylor, D.P., Cohen, S.N., Michaels, A.S., Robertson, C.R. 1983. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 264.
- Inoue, T. 1987. Possibilities opened by "new biotechnology" and application of immobilized yeast to beer brewing. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewery Co., Ltd.* 7.

10

20

30

40

Inoue, T. 1992. A review of diacetyl control technology. *Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section)*, Melbourne 76.

Jepsen, S. 1993. Using ALDC to speed up fermentation. *Brewers' Guardian*, 55.

Jones, M., Pierce, J.S. 1964. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing* 70: 307.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1984. A review of yeast ionic nutrition – Part I: growth and fermentation requirements. *Process Biochemistry* 19(2): 48.

Jones, R.P., Pamment, N., Greenfield, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeast – the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry* 16(3): 42.

Kara, B.V., David, I., Searle, B.A. 1987. Assessment of yeast quality. *Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention*, Madrid, 21: 409.

Karamanev, D.G. 1991. Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 10: 51.

Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science* 40: 1321.

Kasten, F.H. 1993. Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications. In: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Ed. Mason, W. T. London, U.K.: Academic Press Limited 12.

Klopper, W.J. 1974. Wort composition, a survey. *European Brewery Convention Monograph 1. Wort Symposium*, Zeist 8.

Korgel, B.A., Rotem, A., Monbouquette, H.G. 1992. Effective diffusivity of galactose in calcium alginate gels containing immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Progress* 8: 111.

Kreger-Van Rij, N. 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Kronlöf, J., Virkajärvi, I. 1996. Main fermentation with immobilized yeast - pilot scale. *Proceedings of the European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 94.

Kunze, W. 1996. *Technology Brewing and Malting*. Berlin: VLB.

Kuriyama, H., Ishibashi, H., Umeda, I.M.T., Kobayashi, H. 1993. Control of yeast flocculation activity in continuous ethanol fermentation. *Journal of Chemical Engineering Japan* 26(4): 429.

Kurosawa, H., Matsamura, M., Tanaka, H. 1989. Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 926.

Kurosawa, H., Tanaka, H. 1990. Advances in immobilized cell culture: development of a co-immobilized mixed culture system of aerobic and anaerobic micro-organisms. *Process Biochemistry International* 25: 189.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study, Fourth Edition*. Amsterdam: Elsevier 361.

Kyung, K.H., Gerhardt, P. 1984. Continuous production of ethanol by yeast "immobilized" in a membrane-contained fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 252.

Lee, S.S., Robinson, F.M., Wang, H.Y. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 11*, Gatlingburg, USA 641.

Lentini, A. 1993. A review of the various methods available for monitoring the physiological status of yeast: yeast viability and vitality. *Ferment* 6: 321.

10

20

30

40

- Lentini, A., Takis, S., Hawthorne, D.B., Kavanagh, T.E. 1994. The influence of trub on fermentation and flavour development. *Proceedings of the 23rd Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Sydney 89.
- Leudeking, R. 1967. Fermentation process kinetics. In: *Biochemical and Biological Engineering*, Ed. Blakebrough, N., London: Academic Press, Inc. 203.
- Leudeking, R., Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1: 393.
- Lewandowski, Z., Altobelli, A., Fukushima, E. 1993. NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnology Progress* 9: 40.
- Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S. 1995. Experimental and conceptual studies on mass transport in biofilms. *Water Science Technology* 31: 153.
- Lewis, M., Young, T. 1995. *Brewing*. London: Chapman and Hall.
- Li, J., Humphrey, A.E. 1991. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 1043.
- Lim, H.-S., Han, B.-K., Kim, J.-H., Peshwa, M.V., Hu, W.-S. 1992. Spatial distribution of mammalian cells grown on macroporous microcarriers with improved attachment kinetics. *Biotechnology Progress* 8: 486.
- Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N. 1996. Effect of flocculation characteristics on immobilized yeast performance. *European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 102.
- Lloyd, D., Moran, C.A., Suller, M.T.E., Dinsdale, M.G. 1996. Flow cytometric monitoring of rhodamine 123 and a cyanine dye uptake by yeast during cider fermentation. *Journal of Institute of Brewing* 102: 251.
- Lundberg, P., Kuchel, P.W. 1997. Diffusion of solutes in agarose and alginate gels: ^1H and ^{23}Na PFGSE and ^{23}Na TQF NMR studies. *Magnetic Resonance in Medicine* 37: 44.
- Margaritis, A., te Bokkel, D.W., El Kashab, M. 1987. Repeated batch fermentation of ethanol using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a fluidized bioreactor system. In: *Biological Research on Industrial Yeasts*, Ed. Stewart, G.G., Russell, I., Klein, R.D., Hiebsch, R.R., Boca Raton: CRC Press 121.
- Margaritis, A., Wallace, J.B. 1982. The use of immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in a novel fluidized bioreactor to produce ethanol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 147.
- Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978a. The rotorfermentor. Part I: description of the apparatus, power requirements, and mass transfer characteristics. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 709.
- Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978b. The rotorfermentor. Part II: application to ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 727.
- Marrs, W.M. 1998. The stability of carrageenans to processing. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry* 9, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 218: 345.
- Martens, F.B., Egberts, G.T.C., Kempers, J., Robles de Medina, M.H.L., Welton, H.G. 1986. *European Brewing Convention Monograph XII, Symposium on Brewing Yeast*, Helsinki 339.
- Masschelein, C.A. 1990. Yeast metabolism and beer flavour. *Proceedings of the Third Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling* 103.
- Masschelein, C.A., Carlier, A., Ramos-Jeunehomme, C., Abe, I. 1985. The effect of immobilization on yeast physiology and beer quality in continuous and discontinuous systems. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress*, Helsinki 339.

10

20

30

40

- Masschelein, C.A., Ramos-Jeunehomme, C. 1985. The potential of alginate immobilized yeast in brewery fermentations. *Institute of Brewing Central and Southern African Section Proceedings of the 1st Scientific and Technical Convention*, Johannesburg 392.
- Masschelein, C.A., Vandenbussche, J. 1999. Current outlook and future perspectives for immobilized yeast technology in the brewing industry. *Brewers' Guardian* 28(4): 35.
- Masters, B.R., Thae, A.A. 1994. Real-time scanning slit confocal microscopy of the *in vivo* human cornea. *Applied Optics* 33: 695.
- Meilgaard, M. 1982. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition, *Brygmesteren* 5.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1996. Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 661.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 363.
- Merchant, F.J.A. 1986. *Diffusivity Characteristics of Glucose in Alginate Immobilization Matrices*. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario.
- Merchant, F.J.A., Margaritis, A., Wallace, J.B. 1987. A novel technique for measuring solute diffusivities in entrapment matrices used in immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 30: 936.
- Mochaba, F.M. 1997. A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 99.
- Mochaba, F., O'Connor-Cox, E.S.C., Axcell, B.C. 1998. Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(1): 1.
- Muhr, A.H., Blanshard, J.M.V. 1982. Diffusion in gels. *Polymer* 23: 1012.
- Mulder, M.H.V., Smolders, C.A. 1986. Continuous ethanol production controlled by membrane processes. *Process Biochemistry* 21: 35.
- Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A., Mitsui, S. 1993. Beer brewing using an immobilized yeast bioreactor system. *Bioprocess Technology* 16: 275.
- Nakanishi, K., Onaka, T., Inoue, T. 1986. A new immobilized yeast reactor system for rapid production of beer. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewing Company* 13.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984a. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (I) formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(2): 73.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984b. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (II) theoretical aspect for the formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(4): 175.
- Nakatani, K., Fukui, N., Nagami, K., Nishigaki, M. 1991. Kinetic analysis of ester formation during beer fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49(4): 152.
- Narziß, L., Miedaner, H., Graf, P., Eichhorn, P., Lustig, S. 1993. Technological approach to improve flavour stability. *MBAA Technical Quarterly* 30: 48.
- Nava Saucedo, J.E., Roisin, C., Barbotin, J.-N. 1996. Complexity and heterogeneity of microenvironments in immobilized systems. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 39.

10

20

30

40

- Nedovic, A.N., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I., Cutkovic, M. 1996. A study on considerably accelerated fermentation of beer using an airlift bioreactor with calcium alginate entrapped yeast cells. *Fifth World Congress of Chemical Engineering* 2: 474.
- Neufeld, R. J., Poncelet, D.J., Norton, S.D. 1996. *Application for Canadian Patent No. 2133789*.
- Norton, S., D'Amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 365.
- Norton, S., Watson, K., D'Amore, T. 1995. Ethanol tolerance of immobilized brewer's yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 18.
- O'Connor-Cox, E., Mochaba, F.M., Lodolo, E.J., Majara, M., Axcell, B. 1997. Methylene blue staining: use at your own risk. *MBAA Technical Quarterly* 34(1): 306.
- O'Reilly, A.M., Scott, J.A. 1995. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 636.
- Okazaki, M., Hamada, T., Fujii, H., Mizobe, A., Matsuzawa, S. 1995. Development of poly(vinyl alcohol) hydrogel for waste water cleaning. I. Study of poly(vinyl alcohol) gel as a carrier for immobilizing organisms. *Journal of Applied Polymer Science* 58: 2235.
- Oldshue, J.Y., Herbst, N.R. 1992. *A Guide to Fluid Mixing*. New York: Lightnin.
- Opekarova, M., Sigler, K. 1982. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast). *Folia Microbiologica* 27: 395.
- Øyaas, J., Storro, I., Svendsen, H., Levine, D.W. 1995. The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 47: 492.
- Paiva, T.C.B., Sato, S., Visconti, A.E.S., Castro, L.A.B. 1996. Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58(0): 55.
- Pajunen, E., Makinen, V., Gisler, R. 1987. *Secondary fermentation with immobilized yeast*. *European Brewery Convention Congress*, Madrid 441.
- Parascandola, P., de Alteriis, E. 1996. Pattern of growth and respiratory activity of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) cells growing entrapped in an insolubilized gelatin gel. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23: 7.
- Perry, R.H., Green, D.W. 1984. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. 1998a. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology* 18(2 & 3): 237.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I. 1998b. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 104: 19.
- Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I., Russell, I. 1999. Kappa-carrageenan gel immobilization of lager brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 105(6): 398.
- Polson, A. 1950. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *Journal of Physical and Colloidal Chemistry* 54: 649.
- Power, D.A., McCuen, P.J. 1988. *Manual of BBL® Products and Laboratory Procedures, Sixth Edition*. Maryland: Becton Dickinson Microbiology Systems 249.
- Priest, F.G., Campbell, I. 1996. *Brewing Microbiology 2nd Ed.*, UK: Chapman and Hall.

10

20

30

40

- Rees, D.A. 1972. Polysaccharide gels: a molecular view. *Chemistry and Industry* 19: 630.
- Roca, E., Camesselle, C., Nunez, M. 1995. Continuous ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilised in Ca-alginate beads hardened with Al^{3+} . *Biotechnology Letters* 9: 815.
- Roukas, T. 1994. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59: 387.
- Russell, I., Stewart, G.G. 1992. Contribution of yeast and immobilization technology to flavour development in fermented beverages. *Food Technology* 148.
- Ryder, D.S. 1985. The growth process of brewing yeast and the biotechnological challenge. *MBAA Technical Quarterly* 22: 124.
- Ryu, D.D., Kim, Y.J., Kim, J.H. 1984. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 12.
- Salmon, P.M., Robertson, C.R. 1987. Mass transfer limitations in gel beads containing growing immobilized cells. *Journal of Theoretical Biology* 125: 325.
- Schumpe, A., Quicker, G., Deckwer, W.-D. 1982. Gas solubilities in microbial culture media. *Advances in Biochemical Engineering* 24: 1.
- Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. 1994. Suppression of alpha-acetolactate formation in brewing with immobilized yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 69.
- Smart, K.A. 1995. The importance of the brewing yeast cell wall. *Brewers' Guardian* 124(4): 44.
- Smart, K.A. 1999. Ageing in brewing yeast. *Brewers' Guardian* 19.
- Smart, K.A., Chambers, K.M., Lambert, I., Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57(1):18.
- Sharpe, F.R. 1988. Assessment and control of beer flavour. *Journal of the Institute of Brewing* 95: 301.
- Stewart, G.G. 1977. Fermentation – yesterday, today and tomorrow. *MBAA Technical Quarterly* 14: 1.
- Stewart, G.G., Russell, I. 1986. The relevance of the flocculation properties of yeast in today's brewing industry. *European Brewery Convention Symposium on Brewers' Yeast*, Helsinki 53.
- Stewart, G.G., Lyness, A., Younis, O. 1999. The control of ester synthesis during wort fermentation. *MBAA Technical Quarterly* 36(1): 61.
- Takahashi, S. and Kimura, Y. 1996. Effect of main fermentation parameters on stale flavour. *Brauwelt International* 14 (3): 253.
- Taylor, D.G. 1989. Influence of brewhouse practice on wort composition. *Brewer's Guardian* 118(2): 30.
- Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (ASBC). 1992. *Methods of Analysis*. 8th Edition. Minnesota: ASBC.
- Uttamlal, M., Walt, D.R. 1995. A fiber-optic carbon dioxide sensor for fermentation monitoring. *Biotechnology* 13: 597.
- Venâncio, A., Teixeira, J.A. 1997. Characterization of sugar diffusion coefficients in alginate membranes. *Biotechnology Techniques* 11: 183.
- Vilachá, C., Uhlig, K. 1985. The measurement of low levels of oxygen in bottled beer. *Brauwelt International* 70.
- Virkajärvi, I., Kronlöf, J. 1998. Long-term stability of immobilized yeast columns in primary fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(2): 70.

10

20

30

40

- Vives, C., Casas, C., Gòdia, F., Solà, C. 1993. Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in calcium alginate beads and observation on their growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 467.
- Wada, M., Kato, J., Chibata, I. 1979. A new immobilization of microbial cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 8: 241.
- Wang, H.Y., Lee, S.S., Takach, Y., Cawthon, L. 1982. Maximizing microbial cell loading in immobilized-cell systems. *Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 12* 139.
- Westrin, B.A., Axelsson, A. 1991. Diffusion in gels containing immobilized cells: a critical review. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 439.
- Wheatcroft, R., Lim, Y.M., Hawthorne, D.B., Clarke, B.J., Kavanagh, T.E. 1988. An assessment of the use of specific oxygen uptake measurements to predict the fermentation performance of brewing yeasts. *The Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section) Proceedings of the Twentieth Convention*, Brisbane 193.
- White, F.H., Portno, A.D. 1978. Continuous fermentation by immobilized brewers yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 84: 228.
- Wijffels, R.H., de Gooijer, C.D., Schepers, A.W., Tramper, J. 1996. Immobilized-cell growth: diffusion limitation in expanding micro-colonies. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 249.
- Wijffels, R.H., Englund, G., Hunik, J.H., Leenen, J.T.M., Bakketun, A. et al. 1995. Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying microorganisms at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* 45: 1.
- Aivasidis, A., 1996. Another Look at Immobilized Yeast Systems. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 27.
- Aivasidis, A., Wandrey, C., Eils, H.-G. & Katzke, M., 1991. Continuous Fermentation of Alcohol-Free Beer with Immobilized Yeast in Fluidized Bed Reactors. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Lisbon*, 1991, 569.
- Akiyama-Jibiki, M., Ishibiki, T., Yamashita, H. & Eto, M., 1997. A Rapid and Simple Assay to Measure Flocculation in Brewer's Yeast. *Master Brewers of the Americas Technical Quarterly*, 34, 278.
- Alfa Laval Brewery Systems, 1997. Immobilized Yeast System Reduces Maturation Time. *Brewers' Guardian*, 126, 26.
- Alfa Laval Brewery Systems, 1996. *Continuous Maturation of Beer with Immobilized Yeast*, Company Report.
- Al Taweel, A.M. & Walker, L.D., 1983. Liquid Dispersion in Static In-line Mixers. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 61, 527.
- Andries, M., Derdelinckx, G., Ione, K.G., Delvaux, F., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1997a. Zeolites as Catalysts for the Cold and Direct Conversion of Acetolactate into Acetoin. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 48.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1995. Design of a Multi-Purpose Immobilized Yeast Bioreactor System for Application in the Brewing Process. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 134.

10

20

30

40

- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1996a. Design and Application of an Immobilized Loop Bioreactor for Continuous Beer Fermentation. in *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, eds.) Amsterdam: Elsevier Science, 672.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Massschlein, C.A., 1996b. Design and Applications of an Immobilized Loop Bioreactor to the Continuous Fermentation of Beer. *Proceedings of the 6th International Brewing Technology Conference*, Harrogate, 380.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Massschlein, C.A., 1997b. Practical Results Using the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentation System. *Brewers' Guardian*, 26.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Massschlein, C.A., 1997c. First Results on Semi-Industrial Continuous Fermentation with the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 34, 119.
- Argiriou, T., Kanellaki, M., Voliotis, S. & Koutinas, A.A., 1996. Kissiris-Supported Yeast Cells: High Biocatalytic Stability and Productivity Improvement by Successive Preservatives at 0 °C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 4028.
- Audet, P. & Lacroix, C., 1989. Two Phase Dispersion Process for the Production of Biopolymer Gel Beads: Effects of Barious Parameters on Bead Size and their Distribution. *Process Biochemistry*, 24, 217.
- Axelsson, A. & Persson, B., 1988. Determination of Effective Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Plates with Varying Yeast Cell Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 18, 231.
- Bardi, E.P., Koutinas, A.A., Soupioni, M.J. & Kanellaki, M.E., 1996. Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperature Brewing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 463.
- Berkman, P. D. & Calabrese, R. V., 1988. Dispersion of Viscous Liquids by Turbulent Flow in a Static Mixer. *American Institute of Chemical Engineering Journal*. 34, 602.
- Borremans, E., 1997. Secondary Fermentation of Beer with Immobilized Yeast. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 33.
- Bower, J.L. & Christensen, C.M., 1995. Disruptive Technologies: Catching the Wave. *Harvard Business Review*, 73, 43.
- Breitenbücher, K. & Mistler, M., 1995. Fluidized Bed Fermenters for the Continuous Production of Non-Alcoholic Beer with Open-Pore Sintered Glass Carriers. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 77.
- Brewers Association of Canada, 1988. *About Beer And The Brewing Industry*, Ottawa, Ontario.
- Broderick, Harold M., 1979. *The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry*, 2nd Ed. Impressions Inc., Wisconsin.
- Burns, J.A., 1937. *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 31.
- Calleja, G.B. & Johnson, B.F., 1977. A Comparison of Quantitative Methods for Measuring Yeast Flocculation. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 68.
- Carberry, J.J., 1976. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*, McGraw-Hill.
- Carberry, J.J. & Varma, A., 1987. *Chemical Reaction and Reactor Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Cashin, M.-M., 1996. Comparative Studies of Five Porous Supports for Yeast Immobilization by Adsorption/Attachment. *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 5.

10

20

30

40

- Champagne, C.P., 1994. Overview: Immobilized Cell Technology in Food Processing. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 33.
- Chang, C.M., Lu, W.J., Own, K.S. & Hwang, S.J., 1994. Comparison of Airlift and Stirred Tank Reactors for Immobilized Enzyme Reactions. *Process Biochemistry*, 29, 133.
- Chao, X., Ye, G. & Shi, S., 1990. Kinetic Study of the Continuous Fermentative Process of Green Beer Production with Immobilized Yeast. *Huagong Jixie*, 17, 18.
- Chibata, I., 1979. Immobilized Microbial cells with Polyacrylamide Gel and Carrageenan and their Industrial Applications. *American Chemical Society Series*, 106, 187.
- Chisti, M.Y., 1991. *Airlift Bioreactors*, Elsevier Applied Science, New York.
- Chisti, Y. & Moo-Young, M., 1993. Improve the Performance of Airlift Reactors. *Chemical Engineering Progress*, 6, 38.
- Chladek, L., Voborsky, J., Sima, J. & Hosek, Z., 1989. *Prumysl Potravin*, 40, 590.
- Coe, H.S. & Clevenger, G.H., 1916. Methods for Determining the Capacities of Slime Thickening Tanks. *Transcript of the American Institute of Mechanical Engineering*, 55, 356.
- Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1987. Beer Production with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention, Madrid*, 433.
- Decamps, C. & Norton, S., 1994. New Emulsion Process using Static Mixer for the Production of □-Carrageenan Gel Beads. *Labatt Breweries of Canada Internal Report*.
- Del Pozo, M., Briens, C.L. & Wild, G., 1994. Effect of Liquid Coalescing Properties on Mass Transfer, Heat Transfer and Hydrodynamics in a Three-Phase Fluidized Bed. *The Chemical Engineering Journal*, 55, 1.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996a. Alfa Laval/Schott System of Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *Brewing & Distilling International*, 27, 35.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996b. Secondary Fermentation of Beer With Immobilized Yeast. *Brauwelt International*, 14, 344.
- Dillenhoffer, W. & Ronn, D., 1996c. Continuous Maturation of Beer. *Beverage World International*, 34.
- Domeny, Z., Smogrovicova, D., Gemeiner, P., Malovikova, A. & Sturdik, E., 1996. Calcium Pectate Gel to Immobilize Yeast for Continuous Beer Production. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group V, Potsdam, Germany*, Poster 12.
- Domingues, L., Lima, N. & Teixeira, J.A., 2000. Contamination of a High-Cell-Density Continuous Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 584.
- Donnelly, D., 1998. Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Annual Convention*, Minneapolis, Poster 8.
- Donnelly, D., Bergin, J., Gardiner, S. & Cahill, G., 1998. Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 183.
- Dulieu, C., Boivin, P., Malanda, M., Dautzenberg, H. & Poncelet, D., 1997. Encapsulation of α-Acetolactate Decarboxylase to Avoid Diacetyl Formation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 44.
- Duncombe, D., Bower, P., Bromberg, S., Fehring, J., Lau, V. & Tata, M., 1996. The Contribution of Free Cells in an Immobilized Yeast System. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Poster Presentation.

10

20

30

40

- Dziondziak, K. & Seiffert, T., 1995. Process for the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 301.
- Enari, T.-M., 1995. State of the Art of Brewing Research. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 1.
- Fix, G., 1989. Principles of Brewing Science. Brewers Publications, USA.
- Fouhy, K. & Parkinson, G., 1996. Brewers Break with Tradition. *Chemical Engineering*, 103, 45.
- Gil, G.H., 1991. Continuous Ethanol Production in a Two-Stage, Immobilized and Suspended Cell Bioreactor (Alcohol Dehydrogenase). *Ph.D. Thesis*, Georgia Institute of Technology.
- Gilliland, R.B., 1951. The Flocculation Characteristics of Brewing Yeasts During Fermentation. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 8, 35.
- Groboillot, A., D.K. Boadi, D. Poncelet & Neufeld, R.J., 1994. Immobilization of Cells for Application in the Food Industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 75.
- Haikara, A., Virkajarvi, I., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Microbial Contaminations in Immobilized Yeast Bioreactors for Primary Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 439.
- Heggart, H.M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R.J., Dowhanick, T.M. & Russell, I., 1999. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 383.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W. & Hoeks, F., 1989. Review on the Application of Anaerobic Fluidized Bed Reactors in Waste-Water Treatment. *The Chemical Engineering Journal*, 41, B 37.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Weltevrede, R., Hols, J. & van Leeuwen, H.L.J.M., 1991. Large Scale Anaerobic-Aerobic Treatment of Complex Industrial Waste-Water Using Biofilm Reactors. *Water Science Technology*, 23, 1427.
- Heijnen, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R.W.R. & Mulder, A., 1993. Development and Scale-Up of an Aerobic Biofilm Air-Lift Suspension Reactor. *Water Science Technology*, 27, 253.
- Helm, E., Nohr, B. & Thorne, R.S.W., 1953. The Measurement of Yeast Flocculence and its Significance in Brewing. *Wallerstein Laboratories Communications*, 16, 315.
- Horitsu, H., Wang, M.Y. & Kawai, K., 1991. A Modified Process for Soy Sauce Fermentation by Immobilized Yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 269.
- Hryclik, Kevin, Gerry Ginter, Jim Helmke, & Jim Spiers, 1987. *The How's And Why's of Brewing*, Revision #2, LBOC.
- Hunik, J.H., Tramper, J. & Wijffels, R.H., 1994. A Strategy to Scale Up Nitrification Processes with Immobilized Cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering*, 11, 73.
- Hwang, S.-J. & Fan, L.-S., 1986. Some Design Considerations of a Draft Tube Gas-Liquid-Solid Spouted Bed. *The Chemical Engineering Journal*, 33, 49.
- Hyttinen, I., Kronlof, J. & Hartwall, P., 1995. Use of Porous Glass at Hartwall Brewery in the Maturation of Beer with Immobilized Yeast. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry*, Espoo, Finland, 55.
- Ibrahim, Y.A.A., Briens, C.L., Margaritis, A. & Bergounou, M.A., 1996. Hydrodynamic Characteristics of a Three-Phase Inverse Fluidized Bed Column. *Journal of the American Institute of Chemical Engineering*, 42, 1889.

10

20

30

40

- Inoue, T., 1995. Development of a Two-Stage Immobilized Yeast Fermentation System for Continuous Beer Brewing. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 25.
- Iserentant, D., 1995. Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. *Fermented Beverage Production*. (A.G.H. Lea & J.R. Piggott, eds.) London: Chapman & Hall, 45.
- Kaplan, R.S. & Norton, D.P., 1996. The Balanced Scorecard. *President and Fellows of Harvard College, Harvard Business School Press*, Massachusetts, USA.
- Karamanev, D.G., Nagamune, T. & Endo, I., 1992. Hydrodynamic and Mass Transfer Study of a Gas-Liquid-Solid Draft Tube Spouted Bed Bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 47, 3581.
- Karel, S.F., Libicki, S.B. & Robertson, C.R., 1985. The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. *Chemical Engineering Science*, 40, 1321. 10
- Katzbauer, B., Narodoslawsky, M. & Moser, A., 1995. Classification System for Immobilization Techniques. *Bioprocess Engineering*, 12, 173.
- Kennard, M. & Janekeh, M., 1991. Two- and Three-Phase Mixing in a Concentric Draft Tube Gas-Lift Fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1261.
- Kolot, F.B., 1988. *Immobilized Microbial Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications*. Robert E. Krieger Publishing Company, Florida.
- Kolpachki, A.P., Isaeva, V.S., Kazantsev, E.N. & Fertman, G.I., 1980. Intensification of Wort Fermentation with Immobilized Yeasts. *Fermentnaya i Spirtovaya Promyshlennost*, 9. 20
- Krikilion, Ph., Andries, M., Goffin, O., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Optimal Matrix and Reactor Design for High Gravity Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 419.
- Kronlof, J., 1994. Immobilized Yeast in Continuous Fermentation of Beer. Ph.D. Thesis, VTT Publications, 167.
- Kronlof, J., Linko, M. & Pajunen, E., 1995. Primary Fermentation with a Two-Stage Packed Bed System Pilot Scale Experiences. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 118.
- Kronlof, J. & Virkajarvi, I., 1996. Main Fermentation with Immobilized Yeast – Pilot Scale *European Brewery Convention Brewing Science Group Bulletin, Zoeterwoude*, 94. 30
- Kronlof, J., Virkajarvi, I., Storgards, E.L., Londesborough, J. & Dymond, G., 2000. Combined Primary and Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *World Brewing Congress*, Poster #56.
- Ku, W.Y., 1982. Fermentation Kinetics for the Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells (Biomass). *Ph.D. Thesis*, The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Kunze, W., 1999. *Technology Brewing and Malting*. VLB Berlin, Germany.
- Kynch, G.J., 1952. *Transcripts of the Faraday Society*, 48, 166.
- Lacroix, C., Paquin, C. & Arnaud, J.P., 1990. Batch Fermentation with Entrapped Growing Cells of *Lactobacillus casei*: Optimization of the Rheological Properties of the Entrapment Gel Matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 403. 40
- Levenspiel, O., 1972. *Chemical Reaction Engineering*. John Wiley & Sons, New York.

- Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N., Lindborg, K., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Main Fermentation with Immobilized Yeast – A Breakthrough?. *Proceedings of the European Brewery Convention, Maastricht*, 385.
- Livingston, A.G. & Chase, H.A., 1990. Liquid-Solid Mass Transfer in a Three Phase Draft Tube Fluidized Bed Reactor. *Chemical Engineering Communications*, 92, 225.
- Livingston, A.G. & Zhang, S.F., 1993. Hydrodynamic Behaviour of Three-Phase (Gas-Liquid-Solid) Airlift Reactors. *Chemical Engineering Science*, 48, 1641.
- Lommi, H., 1990. Immobilized Yeast for Maturation and Alcohol-Free Beer. *Brewing and Distilling International*, 21, 23.
- Lommi, H., Gronqvist, A., & Pajunen, E., 1990. Immobilized Yeast Reactor Speeds Beer Production. *Food Technology*, 5, 128. 10
- Lorenzen, K., 1996. Immobilized Yeast Plants for Alcohol-Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.
- Maeba, H., Umemoto, S., Sato, M. & Shinotsuka, K., 2000. Primary Fermentation with Yeast Immobilized in Porous Chitosan Beads – Pilot Scale Trial. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing – Asia Pacific Section*, 82.
- Mafra, I., Machado Cruz, J.M. & Teixeira, J.A., 1997. Beer Maturation in a Continuously Operating Bioreactor using a Flocculating Brewer's Yeast Strain. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 509.
- Maiorella, B.L., 1983. *Fermentative Ethanol Production (Alcohol, Distillation, Economics)*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley. 20
- Margaritis, A., 1975. *A Study of the Rotorfermentor and the Kinetics of Ethanol Fermentation*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982a. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part I. Use of Free Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1473.
- Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982b. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part II. Use of Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1483.
- Margaritis, A. & Merchant, F., 1984. Advances in Ethanol Production Using Immobilized Cell Systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1, 339.
- Margaritis, A. & Rowe, G.E., 1983. Ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* Immobilized in Different Carrageenan Gels. *Developments in Industrial Microbiology*, 24, 329. 30
- Margaritis, A., te Bokkel, D. & El Kashab, M., 1987. Repeated Batch Fermentation of Ethanol Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a Fluidized Bioreactor System. *Biological Research on Industrial Yeasts. Volume I*, (G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein & R.R. Hiebsch, eds.) Boca Raton: CRC Press, 121.
- Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1982. The Use of Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* in a Novel Fluidized Bioreactor to Produce Ethanol. *Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation*, Gatlinburg, Tennessee, 12, 147.
- Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1984. Novel Bioreactor Systems and their Applications. *Bio/Technology*, 2, 447. 40
- Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978a. The Rotorfermentor. Part I: Description of the Apparatus, Power Requirements, and Mass Transfer Characteristics. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 709.

- Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978b. The Rotorfermentor: Part II: Application to Ethanol Fermentation. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 727.
- Masschelein, C.A., 1997. A Realistic View on the Role of Research in the Brewing Industry Today. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 103.
- Masschelein, C.A., 1994. State-of-the-Art and Future Developments in Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 1.
- Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996a. The Meura-Delta Immobilised Yeast Fermenter for the Continuous Production of Beer. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 28.
- Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996b. Meura-Delta's Immobilized Yeast Fermenter for Continuous Beer Production. *Brewing & Distilling International*, 27, 16.
- Masschelein, C.A., Andries, M., Franken, F., Van de Winkel, L. & Van Beveren, P.C., 1995. The Membrane Loop Concept: A New Approach for Optimal Oxygen Transfer into High Cell Density Pitching Yeast Suspensions. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 377.
- Masschelein, C.A., Ryder, D.S. & Simon, J-P., 1994. Immobilized Cell Technology in Beer Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 155.
- Matsuura, K., Hirotsune, M., Nakada, F. & Hamachi, M., 1991. A Kinetic Study on Continuous Sake Fermentation. *Hakkokogaku Kaishi*, 69, 345.
- McCabe, J.T., 1999. The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry. Master Brewers Association of the Americas, USA.
- Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 363.
- Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1996. Application of Immobilized Yeast Cells in the Brewing Industry. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, eds.) Amsterdam: Elsevier Science, 661.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1995. Gas Lift Systems for Immobilized Cell Fermentation. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 125.
- Mensour, N., Margaritis, A., Russell, I., Briens, C.L., Decamps, C. & Norton, S., 1994. Beer Production with Immobilized Yeast Cells in a Pilot Plant Scale Airlift Reactor. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 49.
- Middleman, S., 1974. Drop Size Distributions Produced by Turbulent Pipe Flow of Immiscible Fluids Through a Static Mixer. *Industrial Engineering and Chemical Process Design and Development*, 13, 78.
- Mieth, H.O., 1995. Immobilized Yeast Plants for Alcohol Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 166.
- Mistler, M., Breitenbücher, K. & Jaeger, R., 1995. Continuous Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Porous Glass Carriers. *Brewers Digest*, 70, 48.
- Moll, M. & Duteurtre, B., 1996. Fermentation and Maturation of Beer with Immobilized Microorganisms. *Brauwelt International*, 3, 248.

10

20

30

40

- Motai, H., Hamada, T. & Fukushima, Y., 1993. Application of a Bioreactor System to Soy Sauce Production. in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 315.
- Muhr, A.H. & Blanchard, M.V., 1982. Diffusion in Gels. *Polymer*, **23**, 1012.
- Mwesigye, P.K. & Barford, J.P., 1994. Transport of Sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77**, 687.
- Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A. & Mitsui, S., 1993. Beer Brewing Using an Immobilized Yeast Bioreactor System. in *Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 275.
- Nakanishi, K., T. Onaka, T. Inoue & Kubo, S., 1985. A New Immobilized Yeast Reactor System for Rapid Production of Beer. *Proceedings of the 20th European Brewing Convention Congress*, Helsinki, 331.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K. & Kumada, J., 1984. Kinetic Study of Vicinal Diketones in Brewing (I) Formation of Total Vicinal Diketones. *Master Brewers Association of the Americas Technical Committee*, **21**, 73.
- Nedovic, V.A., Leskosek-Cukalovic, I. & Vunjak-Novaki, G., 1996a. Short-Time Fermentation of Beer in an Immobilization Yeast Air-Lift Bioreactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.
- Nedovic, V.A., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I. & Cufkovic, M., 1996b. A Study on Considerably Accelerated Fermentation of Beer Using an Airlift Bioreactor with Calcium Alginate Entrapped Yeast Cells. *Proceedings of the 5th World Congress of Chemical Engineering, San Diego*, 474.
- Neufeld, R.J., Norton, S. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. *Canadian Patent Application* 2,133,789.
- Nguyen, A.L. & Luong, J.H.T., 1986. Diffusion in k-Carrageenan Gel Beads. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 1261.
- Nielsen, J. & Villadsen, J., 1994. Bioreactor Modeling. *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, 9.
- Norton, S. & D'Amore, T., 1994. Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**, 365.
- Norton, S., Neufeld, R.J. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. *Canadian Patent Application* 2,133,789.
- Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Decamps, C. & Russell, I., 1994. Pilot Scale Primary Fermentation of Beer with a Gaslift Immobilized Yeast Reactor. *Proceedings of the European Brewing Convention, Sub-Committee*, Dublin.
- Norton, S., Watson, K. & D'Amore, T., 1995. Ethanol Tolerance of Immobilized Brewers' Yeast Cells. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **43**, 18.
- Nothaft, A., 1995. The Start-Up of an Immobilized Yeast System for Secondary Fermentation at Brahma. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 41.

10

20

30

40

- Nunokawa, Y. & Hirotsune, M., 1993. Production of Soft Sake by an Immobilized Yeast Reactor System. in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 235.
- Pajunen, E., 1996a. The Behaviour of Immobilized Yeast Cells. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 33.
- Pajunen, E., 1996b. Immobilized System in the Brewing Industry. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 38.
- Pajunen, E., 1995. Immobilized Yeast Lager Beer Maturation: DEAE-Cellulose at Sinebrychoff. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 24.
- Pajunen E. & Gronqvist A., 1994. Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. *Proceedings for the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 101.
- Pajunen, E., A. Gronqvist & Lommi, H., 1989. Continuous Secondary Fermentation and Maturation of Beer in an Immobilized Yeast Reactor. *MBAA Technical Quarterly*, 26, 147.
- Pajunen, E., Gronqvist, A., Simonsen, B. & Lommi, H., 1994. Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. *ALAFACE Annual Meeting, Quito*, 13.
- Pajunen, E., Ranta, B., Andersen, K., Lommi, H., Viljava, T., Bergin, J. & Guercia, H., 2000a. Novel Process for Beer Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing, Asia-Pacific Section*, 91.
- Pajunen, E., Viljava, T. & Lommi, H., 2000b. Novel Primary Fermentation with Immobilized Yeast System. *World Brewing Congress*, Oral presentation.
- Paul, F. & Vignais, P.M., 1980. Photophosphorylation in Bacterial Chromatophores Entrapped in Alginate Gel: Improvement of the Physical and Biochemical Properties of Gel Beads with Barium as Gel-Inducing Agent. *Enzyme and Microbial Technology*, 2, 281.
- Peach, M., 1996. Fermenting Faster Pints. *New Scientist*, 2058, 23.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A. & Mensour, N.A., 1998a. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18, 237.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. & Russell, I., 1998b. Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104, 19.
- Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I. & Russell, I., 1999. Kappa-Carrageenan Gel Immobilization of Lager Brewing Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 398.
- Pirt, S.J., 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific, Oxford.
- Pittner, H. & Back, W., 1995. Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 32, 163.
- Pittner, H., W. Back, W. Swinkels, E. Meersman, B. van Dieren & Lommi, H., 1993. Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol-Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress, Oslo*, 323.
- Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1981. Immobilized Brewing Yeast. *Kvasny Prumysl*, 27, 193.
- Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J. & Fournier, A., 1992. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 38, 39.

10

20

30

40

- Poncelet, D., Poncelet de Smet, B., Beaulieu, C. & Neufeld, R. J., 1993. Scale Up of Gel Bead and Microcapsule Production in Cell Immobilization. in *Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization*, Goosen, M.F.A., Ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Prakash, A., Briens, C.L. & Bergougnou, M.A., 1987. Mass Transfer Between Solid Particles and Liquid in a Three Phase Fluidized Bed. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 65, 228.
- Prasad, K.Y. & Ramanujam, T.K., 1995. Overall Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Modified Reversed Flow Jet Loop Bioreactor with Low Density Particles. *Bioprocess Engineering*, 12, 214.
- Pritchett, Price. 1993. *Culture Shift*. Texas: Pritchett & Associates, Inc.
- Que, F., 1993. Using a Thread Type of Alginate Gel Particles as Cell-Immobilised Support and Some Concept of Packed Bed Fermenter Design. *Biotechnology Techniques*, 7, 755.
- Rajotte, P., 1998. Continuous Fermentation with Immobilized Yeast Cells. *American Brewer*, 76, 42.
- Rajotte, P., 1997. Jumping into the Next Millenium Canadian Style. *American Brewer*, 75, 42.
- Russell, I., Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A. & Briens, C., 1995. Immobilized Yeast Cells: Applications for Brewing. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 159.
- Ryder, D.S. & Masschelein, C.A., 1985. The Growth Process of Brewing Yeast and the Biotechnological Challenge. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43, 66.
- Satterfield, C.N., 1970. *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysts*, MIT Press, Cambridge.
- Scott, J.A., O'Reilly, A.M. & Kirkhope, S., 1995. A Fibrous Sponge Matrix to Immobilized Yeast for Beverage Fermentations. *Biotechnology Techniques*, 9, 305.
- Shindo, S. & Kamimur, M., 1990. Immobilization of Yeast with Hollow PVA Gel Beads. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 232.
- Shindo, S., Sahara, H. & Koshino, S., 1994a. Suppression of α -Acetolactate Formation in Brewing with Immobilized Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 100, 69.
- Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. & Tanaka, H., 1993. Control of Diacetyl Precursor [α -acetolactate] Formation During Alcohol Fermentation with Yeast Cells Immobilized in Alginate Fibers with Double Gel Layers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, 199.
- Shindo, S., Sahara, S., Watanabe, N. & Koshino, S., 1994b. Main Fermentation with Immobilized Yeast Using Fluidized-Bed Reactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 109.
- Sinitsyn, A.P., Rajnina, E.I., Efremov, A.B., Gracheva, I.M. & Gernet, M.V., 1986. Fermentation of Hydrolysed Mash by Yeasts Immobilized on Borosilicate Carriers. *Fermentnaya I Spirtovaya Promyshlennost*, 31.
- Smogrovicova, D. & Domeny, Z., 1999. Beer Volatile By-Product Formation at Different Fermentation Temperature using Immobilized Yeasts. *Process Biochemistry*, 34, 785.
- Smogrovicova, D., Domeny, Z., Gemeiner, P., Malovikova, A. & Sturdik, E., 1997. Reactors for Continuous Primary Beer Fermentation using Immobilized Yeast, *Biotechnology Techniques*, 11, 261.
- Sodini, I., Boquien, C.Y., Corrieu, G. & Lacroix, C., 1997. Use of an Immobilized Cell Bioreactor for the Continuous Inoculation of Milk in Fresh Cheese Manufacturing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18, 56.
- Speers, R.A. & Ritcey, L.L., 1995. Towards an Ideal Flocculation Assay. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 174.
- Stewart, G.G., 1996. Brewing Technology for the Future. *The Brewer*, 82, 348.

10

20

30

40

- Stewart, G.G. & Russell, I., 2000. *Brewer's Yeast*. The Institute of Brewing, England.
- Stewart, G.G. & Russell, I., 1981. Yeast Flocculation, in *Brewing Science*, Ed. J.R.A. Pollock, Academic Press, New York.
- Stratford, M., 1996. Yeast Flocculation: Restructuring the Theories in Line with Recent Research, *Cerevisiae Belgium Journal of Biotechnology*, 38.
- Sumino, T., Nakamura, H. & Mori, N., 1993. Development of a High-Efficiency Wastewater Treatment System Using Immobilized Microorganisms, in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 377.
- Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D. & Stassi, P. 1999. . 10
Immobilized Yeast Bioreactor Systems for Continuous Beer Fermentation. *Biotechnology Progress*, 15, 105.
- Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists. 1992. *Methods of Analysis*. 8th Edition, Minnesota, ASBC.
- Teixera, J.M., Teixeira, J.A., Mota, M., Manuela, M., Guerra, B., Machado Cruz, J.M. & Sa Almeida, A.M., 1991. The Influence of Cell Wall Composition of a Brewer's Flocculent Lager Yeast on Sedimentation During Successive Industrial Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Congress*, 241.
- Umemoto, S., Mitani, Y. & Shinotsuka, K., 1998. Primary Fermentation with Immobilized Yeast in a Fluidized Bed Reactor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 35, 58.
- Van de Winkel, L., 1995. Design and Optimization of a Multipurpose Immobilized Yeast Bioreactor for 20
Brewery Fermentations. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 20, 77.
- Van de Winkel, L. & De Vuyst, L., 1997. Immobilized Yeast Cell Systems in Today's Breweries and Tomorrow's. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 27.
- Van de Winkel, L., McMurrough, I., Evers, G., Van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Pilot-Scale Evaluation of Silicon Carbide Immobilized Yeast Systems for Continuous Alcohol-Free Beer Production. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 90.
- Van de Winkel, L., P.C. van Beveren & C.A. Masschelein, 1991a. The Application of an Immobilized Yeast Loop Reactor to the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the 23rd European Brewing Convention Congress*, Lisbon, 577. 30
- Van de Winkel, L., P.C. van Beveren, E. Borremans, E. Goosens & C.A. Masschelein, 1991b. High Performance Immobilized Yeast Reactor Design for Continuous Beer Fermentation. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress*, Oslo, 307.
- Van Dieren, B., 1995. Yeast Metabolism and the Production of Alcohol-Free Beer. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 66.
- Van Iersel, M.F.M., Meersman, E., Swinkels, W., Abee, T. & Rombouts, F.M., 1995. . Continuous Production of Non-Alcohol Beer by Immobilized Yeast at Low Temperature. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 495.
- Van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J., 1993. Biofilm Bioreactors for Waste-Water Treatment. *Trends in Biotechnology*, 11, 117. 40
- Vicente, A.A., Dluhy, M. & Teixeira, J.A., 1999. Increase of Ethanol Productivity in an Airlift Reactor with a Modified Draught Tube. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77, 497.

- Virkajarvi, I. & Linko, M., 1999. Immobilization: A Revolution in Traditional Brewing. *Naturwissenschaften*, 86, 112.
- Virkajarvi, I. & Kronlof, J., 1998. Long Term Stability of Immobilized Yeast Columns in Main Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56, 70.
- Virkajarvi, I. & Pohjala, N., 1999. Profiting from Immobilized Fermentation. *Proceedings of the 5th Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*, 290.
- Wackerbauer, K., Fitzner, M. & Gunther, J., 1996a. Technisch-technologische Moglichkeiten mit Immobilisierter Hefe. *Brauwelt*, 136, 2140.
- Wackerbauer, K., Fitzner, M. & Lopsien, M., 1996b. Untersuchungen mit dem Neuen MPI-Bioreaktor-System. *Brauwelt*, 136, 2250. 10
- Webb, C., G.M. Black & B. Atkinson, 1986. *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System*. England: The Institution of Chemical Engineers.
- Westrin, B.A. & A. Axelsson, 1991. Diffusion in Gels Containing Immobilized Cells: A Critical Review. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 439.
- Wu, W.T., Wu, J.Y. & Jong, J.Z., 1992. Mass Transfer in an Airlift Reactor with a Net Draft Tube. *Biotechnology Progress*, 8, 465.
- Yamane, T., 1981. On Approximate Expressions of Effectiveness Factors for Immobilized Biocatalysts. *Journal of Fermentation Technology*, 59, 375.
- Yamauchi, Y. & Kashiara, T., 1995a. Kirin Immobilized System. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 99. 20
- Yamauchi, Y., Kashiara, T., Murayama, H., Nagara, A., Okamoto, T. & Mawatari, M., 1994. Scaleup of Immobilized Yeast Bioreactor for Continuous Fermentation of Beer. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 31, 90.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Amikura, T., Hiratsu, H., Nagara, A., Kamiya, T. & Inoue, T., 1995b. Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 1. Heat Conversion of α -Acetolactate. *Journal of Biotechnology*, 38, 101.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Nagara, A. & Noguchi, K., 1995c. Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 2. Balance of Total Diacetyl Reduction and Regeneration. *Journal of Biotechnology*, 38, 109. 30
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A. & Kashiara, T., 1995d. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Sulfite Formation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 277.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiara, T., Yoshida, M. & Nakanishi, K., 1995e. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Balance Control of Extract and Amino Acid Uptake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 245.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiara, T., Yoshida, M., Yasui, T. & Nakanishi, K., 1995f. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Minor Products of Carbohydrate Metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 261. 40
- Yuan, X., 1987. Application of Immobilization Technique in Brewing Industry. *Shipin Kexue*, 94, 8.
- Zhang, Z., Su, E. & Yu, J., 1988. Studies on Continuous and Rapid Fermentation of Beer by Immobilized Yeast. *Gongye Weishengwu*, 18, 11.

【 0 0 1 1 】

本発明の背景技術に関する多数の文献がある。それらは以下のものを包含する：

【 0 0 1 2 】

発明の概要

本発明は、飲用に適したアルコール類の製造方法に関するものであり、該方法は、発酵可 50

能な糖類を含む麦汁を処理し、そして／あるいは少なくとも最初に発酵させるために連続発酵段階を用いることを特徴とする。

【0013】

詳細には、フロック形成（および特別には高フロック形成または超フロック形成）酵母株および厳密な酸素制御を用い、ガスリフト型バイオリアクターを用いて連続発酵が行われる好ましいプロセスが提供される。

【0014】

本発明の特に好ましい形態において、連続プロセスからの「少なくとも部分的に発酵された」生成物は、仕上げ（本発明のクレイムの文脈において、発酵可能な炭水化物からアルコールへの発酵プロセスの完了を包含するが、これに限定されない）のためのバッチプロセッシング段階に送られる。 10

【0015】

本発明は、ビール（特に、ペールスタイルのビール、ラガー、および特別には北アメリカタイプのを包含）の製造に関する。これに関して、例えば、the Essentials of Beer Style F. Eckhardt参照のこと。

【0016】

請求項1のプロセスにおいて、連続的段階がガスリフトバイオリアクターにおいて行われる。

本発明の種々の実施において有用な連続的段階によれば、固定化細胞（純粋に遊離の細胞に対する意味で）を用いることが好ましく、担体に固定化されたあるいは凝集した酵母から選択されるいずれか1種を用いてこれを行うことができる。それにもかかわらず、担体に固定化された細胞のかわりにフロック形成酵母および超フロック形成酵母を用いることが、この目的には特に好ましい。 20

【0017】

連続プロセスに関連する好ましい実施および利点に関するさらなる詳細は、本発明の詳細な説明中に示される。これらは人工（例えば、制御された）ガス混合物の使用、ならびに窒素、二酸化炭素および酸素そして空気の使用を包含する。さらに、バッチホールドプロセッシングに関する詳細を本明細書に示す。本発明の特定の具体例において、バッチホールドプロセスの焦点は、発酵可能な炭水化物のアルコールへの変換の「完了」の問題を解決するものである（いずれの場合にも、プロセッシングの連続的段階において実質的に完了していること）。かかる具体例において、バッチホールドプロセッシング段階の第1の焦点は、特に、ダイアセチルおよびアセトアルデヒドに関するフレーバーのマッチング（または矯正）である。本発明の好ましい具体例は、処理され、そして／あるいは少なくとも部分的に発酵された麦汁を分配多岐管（固定多岐管により、あるいは選択的に接続または接続されない導管により）を介して前連続的段階のために複数のバッチホールドタンクに分配することを提供する。一連の分配プロセスにおいて1のタンクが充填されると、次々にタンクが充填されていく。特に好ましい具体例において、連続リアクター処理量およびバッチホールド処理量がリアクター／バッチホールド容器のサイズおよび数に関して合致させられる。その結果、製造フローレートが経時的に処理能力に合致する。理想的には、バッチホールド容器は最終生成物を排出されてから清掃され、再接続され、ついで、連続発酵段階からの生成物で再充填される。 30 40

【0018】

本発明のもう1つの態様によれば、特定の具体例は、麦汁／ビールの酸素含有量に関するものである。これは、連続およびバッチホールド段階両方のプロセスに適用される。連続段階に関するかぎり、酸素濃度は種々の影響を及ぼすが、明らかなことは、酸素濃度を最小化して高級アルコールのフレーバー活性エステルへの変換を最適化することが望ましい。この点において、必要な厳密な O_2 制御を用いてフーゼルエステル香気バランスを取るならば、バッチホールドプロセッシングによりより高い濃度のアルコールが多く残る可能性があることに注意すべきである。連続発酵の前に CO_2 を麦汁にプレパージすることは、この点において有用でありうる。

【0019】

本発明の1の具体例において、プロセッシングの連続的段階の主な目的は、バッチホールドプロセスにおいて後に生じる下流バッチ発酵を開始させることである。

【0020】

優先権書類の内容を、参照により本明細書に一体化させる。

【0021】

詳細な説明

以下に、本発明の態様に関する説明を2部にわけて行う。

説明は、グラフ、数式、数値等を含み、それらは番号付けされた「図」および「図面」を参照するものである。図面において示される物品は正しいスケールではない。

10

【0022】

詳細な説明—第1部酵母株および種培養の調製

本発明で行った発酵には、*Saccharomyces cerevisiae*科の倍数体酵母 (*Saccharomyces uvarum* および／または *Saccharomyces carlsbergensis* ともしられる) を用いた。醸造業界ではこの酵母を下面発酵ラガータイプビール酵母という。この特徴は、発酵が完了すると液体培地の底に沈降するというラガー酵母の能力によるものである。ラガー酵母とは異なり、エール酵母は発酵容器の上面に上昇し、それゆえ上面発酵株として知られていた。酵母が沈降または上昇する能力は、必ずしも酵母がラガータイプであるかエールタイプであるかに依存するのではなく、株に特異的なものである。典型的には、ラガー酵母は34℃よりも高い温度では発酵せず、エール酵母はメリビオースを発酵することができない。科学者はこれらの特徴を用いてラガー酵母とエール酵母を区別する (McCabe, 1999)。

20

【0023】

Labatt Culture Collectionの中程度のフロック形成酵母株 *Saccharomyces cerevisiae* 3021株を遊離細胞自己凝集発酵および□ーカラギーナン固定化発酵の両方に使用した。固定化細胞として超フロック形成酵母を使用することを含む試験には、LCC3021株の変種、すなわちLCC290を用いた。

【0024】

純粋な酵母の培養物を、Labatt Technology Development Departmentにある-80℃のフリーザーで極低温保存した。必要な場合には、酵母倍等物を滅菌ループで取ったものを、PYG寒天プレート (ペプトン3.5g、酵母エキス3.0g、KH₂PO₄ 2.0g、MgSO₄ 7H₂O 1.0g、(NH₄)SO₄ 1.0g、グルコース20.0g、および寒天20.0を蒸留水に溶解し、体積を1リットルとしたもの) 上、21℃で好氣的に前培養した。次いで、単離した酵母コロニーを10mLの滅菌した麦汁の入った試験管中に移し、攪拌しながら21℃で24時間インキュベーションした。前回の培養物を適当な体積の麦汁に添加することにより (10mLを190mL中に、200mLを800mL中に、そして1Lを4L中に)、この種培養を逐次スケールアップさせて体積5Lとした。次いで、酵母種培養を遠心分離ジャーに移し、4℃で10000rpm 10分間遠心分離した。連続的な発酵のすべての段階において、湿酵母ペレットから所望重量 (30% w/v) の酵母を抜き取った。

30

40

【0025】

発酵培地

Labatt London brewhouseにより製造される工業的なグレードのラガー麦汁を、すべての発酵の栄養培地として使用した。本明細書において、麦汁の比重はPlato度 (°P) で表される。式4.1は比重と°Pとの関係を説明するものである。

$$^{\circ}P = 135.997 \cdot SG^3 - 630.272 \cdot SG^2 + 1111.14 \cdot SG - 616.0868 \quad (4.1)$$

本発明に使用した麦汁は17.5°Pであり、比重1.072に対応する。表4.1は、セクション4.7.2で説明する高品質液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により測

50

定されたこの麦汁の典型的な炭水化物のプロファイルを示す。この麦汁中の約 73 % の炭水化物が発酵可能であり、好ましくは研究に使用された醸造用酵母はより長い鎖の炭水化物の 27 % までしか容易に摂取することができない。

【0026】

【表 1】

表 4. 1 発酵試験において用いられた麦汁の典型的な炭水化物組成。麦汁は the Labatt London brewhouse により製造され、17.5 °P として測定された比重を有していた。

	平均 (g/L)	偏差係数 (%)	発酵可能 (%)	非発酵性 (%)
フラクトース	3.3	18.0	1.9	
グルコース	16.5	4.3	9.3	
マルトース	87.7	10.1	47.8	
マルトトリオース	25.2	10.8	14.2	
マルトテトロース	6.4	18.3		3.6
多糖類	41.1	9.1		23.2
合計	177.2		73.2	26.8

10

大部分の分析物質の偏差係数は 10 % ないし 20 % の範囲である。この偏差は、主に、使用した工業的製造プロセスならびに醸造毎の原料のバラツキによるものである。

【0027】

固定化のタイプ

固定化の 3 タイプ—包括、吸着および自己凝集について、本発明において試験した。工業的に得られる担体に関しては、供給者のデータが最初に示され、次いで、研究室分析に供給された。調べた担体の写真およびサイズ分布（得られた場合には）を本明細書のいずれかの場所に示す。

【0028】

2 タイプの吸着マトリックスを、パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクターにおいて試験した。これらの両方の担体の写真を本明細書に示す。Schott Engineering は焼結ガラスビーズ担体であるシラン（登録商標）を提供した。選択した粒子は直径 1 ~ 2 mm であり、55 ~ 60 % の孔体積を有する開口部を酵母固定化のために有しており、孔サイズ分布は 60 ないし 300 μm であり、酵母に適したサイズであった。このタイプの担体は生物学的かつ化学的に安定であり、掃除しやすく、再使用可能で、蒸気にて滅菌可能で、圧縮されず、味がニュートラルであると報告されており、それゆえ、食品用として認められる。

30

【0029】

World Minerals of California は珪藻土から構成された球状担体を供給した。この担体は、熱的および化学的安定性、機械的強度および堅固さに関する利点を有する。基本的な原料である珪藻はビールの濾過用に醸造工業において通常に使用される。セライト（登録商標）R-632 担体は全細胞固定化用に特に設計されている。

40

供給者による詳細は以下のごとし：

サイズ範囲： 0.595 mm ないし 1.41 mm (14/30 メッシュカット)

平均孔直径： 7.0 μm

合計孔体積： 1.19 cm^3/g

圧縮されたベッド密度： 0.334 kg/m^3

【0030】

50

包括用担体であるカップーカラギーナンゲルビーズをLabatt Brewing Company Ltdの研究室において得た。製造プロセスはセクション5. 2に記載され、この製造プロセスの結果をセクション6. 2. 1に示す。

【0031】

最も単純な固定化法は自己凝集であり、凝集可能な酵母株を選択することにより可能である。工業用ラガー酵母LCC3021は本質的な凝集能を有し、中程度の凝集株と考えられる。発酵が進行するにつれ、0. 5 mmないし1. 0 mmの酵母の小さな塊が液体培地中に形成される。LCC290酵母はLCC3021ラガー酵母の変種であり、さらに大きなフロック（攪拌の程度により1. 0 mmないし5. 0 mm）を形成し、それゆえ、超フロック形成酵母に分類される。種々の酵母のフロックを本明細書に示す。

10

【0032】

サンプリングプロトコル

発酵が進むにつれ、たびたび発酵液から試料を抜き取ることが必要となった。この仕事を行うために、滅菌サンプリング弁をScandi-brew（登録商標）から購入した。これらの弁はステンレス鋼でできており、チャンバー（上下のポートにより範囲が決められる）と装備しており、該チャンバー中の滅菌的環境を維持するためにエタノールを貯留することができる。試料採取前に保持キャップを底の口からはずすことによりエタノールをチャンバーから放出する。新鮮なエタノール（75体積%）をチャンバーに通し、次いで、キャップを弁の上部の口に装填する。その後、弁のレバーを引き、約50 mLの液体試料を滅菌した容器中に集める。超フロック形成酵母を用いる発酵のために次の試料を集めて、細胞計

20

【0033】

生物学的モニタリング

遊離酵母細胞の計数およびメチレンブルー法による生存率

遊離懸濁した酵母細胞を含む液体試料を、先ず、蒸気サンプリング法により発酵培地から集める。Hauser Scientific Companyの体積 10^{-4} mLの血球計数盤を、光学顕微鏡と組み合わせて用いて、細胞計数を行う。液体試料を蒸留水で希釈して、計数視野中の酵母総数が150ないし200個となるようにすべきである。Heggartら（1999年）は、酵

30

【0034】

試料中の生存率の程度を評価するために、the American Society of Brewing Chemistsにより記載されたメチレンブルー染色法を用いた（Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992）。生細胞はメチレンブルーを酸化するため、メチレンブルー染色で無色である。一方、死細胞は青色に染まる。生存率評価用のメチレンブルーを調製するために以下の試薬を用いた：

溶液A：500 mLの蒸留水中0.1 gのメチレンブルー

溶液B：500 mLの蒸留水中13.6 gの KH_2PO_4

溶液C：100 mLの蒸留水中2.4 gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

40

【0035】

次いで、500 mLの溶液Aを498. 75 mLの溶液Bおよび1. 25 mLの溶液Cと混合してpH 4. 6の最終混合物を得ることによりFink-Kuhles緩衝化メチレンブルーを調製した。

希釈された細胞懸濁液とメチレンブルーとの混合物を試験管中で調製し、次いで、完全に混合した。この混合物を数分間静置した後（細胞と色素の接触を確実にする）、1滴を血球計数盤の計数ガラスとカバースリップ（体積を確定）との間に置く。計数視野中の生細胞および死細胞の両方を計数し、次いで、生細胞数を細胞総数で割ることにより生細胞のパーセンテージを決定した。

【0036】

50

4. 5. 2 固定化酵母細胞の計数－自己凝集

フロック形成傾向のある酵母細胞を用いる場合、細胞がサンプルジャー中に沈降する傾向があるので、液体試料中の細胞数を正確に評価することが困難となる。典型的な試料を得るために脱凝集剤を用いた。これらの実験において、0.5体積%の硫酸溶液を用いてフロック形成した酵母細胞を不安定化させ、そのことにより典型的な酵母細胞の計数を可能にした。希釈剤として蒸留水のかわりに硫酸を、セクション4.5.1に概説した同じ計数および生存率試験法に用いた。

【0037】

固定化酵母細胞の計数－ゲルビーズ

酵母の計数をゲル包括細胞に関して行う前に、ポリトロン（登録商標）装置（Brinkmann Instruments）を用いてゲルマトリックスを破碎する必要がある。ビーズの試料を、先ず、滅菌済みふるい（500 μ mのメッシュサイズ）に通し、次いで、滅菌水を流す。1ミリリットルのゲル包括細胞ビーズおよび19 mLの蒸留水を50 mLの試料容器中に入れた。次いで、ポリトロン（登録商標）用いてゲルを物理的に破碎し、かくして、酵母を溶液中に遊離させた。次いで、ゲル破碎試料に関してセクション5.5.1に記載した計数および生存率測定法を行った。

【0038】

コンタミネーションのモニタリング

本発明において行われたすべての発酵を、コンタミネーションに関して定期的に監視した。監視プログラムは、50 Lの連続発酵中の液体および貯蔵容器中の麦汁に関して1週間に少なくとも1回行うことからなっていた。液体試料を無菌的に抜き取り、次いで、Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories) および10 mg/mLのシクロヘキシミドを含む培養プレート上に広げた。次いで、これらの試験試料を好氣的条件および嫌氣的条件の両方において28℃で10日までインキュベーションした。ジャー中に残存する酸素を除去するAnaeroGen（商標登録） packet (Oxoid)を入れたジャーに選択したプレートを入れ、所望の嫌氣的増殖環境を作り出した。インジケーター片（酸素が存在するとピンク色に変わる）を用いて、実際に環境が嫌氣的であることを確認した。液体試料中に細菌のコンタミネーションがある場合、この方法により検出されるであろう。

【0039】

野生型または非醸造用酵母の検出には、細菌および／または醸造用酵母に対して都合の良くない別個の増殖培地が必要であった。0.4 g/LのCuSO₄を補足した酵母用培地（YM, Difco Laboratories）を用いて調製した4種のプレートを用いて可能性のある野生型酵母を選択的に増殖させた（25℃で7日間インキュベーション）。PYN寒天（Peptone Yeast-Extract Nutrient, Difco Laboratories）上に撒いた液体試料を37℃で7日間インキュベーションして非醸造用酵母の検出を行った。ラガー酵母の増殖は34℃よりも高い温度で阻害され、かくして、これらのプレート上での増殖はエール酵母のコンタミネーションを示すものとなる。

【0040】

分析方法

標準的な工業的操作法により規定された適切な装置に対して適切なキャリブレーションを行った。

【0041】

エタノール

the Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992)により記載されたガスクロマトグラフィー法をも用いてビール中および発酵試料中のエタノール濃度を分析した。脱気した液体試料を5% v/vのイソプロパノール内部標準と混合し、次いで、この混合物0.2 μ LをPerkin Elmer 8500ガスクロマトグラフ中に注入した。下記のリストはGCの正確なセットアップに関するさらなる詳細を示すものである：

フレイムイオン化検出器(FID)

Dynatech自動サンプラー

Chromosorb 102, 80-100メッシュの支持体充填物

ヘリウムキャリアガス流速20mL/分

インジェクター温度175℃、検出器温度250℃、カラム温度185℃等温。

【0042】

炭水化物

高品質液体クロマトグラフィー (Spectra-Physics SP8100XR HPLC) システムを用いてグルコース、フラクトース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトロース、多糖類およびグリセロール濃度を測定した。リン酸二カリウムを移動相とするカチオン交換カラム (Bio-Rad Aminex HPX-87K) を用いて、これらの炭水化物をシステムから溶離させて分離した。次いで、屈折率検出器を用いて化合物の品質を調べ、適切な化合物のピークを得た。背圧800psi、カラム温度85℃、検出器温度40℃でHPLCを操作した。試料を脱気し、適当なレベルにまで希釈した。次いで、10□Lを流速0.6mL/分でシステムに注入した。 10

【0043】

通常、醸造工業において、液体の全炭水化物レベルを評価するためにもう1つの測定方法が用いられている。プラトー (Plato) 度で示される液体の比重をAnton Paar DMA-58 Densitometerを用いて測定した。濾過され脱気された試料を特別なガラス製u字管に入れ、次いで、電氣的に振動させた。液体の振動周波数を測定し、次いで、液体の比重 (g/100gまたは°P) に対応させた。この測定値は試料の全炭水化物濃度 (または比重) の概略値であることに留意すべきである。なぜなら、比重が調べるべき麦汁と同じであるスクロース水溶液に関して20℃でキャリブレーションを行うからである。 20

【0044】

ビシナルジケトン

電子捕獲検出器を装備したPerking Elmer 8310 Gas Chromatographを用いて全ジアセチル (2, 3-ブタンジオン) および全2, 3-ペンタンジオン濃度を調べた。流速1.0mL/分のアルゴン中5%メタンキャリアガスを用い、試料をJ & W DB-Wax カラムに通した。検出器温度を120℃にセットし、インジェクター温度を105℃に維持した。Hewlett Packard 7694Eヘッドスペースオートサンプラーにより分析を容易化させた。選択した試料成分のピーク面積を評価し、次いで、2, 3-ヘキサンジオン内部標準キャリブレーション値と相互参照することにより定量値を計算した。 30

【0045】

これらの化合物の「合計」濃度を評価するためには、まず、これらの試料を65℃で平衡化させ、次いで、この温度に30分維持することが必要である。この前もっての分析試料の取り扱いにより、□-アセト乳酸および□-ヒドロキシ酪酸のそれぞれの対応ジケトン、ダイアセチルおよび2, 3-ブタンジオンへの変換を可能にした。

【0046】

エステルおよび高級アルコール

ビール中に検出される最も重要な香気化合物のいくつかをヘッドスペースガスクロマトグラフィー法を用いて測定した。アセトアルデヒド、酢酸エチル、イソブタノール、1-プロパノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、ヘキサン酸エチルおよびオクタン酸エチルを、内部標準としてn-ブタノールを用いて定量した。フレイムイオン化検出器を装備したHewlett Packard 5890 Gas Chromatograph、HP 7994hヘッドスペース自動サンプラーおよびJ&W DB-Waxキャピラリーカラムを用いた。インジェクター温度を200℃にセットし、検出器温度を220℃とした。オープン温度プロファイルは以下のごとし：40℃で5分、10℃/分の割合で40℃から200℃まで、50℃/分の割合で200℃から220℃まで、最後に220℃で5分維持。ヘリウムメイクアップガスは30mL/分 (28psig) であり、水素流速50mL/分 (325psig) であり、空気流速300mL/分 (35psig) であり、ヘリウムキャリアガスを流速6.0mL/分で補足した。1mLの試料ループに関する全GCサイクルは40分であった。 40 50

【0047】

他の分析

熟成されパッケージングされる発酵液に関して必要に応じて数種の他の分析測定を行った。最終ビール標準につき、Labatt Quality Control departmentにより最終製品の分析が行われた。the Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992)により記載された方法はこれらの測定に基づくものであった。分析の一覧ならびにこれらの測定値に関する簡単なコメントを表4. 2に示す。

【表2】

表4. 2 品質管理分析および説明

列挙項目	説明	
空気	パッケージングプロセス中に持ち越された空気；仕様は1 mL未満。	10
二酸化炭素	製品中に導入された炭酸のレベル；％表示。仕様では2. 75％。	
二硫化イオウ	GCにより測定されたビール中の二硫化イオウ量；目標< 10 mg/mL。	
硫化ジメチル	GCにより測定されたビール中の硫化ジメチル（調理されたトウモロコシの香り）量；目標< 70 µg/mL。	
苦味	ホップがビールに貢献する苦味量；1苦味単位（BU）は約1 mg/Lのアルファ酸と等価である。	20
色	スペクトル分析により測定されたビールの色；光路長0. 5インチとした場合の430 nmにおける試料の吸光度。	
pH	pHメーターを用いて測定； $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$	
見かけのエキス	液体の相対密度に対するアルコールの影響を補償しない場合の液体中の利用可能な可溶性物質の量；ハイドロメーターを用いて測定し、°Pで表す；AEという。	
真のエキス	この測定値においてアルコールが考慮されること以外は見かけのエキスと同じ；REという。	30
計算された元のエキス	2. 0665 gのエキスが1. 0000 gのアルコールを生じるというBallingの実験に基づく； $\text{COE} = 100 * [(2.0665 * (\text{アルコールの重量\%数}) + \text{RE}) / (100 + 1.0665 * (\text{アルコールの重量\%数}))]$	
温濁り	沈降物を攪拌しない場合の室温（21℃）におけるビール中の濁り；光散乱に基づく比濁分析法により測定し、ホルマジン濁度単位（FTU）で示す；仕様は< 200 FTU。	
初期冷濁り	室温（21℃）から0℃まで冷却した場合において、沈降物を攪拌せずに生じるビール中の濁り；測定方法は上と同じ；仕様< 100 FTU。	40
泡	NIBEM装置を用いたビールの泡立ち能の測定値；コントロールされた物質中に泡を生じさせ、泡の崩壊速度を記録する；仕様は> 170秒。	

【0048】

酵母沈殿プロトコル-LCC290

酵母試験試料の調製

セクション4. 1に記載のように麦汁中で超フロック形成酵母（LCC290）を増殖さ 50

せた。次いで、この種培養を4℃において10000rpmで15分間遠心分離して、さらなる接種用の酵母ベレットを得た。セクション4.2に記載のように麦汁を100℃で60分滅菌し、次いで、1リットルを6個の2滅菌済み振盪フラスコに無菌的に移した。4gの遠心した酵母を各フラスコに植菌した。135rpm(21℃の周囲温度)で動くシェーカーにフラスコを乗せ、発酵させた。以下の時間に1個のフラスコを抜き取った：24時間、40時間、48時間、64時間、71時間および192時間。各インターバルにおいて、少量の液体試料を炭水化物の分析ならびに酵母濃度および生存率の測定のために取った(実際に方法は第4章に記載)。残りの液体/酵母混合物を、セクション4.2に記載の酵母沈降プロトコルに供した。

【0049】

10

酵母沈降プロトコル

下記方法を用いてLC290超フロック形成酵母株の沈降速度を測定した。セクション4.7.1に記載のように所望インターバルまで各試料を発酵させた。決められた時間において、適当な試料フラスコを抜き取った。試料を攪拌して、すべての粒子が懸濁されることを確実にした。次いで、フラスコ内容物を即座に1000mLの目盛りつきシリンダーに移した。フロックの沈降に伴い、液面とフロッカー液体界面との間を30秒間隔で測定した。下式を適用することにより沈降速度を計算した：

$$\text{沈降速度} = \Delta H / \Delta t = (H_0 - H_t) / (t - t_0) \quad (5.1)$$

標準的なKynch法(1952年)を用いて、各反応インターバルで得られた沈降曲線から細胞濃度に対する沈降速度の曲線を得た。

20

【0050】

循環および混合速度の測定法

三相ガスリフトドラフト管バイオリアクター内部の混合時間および循環速度を測定するために、データ獲得システムにリンクした酸注入システムを用いた。バイオリアクター中に強酸のパルスを与え、経時的にpH変化をモニターし、次いで、しれらをセクション3.2.2に示した等式と関連づけることにより、循環速度および混合時間の両方の測定が可能となった。データ獲得システムは下記のものからなっていた：

Ingold Microprocessor-による pH Transmitter (Model 2300)に結合されたIngold pH プローブ (Cole-Parmer, カタログ番号 P-05990-90)

データ伝送 DT2805 カード

30

386DX パーソナルコンピューター

および Quick Basic データ獲得プログラム (C. Hudson and J. Beltrano により1994年に記載され、N. Mensour により1998年に改変された)

【0051】

10ミリリットルの10N塩酸を、ガスリフトドラフト管バイオリアクター(ダイヤグラムを図5.5に示す)のpHプローブ位置のすぐ下の穴から注入した。すべての混合実験の前に、保証された標準バッファー(Beckman pH 7.0グリーンバッファーおよびBeckman pH 4.0レッドバッファー)を用いてpHプローブを2点キャリブレーションに供した。pHメーターにより生じた4~20mAの電流をねじ式端子盤に接続し、そこで電流を電圧に変換し、次いで、コンピューター内部のデータ獲得カードにより測定した。酸注入と同時にデータ獲得プログラムを開始させた。データ収集時間の長さはサンプリング周波数50Hzで5分であった。データ獲得カード1セットのゲインを伴って、プログラム中のアレイサイズを3750(合計15000ポイントを収集)にセットした。

40

【0052】

収集されたデータを研究室からもっと強力なコンピューター(Pentium II マクロプロセッサ)に移してさらなる分析を行った。大きなデータセット処理容量ならびに多くのビルトインデータハンドリング機能(データスムージング、カーブフィッティング等)の点からTableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Canada)を徹底的に用いた。Savitzky-Golayアルゴリズム、ムービングウィンドウを越えた最小二乗カルチックポリノミナルフィッティングに基づくタイムドメインスムージング法をオリジナルデー

50

タに適用してノイズを除去した。次いで、実際の pH 測定値ではなく pH 変化を反映するように平滑化されたデータを調整した。調整されたデータに減衰シノソイド関数を適合させた。次いで、適合パラメーターから混合時間および循環速度を計算した。

【0053】

3種の固定化担体のうち1種（超フロック形成酵母 LCC290、中フロック形成酵母 LCC3021または□ーカラギーナンゲルビーズのいずれか）が存在する50Lのガスリフトバイオリアクター内部の実際の発酵物に関して混合実験を行った。液相は比重2.5°Pの発酵したビールであり、気相は二酸化炭素スパーキングガスを含んでいた。発酵温度を15°Cに制御した。スパーキングガス空塔速度は2.0ないし6.0mm/秒の間であった。一定ガス流速においてシステムを10分間平衡化させた。次いで、酸注入試験を開始し、3回繰り返した。次のガス流速を選択し、リアクター内部の混合物を開始レベルのpHに調節した。 10

【0054】

パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクターシステムの設計

ガスリフト管バイオリアクター発酵システム

ドラフト管流動床（DTFB）システムは三相システムへの用途が示されている。2つの同一のパイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクターを設計し、the Experimental Brewery of the Labatt Brewing Company Ltd.中に構築しインストールして、本発明の実験研究を行った。さらに、数個の存在する容器を改変して麦汁貯蔵用およびビール収集用とした。図1のフローシートはパイロットスケールの連続発酵実験に用いたプロセスの全体を示し、図1に示した装置のより詳細な説明を表5.1に示す。 20

【0055】

ロンドンの醸造工場から5.08cmのステンレス鋼配管を通して麦汁が供給され、1600Lの有効体積の麦汁貯蔵タンク（WT1およびWT2）に移された。2-タンクシステムを用いて、栄養培地をパイロットスケールの連続ファーマンター（R1およびR2）に連続的に供給することが可能となった。酸素および均質性のコントロールのために二酸化炭素スパーキングシステムならびに温度コントロール用の冷却ジャケットが各ホールディングタンクに装備された。栄養培地の中心的な源を弁ヘッダーシステム（V7、V8およびV9）を通して3つのリアクターにセットアップした。Masterflexペリスタリックポンプ（P1およびP2）を用いて決められた流速の麦汁をパイロットスケールのバイオリアクター（R1およびR2）にデリバリーした。 30

【表3】

表 5. 1 図 5. 1 に示された個々の装置の説明

記号	説明	
Air	ロンドンのプラントからの100 psig 空気供給	
CO ₂	ロンドンのプラントからの100 psig 二酸化炭素供給	
F1	二酸化炭素入り口における滅菌フィルター	
F2	二酸化炭素入り口における滅菌フィルター	
F3	WT 1 の通気出口における滅菌フィルター	10
F4	WT 2 の通気出口における滅菌フィルター	
F5	スパーシガス入り口における滅菌フィルター	
F6	スパーシガス入り口における滅菌フィルター	
F7	W B T 1 の出口における滅菌フィルター	
GLR	グリコールラインリターン; 25 psig	
GLS	グリコールラインサプライ; 45 psig	
NV1	二酸化炭素ニードル弁	
NV2	二酸化炭素ニードル弁	
NV3	空気入り口におけるニードル弁	20
NV4	二酸化炭素入り口におけるニードル弁	
NV5	空気入り口におけるニードル弁	
NV6	二酸化炭素入り口におけるニードル弁	
P1	R1用Masterflex ペリスタリックフィードポンプ	
P2	R2用Masterflex ペリスタリックフィードポンプ	
PR1	二酸化炭素圧力レギュレーター	
PR2	二酸化炭素圧力レギュレーター	
PR3	空気圧レギュレーター	30
PR4	二酸化炭素圧力レギュレーター	
PR5	空気圧レギュレーター	
PR6	二酸化炭素圧力レギュレーター	
R1	パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター; 有効体積50 L	
R2	パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター; 有効体積50 L	
RM1	二酸化炭素ロタメーター; 0 ないし 20 scfh スケール	
RM2	二酸化炭素ロタメーター; 0 ないし 20 scfh スケール	
RM3	空気ロタメーター; 0 ないし 2.5 scfh スケール	
RM4	二酸化炭素ロタメーター; 0 ないし 10 scfh スケール	40
RM5	空気ロタメーター; 0 ないし 2.5 scfh スケール	
RM6	二酸化炭素ロタメーター; 0 ないし 10 scfh スケール	

【0056】

ステンレス鋼ガスパイプスパージャーを通して二酸化炭素ガスおよび空気をガスリフトシステム中にスパーシした（図7）。ロタメーター（RM3、RM4、RM5およびRM6）を用いて、システムに注入された流速をモニターした。汚染物質がバイオリアクターないに入らないように滅菌フィルター（0.2 μ mメッシュ）をガスライン上にインストールした。生成物はリアクターからオーバーフローシステムを流れて流出した（図4）。それゆえ、フィードポンプのみで液体滞留時間をコントロールした。両方のリアクター（R

1 および R 2) を廃棄ビールタンク (W B T 1) に接続して、オーバーフロー液を集めた。特別な 5 0 L 収集タンクを生成物の収集および必要に応じてプロセッシングに使用した。

【0057】

5 0 L のパイロットスケールバイオリアクターの詳細なダイアグラムおよび正確な寸法をセクション 5. 1. 1 に示す。麦汁の扱いおよび貯蔵プロトコルをセクション 5. 1. 2 に示し、連続発酵システムの洗浄および滅菌プロトコルをセクション 5. 1. 3 に示す。セクション 5. 1. 4 は本発明による発酵プロトコルを含む。

【0058】

リアクターの設計および仕様

この研究のために設計された 5 0 L の有効体積のバイオリアクターは全体で 3 0 4 L のステンレス鋼からできており、4 つの Plexiglas 窓がリアクター本体に付いており、粒子および液体の動きを観察できるようになっていた。戦場用化学物質 (焼灼剤および酸) に対する耐性ならびに蒸気滅菌に対する耐久性を考慮して構成材料を選択した。設計のもう 1 つの重要な態様は発酵培地と直接接触するねじ止め式の付属品の最少化であった。そのかわりに、ポートを溶接し、必要ならば、サニタリー TriClover 付属品を使用した。リアクターは頭部領域を拡張した設計とし、ガスの脱離を最大化させ、かくして、液体-固体物質移動をより良好なものとした (Chisti & Moo-Young)。リアクター底部は 9 0 度の円錐角を有するように設計し、底部から固体ができるだけ収集されないようにした。図 2 は、La batt Experimental Brewery にインストールされた 5 0 L のパイロットスケールのシステム

10

20

【0059】

内部ドラフト管および粒子セパレーター (バッフル) を図 3 に示す。文献データ (Chisti, 1991) に基づいて、リアクター直径に対するドラフト管直径の比 $2/3$ を選択した。粒子セパレーターのサイズは固体-液体混合物からガスをうまく分離するようなものである。このバッフルデバイスの直径を増加させることにより (ドラフト管直径 1 0. 1 6 c m に対して 2 0. 3 2 c m)、気泡上昇速度と液体-固体降下速度との差をより大きくすることが可能となる。ドラフト管システムのアニュラス中へのガス侵入が抑制され、より良好な固体-液体物質移動が起こるであろう。

30

【0060】

二酸化炭素混合ガスをドラフト管セクション中に導入するためにパイプスパージャー (図 7) を設計した。直径 0. 1 6 c m の合計 1 6 0 個の穴を直径 1. 2 7 c m のスパージャーにあげた。穴は縦方向に中心から中心まで 0. 8 c m 間隔、横方向に中心から中心まで 0. 6 c m 間隔であった (2 0 個の穴が 8 列)。混合はスパージされたガスの主な機能であるため、スパージング穴直径 0. 1 6 c m を選択した。

40

【0061】

麦汁の取り扱いおよび貯蔵のプロトコル

伝統的な発酵現場において、麦汁は酵母処理されることなく長期間貯蔵されない。酸素富化された麦汁は、酵母を包含する多くの微生物のための優れた増殖培地である。連続ガスリフトシステムの発酵プロトコルには大量の麦汁を貯蔵することが必要なので、麦汁輸送および貯蔵プロトコルを開発することが必要であった。麦汁が貯蔵容器に適切に輸送されたならば、酸素富化されていない冷麦汁を損傷なく 2 週間まで貯蔵することができるというのが、研究者の意見であった。

【0062】

麦汁が貯蔵容器内に入ったら麦汁温度を適切に制御することを確実にすることも必要と思

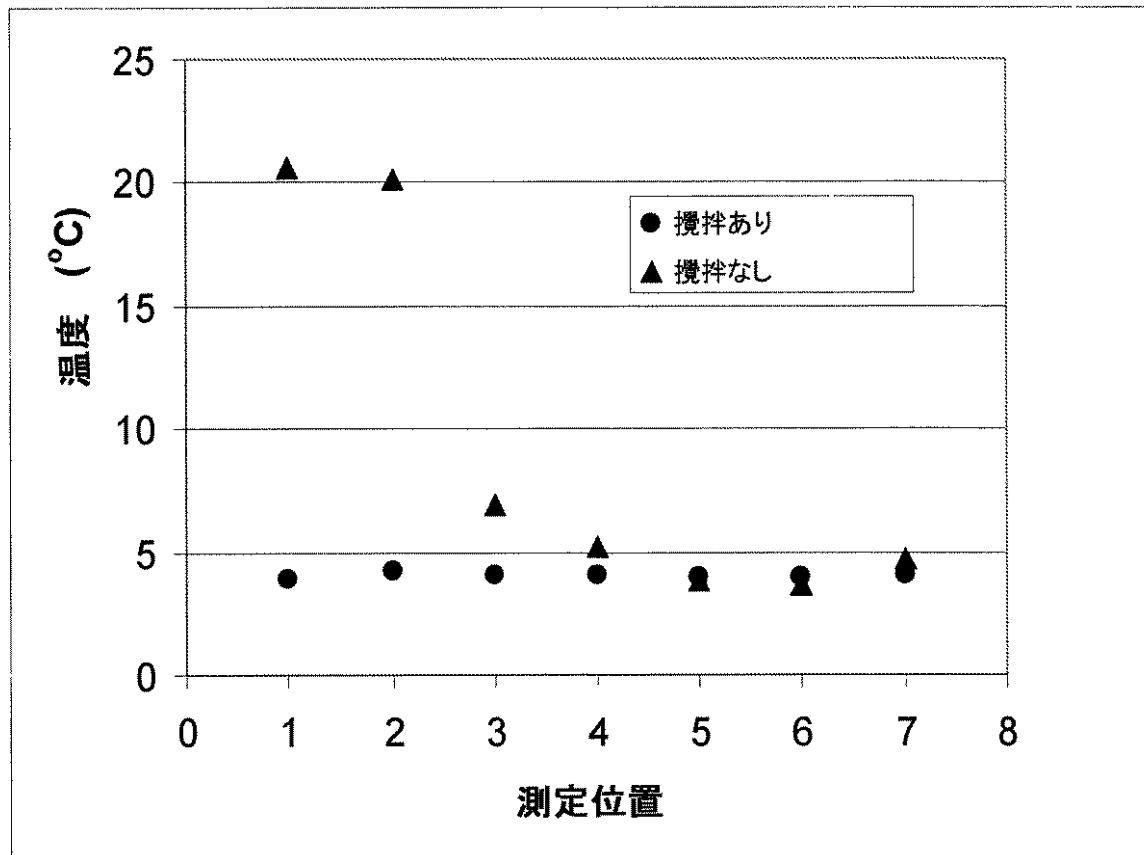
50

われた。Experimental Brewery内の利用可能なタンク設備は元々麦汁貯蔵よりもむしろ発酵用に設計されていた。停留した液体の温度を維持するこれらのタンクの能力を試験した。図2は、4℃の一定温度を維持しなければならない場合、これらの容器が攪拌なしには使用できないことを明確に示す。まず、4℃において麦汁をこれらの容器に導入した。タンクの数箇所で温度測定を行って真の温度をよりよく理解するようにした。液体を攪拌せずに容器中に24時間放置した場合、頂上付近の液体温度は約20℃まで上昇した。タンク中央部の液体もわずかに温度が上昇し（□T約3℃）、タンク円錐部の液体温度は元の4℃付近を維持した。

【0063】

【表4】

10



20

30

図5. 8 筒状麦汁貯蔵タンクにおける温度プロファイルに対するガススパーキングによる攪拌の効果

【0064】

4℃において麦汁をタンクに充填した。タンクに充填してから24時間後に測定を行った。二酸化炭素ガスを流速0.113 cm³/時で容器中にスパージした。周囲温度は19.8℃であった。測定位置：(1)タンク頂上部の壁；(2)タンク頂上部中心；(3)タンク中央部の壁；(4)タンク中央部の中心；(5)円錐部頂上部の壁；(6)円錐部頂上部の中心；(7)円錐部の底。

40

【0065】

二酸化炭素を流速0.133 cm³/時で導入してわずかに攪拌することにより、貯蔵容器中の麦汁温度を4℃に維持することが可能となった。これらの知見の結果として、いずれの麦汁貯蔵容器も、麦汁攪拌に使用される2.54 cmのサニタリー配管を有する円錐部の基礎において適合するものであった。

【0066】

次に、通気されていない麦汁をLabatt Londonプラントから5.08 cmのステンレス鋼配管にてバッファータンクに移した。このタンクから、麦汁はフラッシュ滅菌器を経て麦

50

汁貯蔵タンクの1つ(WT1またはWT2)に入れられ、2℃で2週間まで貯蔵された。この滅菌工程は、貯蔵の全期間にわたって望ましくない微生物を麦汁から除去することを確認するためのものであった。酸素富化されていない麦汁を用いることにより、熱麦汁に対する酸素によるダメージ(腐敗臭アルデヒドの生成)が最小化されよう。さらに、それゆえ、スパージガスとともに導入される空気により連続発酵装置に対する酸素制御を厳密に行うことができた。

【0067】

麦汁を麦汁貯蔵容器に入れて溶存酸素の測定を行った。図5.9は、3つの輸送プロトコルを行った後の麦汁溶存酸素濃度の経時変化を示す。第1の例において、麦汁を貯蔵容器に移し、二酸化炭素スパージを開始して正しい温度制御を確実にした。麦汁溶存酸素濃度は初日から増加し、約1.3mg/Lに達し、次いで、5日目までには約0.1mg/Lにまで減少した。第2の試行において、充填前に、麦汁貯蔵容器に0.85m³/時の二酸化炭素を3時間パーズした。初期の酸素取り込みは大幅に減少し、2日で所望麦汁酸素含量に達した。

【0068】

【表5】

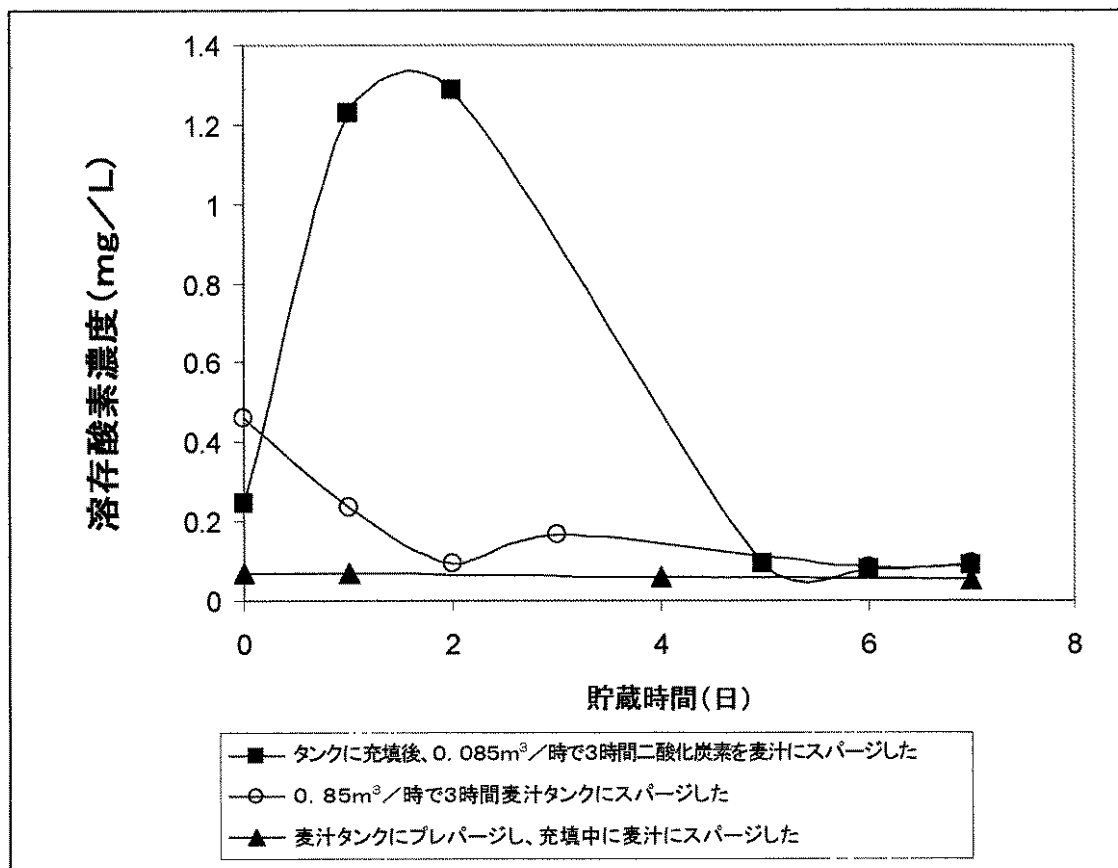


図5.9 London Plantから移す間における麦汁中の溶存酸素の制御

3つの充填プロトコルを評価した。第3の方法ははじめの2つの方法を単に組み合わせただけのものであった。麦汁温度を4℃に維持した。

【0069】

最後の試行において、上記のごとくタンクをプレパージし、次いで、充填プロセスの間連続的に二酸化炭素をスパージし、同様に貯蔵期間中もスパージした。貯蔵期間中、溶存酸素量は最小(<0.1mg/L)に維持された。結果として、以後すべての麦汁収集プロトコルとしてこの方法を採用した。

【0070】

5. 1. 2 クリーニングおよび滅菌プロトコル

麦汁貯蔵タンクを、熱水（85℃）でのパイプすすぎ、焼灼剤でのクリーニングすすぎ（60℃で40%焼灼剤）、次いで、熱水（85℃）での後すすぎからなるクリーニングサイクルに付した。容器壁を過酢酸溶液（2% w/v）と接触させることによりこれらの容器の衛生化を行った。麦汁輸送配管にも同じクリーニングおよび衛生化を施した。

【0071】

50 Lのバイオリアクターに対して異なるクリーニングおよび衛生化のプロトコルを行った。システムを熱水（60℃）ですすぎ、次いで、40℃の温水を頂上まで満たした。次いで、工業的クリーニング剤Diversol CX/A (DiverseyLever, Canada)を2% w/v溶液となるようにこの水に添加した。リアクター底部に空塔速度5 mm/秒で空気をスパージして、リアクター内での正しい溶解および正しい接触を確実なものとした。1時間の接触時間の後、リアクターを空にし、新鮮な水道水を流した。このクリーニング手順を2回繰り返し、最後に水道水充填－抜き取りサイクルを2回行った。

【0072】

2% w/v Diversol CX/A溶液を用いて廃ビール容器を清掃した。ガスリフトバイオリアクターとは異なり、WBTはスパージャーに適さないのでスパージングを行わなかった。この容器を横転させることにより機械的攪拌を行った。該サイクルを2回繰り返し、次いで、水道水充填－抜き取りサイクルを2回行った。

【0073】

蒸気滅菌の前に、50 Lのバイオリアクターを廃ビール容器に接続し、ガススパージ配管と同様に麦汁フィード配管をはずした。弁V10、V11、V12、V13、V14、V15、V16、V17およびV18を開け、フィルターF5、F6およびF7をはずした。これらのガスラインおよびフィルターを別個に121℃で15分オートクレーブした。蒸気供給ラインを弁V12およびV16に接続した。蒸気弁をゆっくりと開けて装置に体するダメージを最小にし、リアクター内部温度を綿密にモニターした。内部温度が100℃に達したてから1時間の滅菌を行った。弁V10、V11、V14、V15およびV18を先ず閉めた。次いで、蒸気供給を閉じ、滅菌済みフィルターF7を接続した。滅菌時 ¥ 済みフィルターF5およびF6を即座にガス供給ラインに接続し、空塔二酸化炭素ガス速度3 mm/秒から開始した。このガス流れはリアクターが冷却中に崩壊しないことを確実にするのみならず、50 Lのガスリフトバイオリアクター中に存在する空気を置換するものであった。

【0074】

内部温度が20℃に達した後、麦汁フィードラインをバイオリアクターに接続した。弁V2、V5、V10およびV14はまだ閉塞位置にあり、弁V6、V7、V8、V9、V11およびV15は開放されており、使用する麦汁供給ラインに応じてスチーム供給ラインをV3またはV6のいずれかに接続した。蒸気サイクルを1時間継続し、その後、蒸気供給に関する弁V9、V11およびV15を同時に閉じた。ラインが室温（20℃）に達してから、弁V3およびV6を閉じ、蒸気供給ラインをはずした。この時点で、麦汁供給ライン、50 Lのバイオリアクターおよび廃ビールタンクを含めた連続発酵システム全体が滅菌され、発酵準備が整った。

【0075】

5. 1. 3 発酵プロトコル

50 Lのバイロットスケールのガスリフトドラフトバイオリアクターを麦汁のビールへの連続的主発酵に使用した。グリコール熱ジャケットにより温度制御がなされ、発酵実験中15℃を目標とした。測定目的の温度プローブおよび温度サーモカップルならびにリアクターへのグリコールフィードを調節するためのグリコールソレノイド弁が各リアクターに装備された。初期混合ガス（二酸化炭素または窒素）ならびに酸素供給用の空気もガスリフト発酵装置に供給された。適切なロタメーター／ニードル弁の組み合わせを調節することによりガスの所望混合物を選択し、次いで、このガス混合物を滅菌フィルター（Millipore, Millex-FG₅₀, 0.2 μm Filter Unit）に通し、バイオリアクターのドラフト管中に

通した。空塔速度 0.39 m/sec (0.4 scfh) の空気をすべての発酵においてリアクターに注入し、初期混合ガス流速を個々の固定化タイプに適合するように調節した。

【0076】

連続操作モードを行う前の伝統的なバッチスタートアップに従って 50 L のガスリフトバイオリアクターをスタートさせた。セクション 5.2.1 に記載のようにクリーニングおよび滅菌した後、麦汁貯蔵タンク (WT1 または WT2) から 50 L の麦汁をガスリフトバイオリアクターに充填し、次いで 200 g/L の酵母を Scandi-Brew (登録商標) 滅菌サンプルポートから注入した。κ-カラギーナンゲルビーズの場合、 20 L のビーズをリアクターに注入し、LCC3021 中フロック形成酵母の初期濃度を 1 L 当たり 4 g とした。バイオリアクターから毎日サンプリングし、ダイアセチルの精製および液体の比重を綿密にモニターした。比重がその最小値に達し、ダイアセチル濃度が 30 mg/L 未満に低下したならば、システムの連続操作が可能であるとした。リアクターの底部から発酵培地 (麦汁) を連続的にフィードし、「若」ビールがリアクター頂上部の通風孔からオーバーフローした。リアクターの有効体積を固定したので、新鮮麦汁のリアクター中への流速により液体の平均滞留時間を制御した。液体試料をリアクターの滅菌サンプリング弁 (Scandi-Brew (登録商標)) から毎日抜き取って、化学的および微生物学的分析の両方を行った (方法は第 4 章に記載)。

10

【0077】

選択された時点において、連続発酵生成物を 50 L の主発酵バイオリアクターから大量に集め (40 L の滅菌ステンレス鋼カン)、後発酵プロセッシングに供して、工業的に管理されたビールとの評価および比較のための最終的な密封可能なビールを得た。選択された 50 L のバイオリアクターを廃ビール容器からはずし、即座に収集容器に接続した。所望の液体を集めたら、バイオリアクターを廃ビール容器に再接続した。管理された「若」ビールを後発酵に供して、液体のダイアセチルレベルを 30 mg/L 未満に低下させた。液体に伴う酵母を沈降させ、液体 (細胞濃度約 $1 \sim 5 \text{ 百万個/mL}$) を熟成させるために冷蔵した (2°C で 7 日間)。熟成期間後、液体を濾過し、アルコール分 5 体積% になるまで希釈し、二酸化炭素を吹き込み、次いで、 341 mL のビール瓶に詰めた。次いで、すべての充填された液体を Labatt のプラント装備によるパストライゼーションに供した。

20

【0078】

5.2 ゲルビーズの連続的製造方法

30

このセクションの実験研究の目的は、セクション 5.1 に記載した 50 L の連続ガスリフトドラフト管バイオリアクターに固定化 LCC3021 酵母細胞を供給するための、酵母を接種されたゲルビーズを得る連続的ビーズ製造方法を評価することであった。

【0079】

製造方法 (図 8) において、まず、スタチックミキサーを用いて非水性連続相 (植物油) と水性分散相と間のエマルジョンを得ることが必要であった。迅速冷却によりこの工程の後のポリマーのゲル化を誘発した。次いで、得られたビーズを塩化カリウム溶液中に導入し、硬化ならびに油相からのゲルの分離を促進した。

【0080】

37°C に制御された水浴中で κ-カラギーナンゲルビーズエマルジョンの生成を行って、カラギーナンの未成熟ゲル化を防止した。滅菌されたポリマーお温度調節水浴中で 37°C に維持し、固定化前は酵母種培養を 20°C に保った。Masterflex ペリスタリックポンプ (Cole Parmer Company, USA) を用いて、ゲルおよび酵母スラリーを直径 6.4 mm のスタチックミキサーの 24 個のエレメントにポンプで送って、ゲル中に細胞を均質に分散させた。室温にて貯蔵された滅菌済みの油脂を熱水浴中にポンプ (Masterflex ペリスタリックポンプ) で送り、やはり 37°C に達せしめた。

40

【0081】

次いで、もう 1 つのシリーズのスタチックミキサーにより植菌されたポリマー (水相) を油脂 (連続相) と混合して、所望のエマルジョンを得た。この得られたエマルジョンを氷水浴中で素早く 5°C まで冷却し、ポリマー液滴のビーズへのゲル化を促進した。次いで、

50

ビーズを 22 g/L の塩化カリウム溶液に入れ、硬化を促進し、油相から分離させた。そのプロセス油脂をリサイクルし、水相（ビーズおよび塩化カリウム溶液）を分離タンクに移し、サイズ分類してから 50 L のバイオリアクターに入れた。

【0082】

5. 2. 1 スタチックミキサー—Kenics型

この新規ビーズ製造方法で重要なのはKenicsスタチックミキサー（Cole Parmer Instrument Company, Niles, Illinois, USA）である。それらは、スタチックミキサーの直径に等しい内径を有する管中に配置された一連の固定されたエレメントから構成されている。これらのエレメントは交差した流路を形成し、それらはスタチックミキサーを通る液体の流れの分割および縦方向の組み換えを促進する。均質化しつつあるエマルジョン中のこれらの細かく作られた流れの横方向の断裂がこの混合システムによりさらに促進される。本研究に用いた3タイプのスタチックミキサーを表5. 2に示す。

10

【表6】

表5. 2 使用したKenicsスタチックミキサー(Cole Parmerから供給された)の説明

形式	スタチックミキサー直径D (mm)	エレメント数(N_r)
G-04667-04	6.4	12
G-04667-06	9.5	12
G-04667-08	12.7	12

20

【0083】

5. 2. 2 ゲル製造材料

ゲルビーズの製造における2つの主要な材料は油脂およびポリマーであった。κ-カラギーナン（タイプX-0909、ロット番号330360、Copenhagen Pectin, Denmark）は紅藻類から抽出された多糖類ポリマーであり、親切にもCopenhagen Pectin A/Sから供与された。このポリマーは温度によりゲル化するというユニークな特性を有し、そのゲル化温度はκ-カラギーナン（[Car]）および塩化カリウム（[KCl]）の両方の濃度に依存する。2.0 g/L のKClを含む80℃の蒸留水にポリマーを溶解して30 g/Lの濃度とした。得られたゲル溶液はゲル化温度28℃を有していた。ゲルを121℃で1時間オートクレーブし、次いで、40℃の水浴中に置いて、硬化しないようにした。市販グレードのトウモロコシ油（Pasquale Bros. Inc., Canada）も121℃で1時間滅菌し、次いで、使用するまで室温（20℃）で保存した。セクション4. 1に記載したように酵母スラリーを調製した。

30

【0084】

5. 2. 3 ビーズ直径の測定

5℃の熱交換器出口のビーズ試料を100 mLの22 g/L KCl溶液の入ったフラスコ中に集めた。ビーズをこの溶液に2時間浸して硬化を促進した。塩化カリウム溶液で連続的に洗浄することにより油脂を水相から除去した。次いで、試料を4℃で貯蔵して、分析前の微生物のコンタミネーションを防止した。

40

【0085】

ビデオカメラ（Pentax Macro 50 mm）にリンクした画像分析ソフトウェアOptimas (Version 4.02, BioScan, Inc, USA)を用いてビーズ直径の測定を行った。薄膜状の水（ビーズの分離に使用）を入れたペトリ皿にビーズ試料を移し、次いで、カメラの下に置いた。このシステムを用いて合計300ないし400個のビーズを測定した。Optimasソフトウェ

50

アの能力は100 μmから数mmまでで、最大絶対誤差は30 μmである。Optimasから得られたデータをMicrosoft Excelを用いてさらに分析した。試料の平均直径 (D_B) および偏差係数 (COV) により、得られた試料サイズを特徴づけた。

【0086】

5. 2. 4 ビーズシステムの評価－実験計画

試料の平均ビーズ直径およびサイズ分布の偏差係数により測定した場合にどのようなタイプのビーズの集団が得られるのかを調べるために、全部で3つのスタチックミキサーの直径 ($D_s = 6.4 \text{ mm}, 9.5 \text{ mm}$ および 12.7 mm) を比較した。スタチックミキサーのエLEMENT数 (N_s) は12ないし120ELEMENTの間であり、ポリマー体積フラクション ($\square_c$) を油脂溶液中8.3体積%ないし50体積%の間で調べた。50%よりも大きい $\square_c$ において、分散(ゲル)相および連続(油脂)相が逆転し、油脂マトリックス注のゲル液滴のかわりにいわゆるポリマーマトリックス中に油滴封入体ができる。エマルジョン部分を通る油脂/ゲルエマルジョンの空塔液体速度を3.6 cm/秒ないし17.8 cm/秒の間に調節した。エマルジョンスタチックミキサーを通る空塔液体速度 (V_{SL}) を下式により計算した:

$$V_{SL} = (Q_{oil} + Q_{car}) / S$$

式中、Sはスタチックミキサーに含まれる管の断面積であり、 Q_{oil} は油相の体積流速であり、 Q_{car} はカラギーナンゲル溶液の体積流速である。

【0087】

結果および議論: 50 Lのガスリフトバイオリアクター中の発酵および混合の動力学エタノール製造のための固定化細胞の使用はすでに公表されている。この20年間において、研究者らは固定化細胞法を連続プロセスと組み合わせることによりエタノール生産を最適化しようと試みてきた(Kuu, 1982; Gil, 1991; Maiorella, 1983)。多くの研究においてうまく成功し、エタノール製造のための連続固定化細胞システムの使用は工業化されてきた。しかしながら、ビール主発酵のための醸造工業におけるかかる連続プロセスの実行は単純ではない。ビールはエタノールのみならず、非常に多くの香気成分を含み、それらは最終製品に複雑さと深みの両方を付け加えている。以下の章において、パイロットスケールのGLDT発酵装置中においてバランスの良いビールの製造を目指した著者により得られた結果を説明する。

【0088】

6. 1 パイロットスケールのGLDTシステムにおけるバッチ発酵

自由に懸濁した酵母細胞を用いるバッチ発酵を、50 Lのパイロットスケールのドラフト管バイオリアクター中で行った。これらの試行は、麦汁からビールへの発酵のためのかかるシステムの使用可能性を評価する機会を与えた。さらに、該試行は連続発酵液との将来的な比較のための基準を確立するのに役立った。Labatt Culture Collectionからのラガー酵母株(LCC3021)を用いて50 Lのバイオリアクターにおける2つのバッチ発酵に着手した。酵母増殖速度ならびに栄養分の消費および生成物の放出を発酵期間中モニターした。

【0089】

図6. 1および6. 2は、それぞれバッチ発酵1および2に関する酵母濃度および生存率のプロファイルを示す。両方の例において、酵母の増殖は文献に報告されている古典的な速度に従った。メチレンブルーにより測定した生存率は一貫して高く、約90%付近の範囲を保った。バッチ1および2に関する炭水化物濃度プロファイルを図6. 3および6. 4に示す。単糖であるグルコースおよびフラクトースは最初に酵母に摂取され、次いで、マルトースおよびマルトトリオースが消費された。マルトトリオースならびにより大きな多糖類のレベルは発酵中は変化しなかった。エタノールは酵母の最も重要な代謝副産物である。最適化された嫌氣的な発酵により、100 gの代謝されたグルコースあたり約48 gのエタノールおよび47 gの二酸化炭素が生成されるであろう。少量のグリセロール(100 gのグルコースあたり3.3 g)も生成されるであろう。この副産物は発酵中の酵母の酸化還元バランスの維持ならびに特に高張培地中での浸透圧バランスにおける細胞の支

10

20

30

40

50

持に關与している。図 6. 5 および 6. 6 は発酵期間中のエタノールおよびグリセロールの濃度を示す。発酵培地中に酸素が存在したために酵母細胞が好氣的増殖フェーズとなったので、エタノールレベルは発酵初期において非常にゆっくりと上昇する。酸素が枯渇すると、発酵可能な糖類レベルがオフとなって枯渇するまでエタノールレベルは指数的に上昇する。ビシナルジケトン類も非常に重要な酵母発酵副産物である。バッチ 1 および 2 に関する全ダイアセチルおよびペンタンジオン濃度を図 6. 7 および 6. 8 に示す。これらの化合物は発酵物において約 40 時間までは増加し、酵母濃度のピークに対応しており、それは増殖期間中において酵母が始めたアミノ酸合成の結果である。発酵の後半において、ダイアセチル、ペンタンジオンおよびそれらの前駆体である α -アセト乳酸および α -ケト酪酸が酵母によってそれらの対応するより香気の少ないジオール類に変換される。このセクションに示した結果から、2つのバッチ発酵はガスリフトドラフト管バイオリアクター中で正常に進行したと思われる。酵母の増殖および炭水化物の取り込みは予想された筋道であり、副産物であるエタノール、ダイアセチルおよびペンタンジオンも同様であった。個々のバッチのデータの比較により、2つのバッチにより非常に類似した様式の発酵が行われたことが示される。図 6. 9 において、バッチ 1 および 2 からのエタノール濃度の比較が示されている。個々の曲線は同じプロファイルに従い、多くのデータ点が互いに重複し、再現性のレベルが示される。基質の消費と結果としての収率もガスリフトシステム中では変化がなく、発酵速度も変化がなかった。ピークエタノール濃度により示される主発酵の完了は、両方のバッチにおいて約 80～85 時間目で達成された。さらに 20 時間のうちにダイアセチルは 30 $\mu\text{g/L}$ に低下した。これらの結果は、高比重の麦汁の主発酵は、伝統的なバッチ式ラガー発酵が 120～168 時間であるのに対し、約 100 時間で完了しうること示唆するものであった。ガスリフトドラフト管バイオリアクターにより提供された攪拌は、かかるシステムによりエタノール物質移動が起こったため、この発酵時間の短縮に貢献した。この情報を用いて、ガスリフトドラフト管バイオリアクターは酵母の発酵代謝を有意には変化させず、このシステム中における自由に懸濁した酵母を用いる発酵はバッチ発酵時間を少なくとも 20 時間短縮できるという確信を持って、さらなる発酵試行を行った。

10

20

30

40

【表 7】

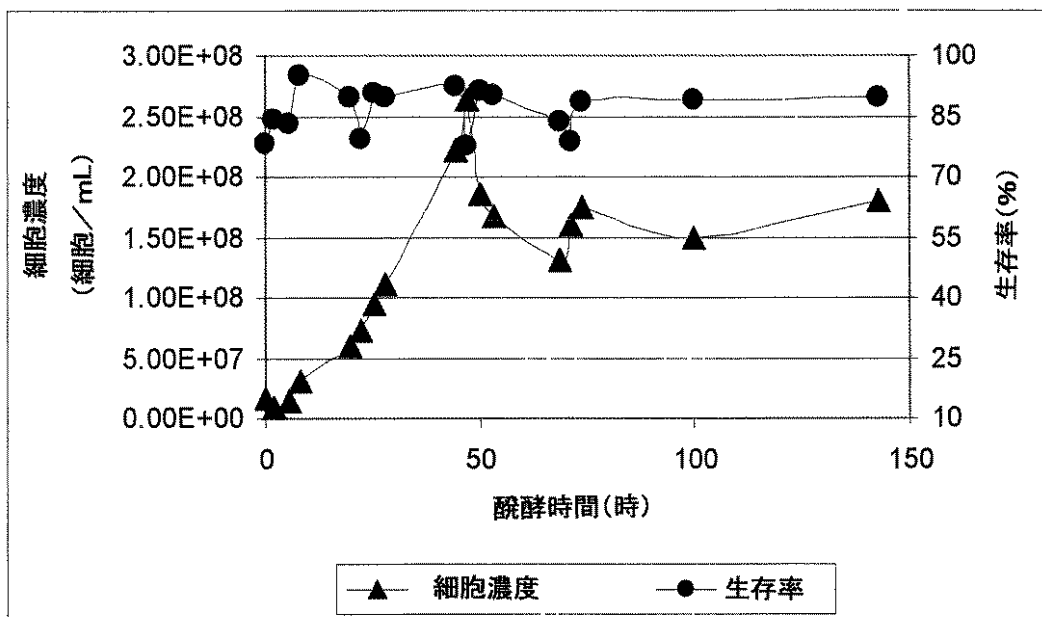
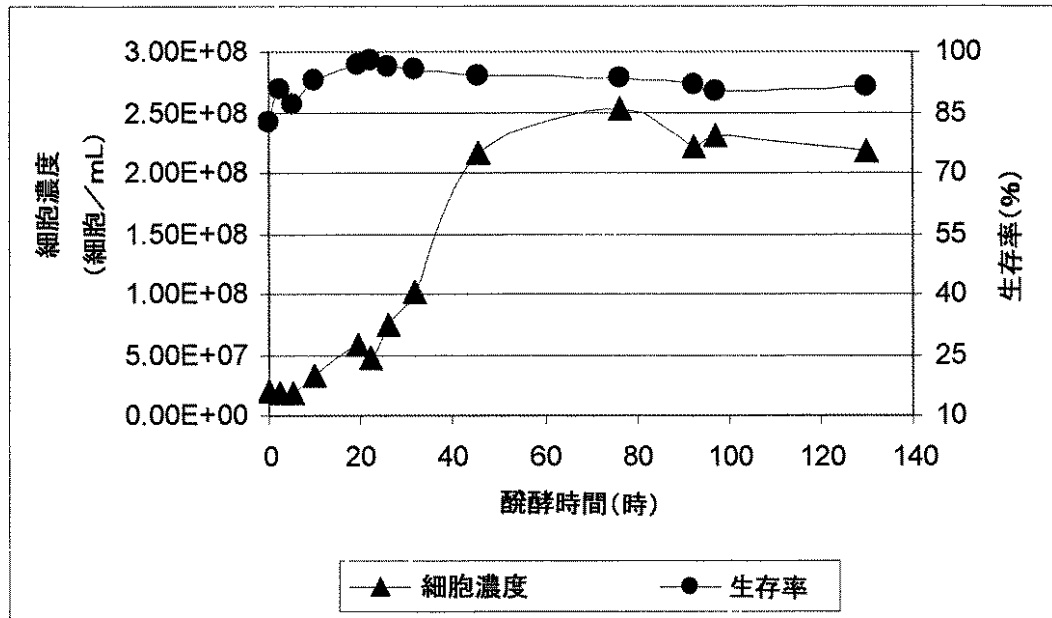


図 6. 1 パイロットスケールの GLDT バイオリアクター中の LCC3021 酵母バッチ発酵 1 に関する発酵時間に対する全細胞濃度および生存率

【0090】

【表 8】

50



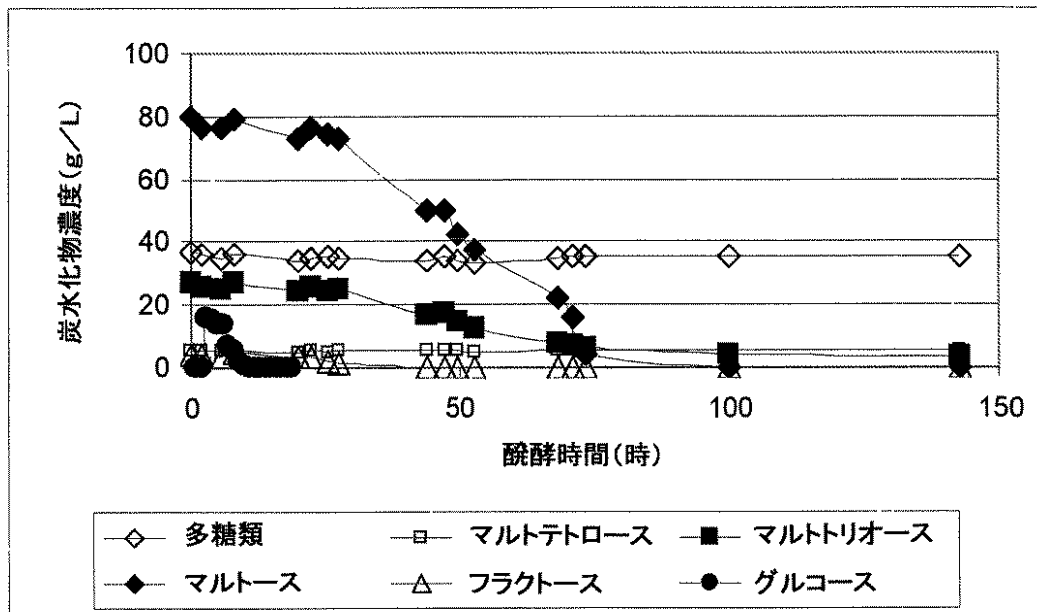
10

図 6. 2 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 1 に関する発酵時間に対する全細胞濃度および生存率

20

【 0 0 9 1 】

【 表 9 】



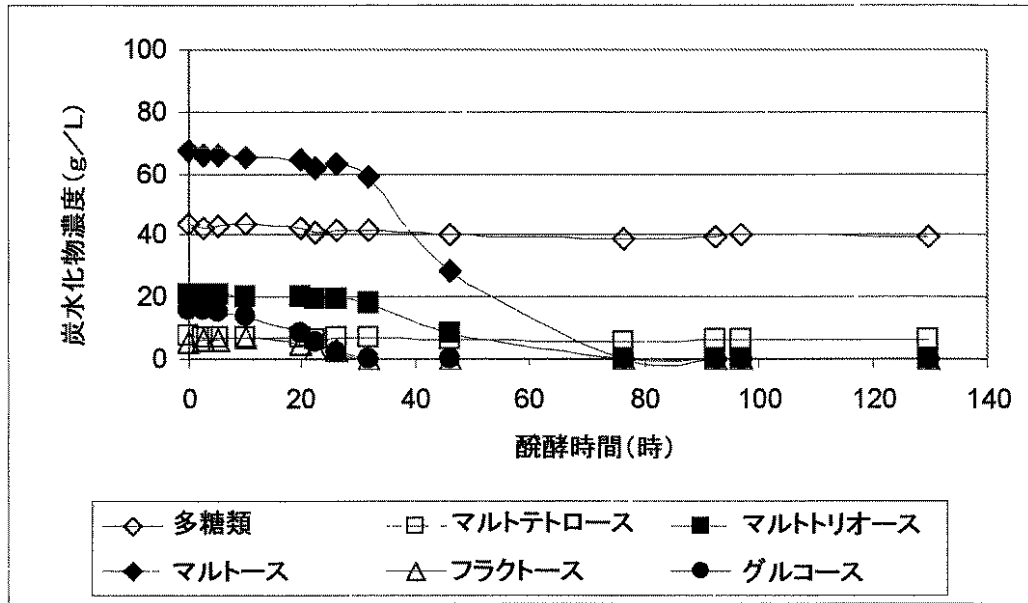
30

40

図 6. 3 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 1 に関する発酵時間に対する炭水化物濃度プロファイル

【 0 0 9 2 】

【 表 1 0 】



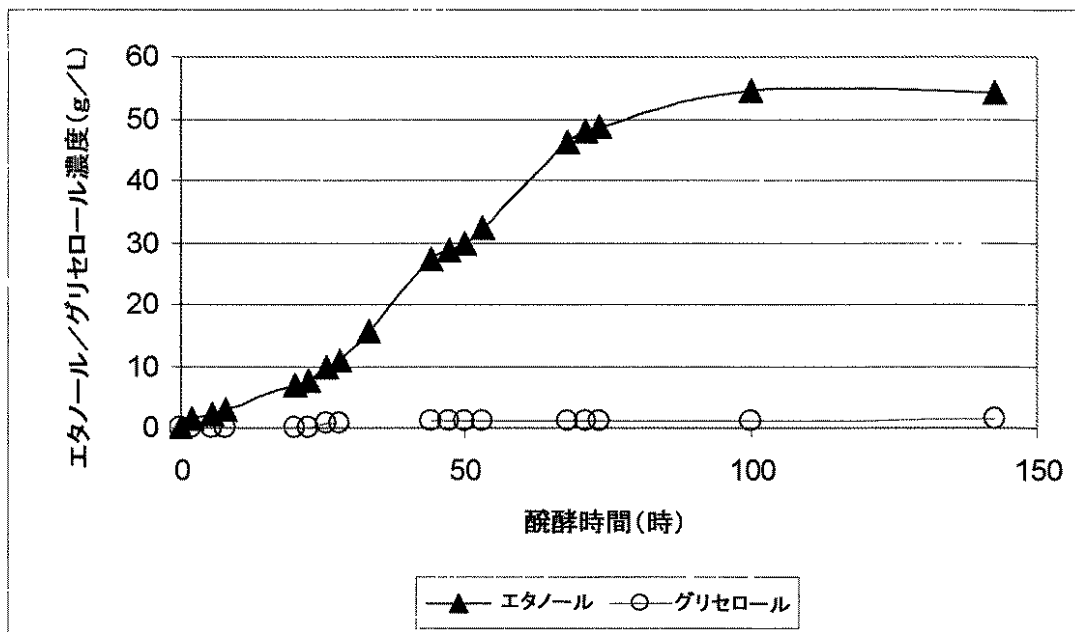
10

図 6. 4 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 2 に関する発酵時間に対する炭水化物濃度プロファイル

20

【 0 0 9 3 】

【 表 1 1 】



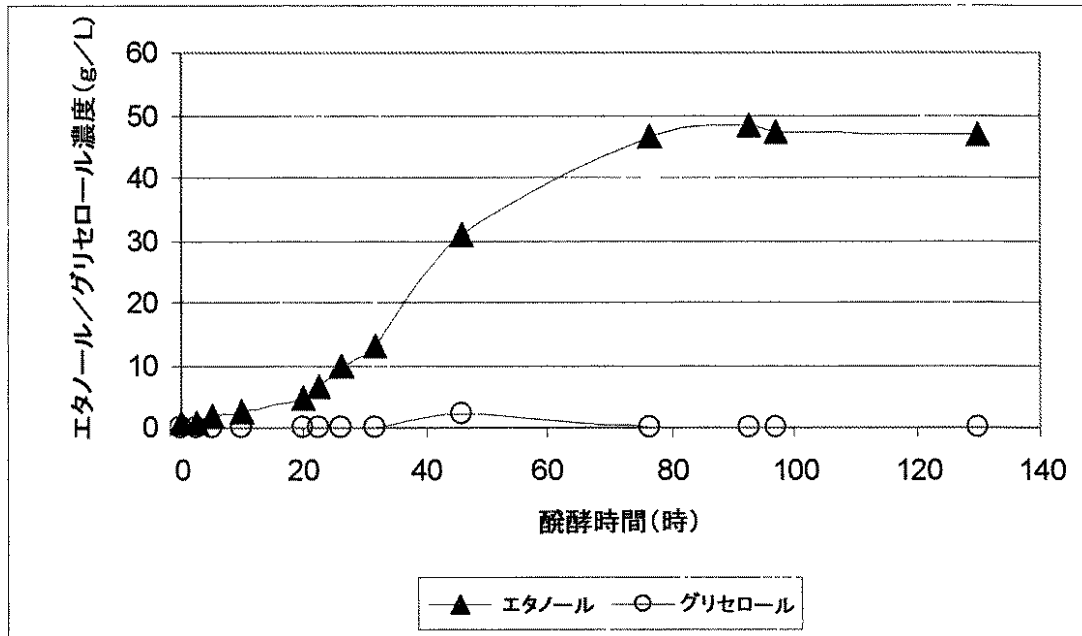
30

図 6. 5 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 1 に関する発酵時間に対するエタノールおよびグリセロール濃度

40

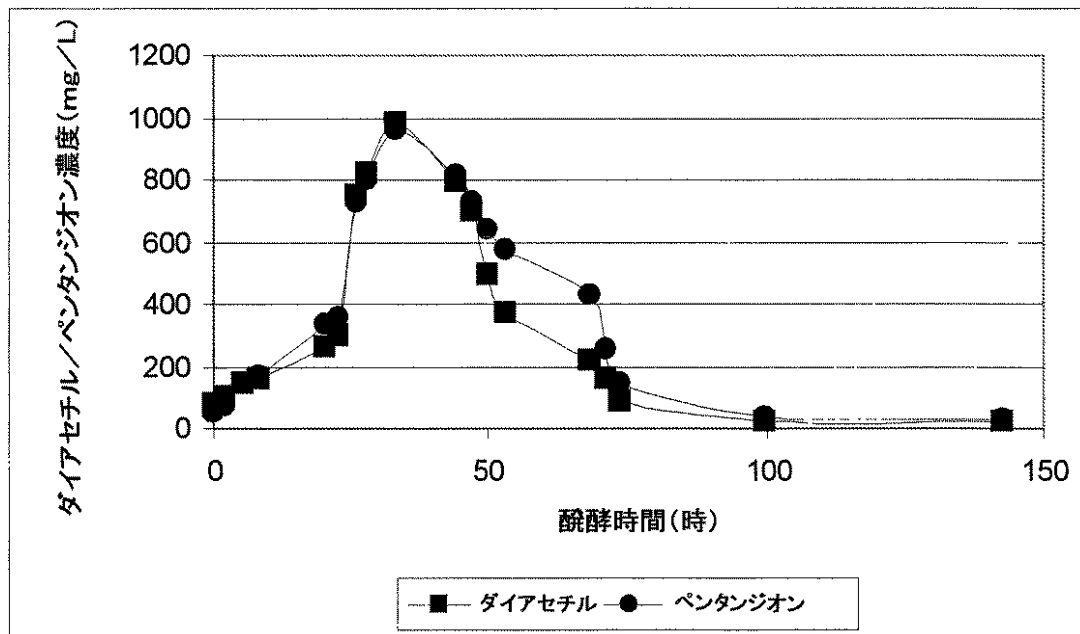
【 0 0 9 4 】

【 表 1 2 】



10

図 6. 6 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 2 に関する発酵時間に対するエタノールおよびグリセロール濃度
【 0 0 9 5 】
【 表 1 3 】



30

40

図 6. 7 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 1 に関する発酵時間に対するダイアセチルおよびペンタンジオン濃度
【 0 0 9 6 】
【 表 1 4 】

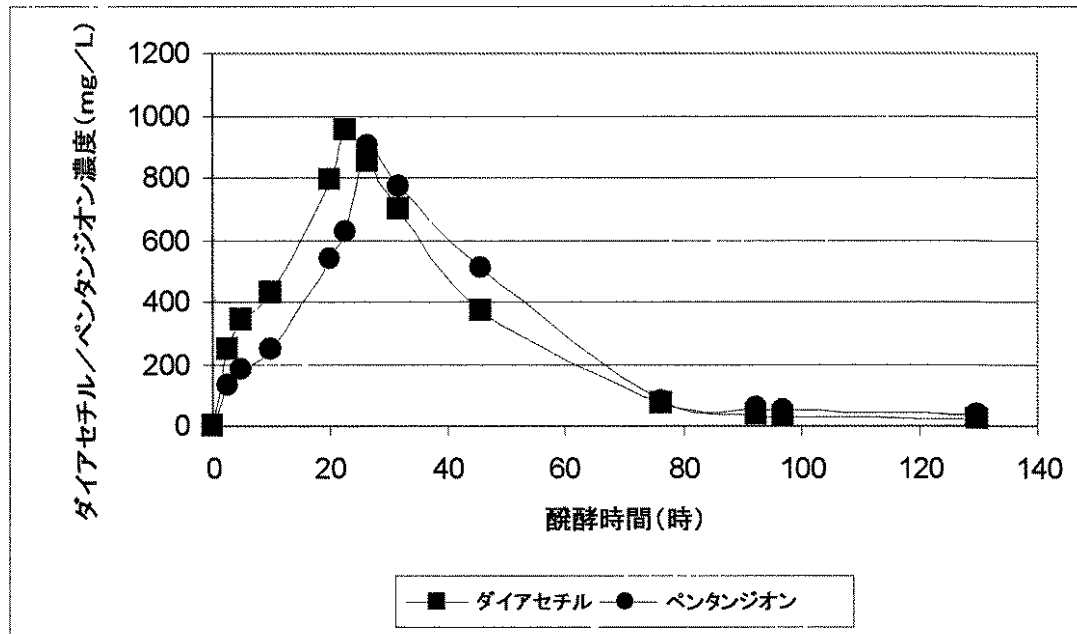


図 6. 8 パイロットスケールの G L D T バイオリアクター中の L C C 3 0 2 1 酵母バッチ発酵 2 に関する発酵時間に対するダイアセチルおよびペンタンジオン濃度
【 0 0 9 7 】
【 表 1 5 】

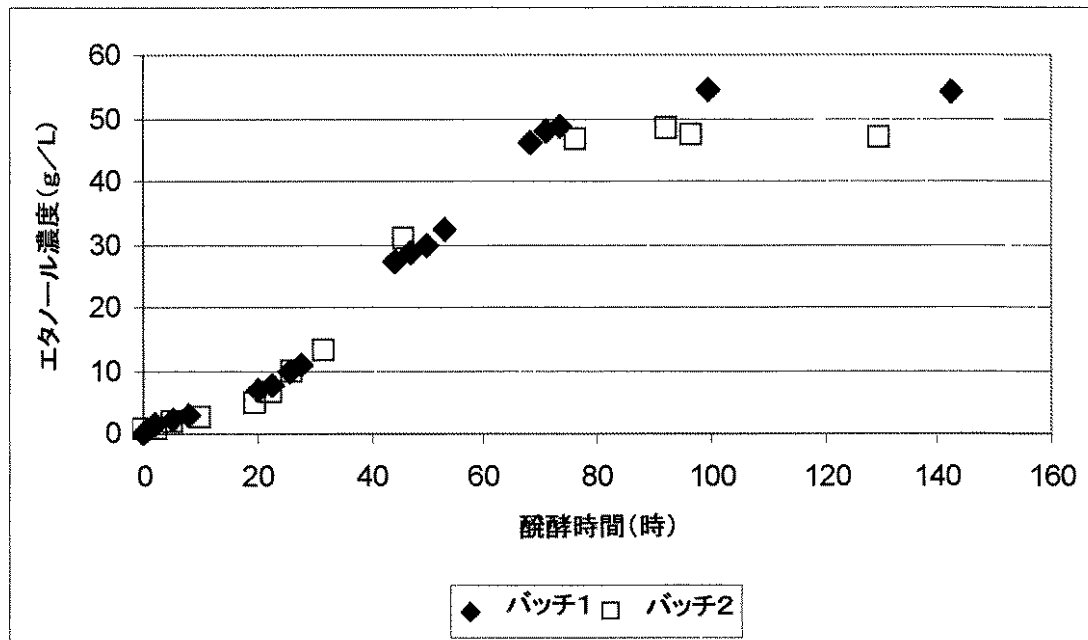


図 6. 9 発酵時間に対するバッチ 1 およびバッチ 2 のエタノール濃度比較。L C C 3 0 2 1 酵母をパイロットスケールの G L D T バイオリアクター中に使用した。
【 0 0 9 8 】

6. 2 固定化担体

この研究プロジェクトにおいて数種の担体を調べて、将来の開発研究のための最も有望性のある代替物を確認した。50 L のガスリフトドラフト管バイオリアクター中で 3 種の異なる固定化方法を試験した。1 ないし 2 mm の範囲のサイズを有する 2 種の市販吸着担体を評価した。Schott Engineering により提供されるガラスビーズ担体であるシラン（登録商標）（図 9）および World Minerals により提供される珪藻土ビーズであるセライト（登

10

20

30

40

50

録商標) (図10) を試験した。なぜならそれらは取り扱いが簡便であり市販されているからである。吸着担体はより無菌的な操作のための機会を提供する。なぜならリアクターに先ず担体を入れ、次いで、その場で滅菌し、最後に酵母をリアクターに直接植菌するからである。工業的見地からすると、担体を特に貯蔵する必要がなく、プラントにおいて植菌の慣習を大きく変化させる必要もないので、このオプションは非常に魅力的である。

【0099】

50 Lのガスリフトドラフト管バイオリアクター中のこれらの両方の担体を用いた最初の発酵の結果は好ましくなかった。生じた問題は主として液体培地に比べてシラン(登録商標)およびセライト(登録商標)の粒子が高密度であることに起因した。三相ガスリフトドラフト管システムは、担体と液体密度の比がほとんど同じである場合に最もよく作動する。シラン(登録商標)の場合の比は1.34であり、セライト(登録商標)の場合の比は1.31であった。固相と液相との間のかかる高い密度の相違を有する結果は50 Lガスリフトドラフト管バイオリアクターを操作するのに必要な最小ガス流動化速度(fluidization velocity)の有意な増加であった。4リットルのシラン(登録商標)担体(8体積%の固体をローディング)の場合、循環を起こさせるには21.5 mm/秒のガス速度(ドラフト管直径をベースにして)が必要であった。水溶液中で試験が行われる場合にはこの高いガス速度は大きな問題ではなかったが、液体培地が麦汁である場合にはすぐにガスリフトドラフト管(GLDT)システム中に壊滅的な問題が生じた。必要とされるガス速度によってリアクター中に過剰な泡立ちが生じ、それが最終的には液体のレベルをドラフト管以下にし、實際上液体および固体の循環を停止させた。かわりにセライト(登録商標)を固定化材料として用いた場合にも、シラン(登録商標)の場合と同様の失敗が生じた。これらの両方の結果により、ガスリフト発酵試行においてこれら両方の吸着担体の使用をやめた。

【0100】

κ-カラギーナンのような包括担体はシステムに40体積%の固体をロードすることを可能にし、その流動化およびその後の循環のために1時間あたり約0.17標準立法メートルのガス(空塔ガス速度5.8 mm/秒)が必要であった。カラギーナンにより包括された酵母細胞を用いてシステムを操作した場合、担体が低密度であること(約1100 kg/m³)およびその結果としての流動化の容易性により、積極的な結果が得られた。同様に、正しい循環を確実なものとするのに必要な約3 mm/秒のガス流動化速度の場合に自己フロック形成酵母LCC3021(中程度のフロック形成)およびLCC290(超フロック形成)を用いた所望の固体ローディングが達成された。セクション6.2.1には銅-カラギーナゲルのさらなる詳細が記載され、セクション6.2.2には、50 LのGLDT発酵装置中での連続主発酵のための固定化マトリックスとして評価された自己フロック形成酵母LCC3021のフロックおよびLCC290フロックが記載されている。

【0101】

6.2.1 □-カラギーナゲルビーズ

包括固定化法には発酵容器に導入する前に酵母細胞をマトリックス中に内包させることが必要である。この場合in-situリアクター植菌を行うことができないので、発酵開始前にこれらのゲルビーズを作成することが必要である。長期貯蔵により植菌されたゲルビーズにどのような影響が及ぼされるのかもやはり不明である。起こりうるネガティブな貯蔵効果を最小化するために、大量のゲルビーズを短時間(8時間)で製造することを決定した。それゆえ、セクション5.2に記載されたスタチックミキサービーズプロセスをこの目的に使用した。理想的なビーズは0.8 mmないし1.4 mmの粒子直径(D_B)を有し、サイズ分布の偏差係数(coefficient of variation, COV)が最小に保たれている。ビーズ製造プロセスの数個のパラメーターを調節して所望の量および一貫性のあるビーズを得る必要がある。以下のセクションはビーズプロセスパラメーターの選択の概要を示し、セクション6.2.1.2には連続発酵試行に使用したビーズを説明する。

【0102】

10

20

30

40

50

6. 2. 1. 1 ビーズ製造法：変数の選択

特に下記のプロセスパラメーターに関して他の研究者と協力してビーズ製造法の特徴付けに着手した：スタチックミキサー直径 (D_s)、スタチックミキサーのエレメント数 (N_s)、空塔液体流速 (V_{SL}) およびポリマー体積フラクション ($\square c$)。図 6. 1 2 から 6. 2 1 までは実験結果をまとめたものである。

【0103】

図 6. 1 2 は、カラギーナンゲル中に酵母を固定化するためのスタチックミキサープロセスを用いて得られた典型的なサイズ分布を示す。この実験において、以下のパラメーターを用いた：スタチックミキサー直径 12. 7 mm、スタチックミキサーエレメント数 60、空塔液体速度 10. 5 cm/秒、およびポリマー体積フラクション 0. 25。平均ビーズ直径は 701 $\square m$ と測定され、偏差係数は 45 % であった。図 6. 1 3 に示す累積サイズ分布は、試料平均および標準偏差を用いて計算された正規累積分布に合致するように思われた。de Kolmogorof Smirnov 法 (Scheaffer et McClave, 1990) を用いて正規性を試験した。実験データと適合データとの間の最大距離 (K-S statistic D) は 0. 0274 と計算された。正規分布に従うデータに対応する修飾 D 値は、95 % の信頼性レベルにおいて 0. 895 未満でなくてはならない。我々の場合、修飾 D 値は 0. 174 と計算され、限界の 0. 895 を十分に下回り、我々のデータが正規分布に適合すると結論できる。このビーズ製造プロセスから得られたすべてのデータは、ただ 1 つのピークを有するサイズ分布を示した。しかしながら、Poncelet et al. (1992) は、攪拌タンク中に分散させることにより製造されたアルギン酸ビーズに関して 200 μm よりも小さい直径のビーズに対応するサテライトピークおよび/または第 2 のピークの発生を示していた。我々のプロセスにおいて生じたより小さいビーズはビーズ洗浄工程において簡単に失われ、それゆえ、我々のサイズ分布のデータに現れなかった可能性がある。

10

20

30

40

【0104】

平均ビーズ直径およびサイズ分布の偏差係数に対する空塔液体速度およびスタチックミキサー直径の影響を図 6. 1 4 および 6. 1 5 にそれぞれ示す。3 つのスタチックミキサー直径すべてに関して平均ビーズ直径は空塔液体速度の増加とともに減少し、12. 7 mm のスタチックミキサーに対してより顕著であった。試験したすべての液体速度においてより小さい直径 (6. 4 mm および 9. 5 mm) のスタチックミキサーについては 700 $\square m$ よりも大きい平均直径を有するビーズは得られなかったが、12. 7 mm の直径のスタチックミキサーにより、11 cm/秒未満の液体速度において 700 $\square m$ よりも大きなビーズが得られた。3 つのスタチックミキサー直径すべてにおいて偏差係数が 68 % ないし 58 % のビーズが得られた。3 つの場合すべてにおいて速度が増加するにつれ偏差係数が減少するとも思われた。偏差係数はスタチックミキサー直径に伴って変化し、最小の直径のスタチックミキサーの場合に最小値が得られた。

【0105】

空塔液体速度 3. 5 cm/秒において、ポリマー体積フラクションは平均ビーズ直径に影響するように思われたが、約 7 cm/秒の速度では $\square c$ 実験値に相対的に違いはなく、0. 083 ないし 0. 5 の間であった (図 6. 1 6)。空塔液体速度を増加させた場合、ポリマー体積フラクションによる偏差係数に対する影響はほとんどないかあるいはまいように思われた (図 6. 1 7)。

【0106】

図 6. 1 8 および 6. 1 9 は平均ビーズ直径に対する空塔液体速度およびスタチックミキサーエレメント数の影響を示す。スタチックミキサーエレメント数を変化させたすべての場合において、液体速度が増加するにつれ平均ビーズ直径が減少した (図 6. 1 8)。一定の液体速度における平均ビーズ直径は 24 エレメントから 120 エレメントまでは同様であったが、12 エレメントの配列では試験した他の 5 つの配置よりも大きな直径のビーズが得られた。さらに図 6. 1 9 は上記 24 個のスタチックエレメントの場合に平均ビーズ直径が最小に達することを示す。

【0107】

50

図 6. 20 は、数種のスタチックミキサーエレメント数における偏差係数に対する空塔液体速度の影響を示す。試験したすべての配置において液体速度は偏差係数に影響しないと思われた。偏差係数に対するスタチックミキサーエレメント数の影響はさらに顕著なものであった(図 6. 21)。スタチックミキサーエレメント数の増加とともに偏差係数が減少し、60 エレメントおよびそれ以上において最小値 45 % に達した。これらの結果は、空塔液体速度が 3.6 cm/秒ないし 17.8 cm/秒の間であることと矛盾しなかった。

【0108】

スタチックミキサー直径 (D_s) の増加はせん断力の不均一性を生じさせ、偏差係数により測定されるサイズ分布の増加を引き起こすと仮定されていた。

10

【0109】

同時に、 D_s の増加はせん断力を減少させ、かくして、平均ビーズ直径を増加させるであろうとされていた。最小の直径のスタチックミキサーを用いた場合にこれらの両効果が観察され、最小の平均ビーズ直径 (400 μ m ~ 500 μ m) で最小の偏差係数 (約 40 %) またはサイズ分布を有するビーズが得られた。

【0110】

エマルジョンを形成するのに必要なエネルギーはポリマーと油相により形成される界面の面積に比例する。ビーズサイズが小さくなればなるほど、形成に必要なエネルギーは大きくなる。Berkman and Calabrese (1988) は、平均空塔液体速度 (V_s) の増加は液体の単位質量あたりの消費エネルギーの増加を引き起こし、かくして、ビーズサイズの減少に好ましいことを示している。平均空塔液体速度の増加 (3.6 cm/秒から 17.8 cm/秒の間で試験) により平均ビーズサイズの減少が起こった。かかる速度の増加はスタチックミキサー入り口と出口との間の圧力差を引き起こす。この圧力差は液体単位質量あたりの消費エネルギーに比例する。それゆえ、速度の増加はシステムの消費エネルギーの増加を引き起こし、そのことはビーズサイズの減少にとり好ましい。空塔液体速度が増加するにつれビーズ直径 D_B の減少が観察された。Al Taweel and Walker (1983) は、有意な乱流に対応する高速度の場合にビーズ生成とビーズ癒着との間に動的平衡が確立されることを示している。一定のスタチックミキサー直径 (D_s) およびエレメント数 (N_s) の場合には、空塔速度は偏差係数にほとんど影響しなかった。それゆえ速度は、サイズ分布を有意に変更することなく平均ビーズ直径を操作し選択することを可能にするパラメーター

20

30

【0111】

本研究の範囲において、カラギーナンゲル体積フラクション (ϕ_c) は平均ビーズ直径あるいは偏差係数にほとんど影響しなかったが、調べた最小の速度 3.6 cm/秒においてのみ、 ϕ_c の減少とともに平均ビーズ直径が減少した。Audet and Lacroix (1989) は、二相分散系 (バッチ攪拌タンクであり、連続スタチックミキサー法ではない) においてカラギーナンビーズの製造に関するこのパラメーターについて研究し、カラギーナン、3 % (w/v) のポリマー溶液の場合に ϕ_c は平均ビーズ直径に影響しないと結論した。ビーズサイズ分布に対する ϕ_c - カラギーナンゲル濃度の特別な影響が Audet and Lacroix (1989) により調べられ、彼らはこのパラメーターがサイズ分布に強く影響することを示した。ゲル濃度の増加は平均ビーズ直径 (D_B) および偏差係数 (COV) の増加を引き起こした。示された効果は、より高濃度のゲルの粘度増加によりエマルジョンに対するせん断力が低下し、かくして大きなビーズとなったことが原因とされた。ビーズのサイズに対するゲル濃度の影響はこの論文では調べられなかったが、必要ならばビーズのサイズを制御するためのもう 1 つの手段として使用できるであろう。

40

【0112】

混合エレメント数 (N_s) の増加は、液体要素がスタチックミキサー内にある平均滞留時間を増加させ、より均一な混合物を生じさせ、かくしてより小型で分散幅の小さいビーズが得られる。実験において、分散における平衡 (偏差係数により測定) は約 60 ないし 72 エレメントに達した。Middleman (1974) は、低粘度 (0.6 ないし 1.0 cP) のエマ

50

ルジョンの場合にはかかる平衡を達成するには10エレメントで充分であることを示している。これらの実験に使用したカラギーナン溶液（3%（w/v））は平均粘度200cpを有し、油相の粘度は25cpであった。結果として、このようなより高い粘度により、偽均一に達するためにはミキサー内部でのより長い滞留時間が必要であった。

【0113】

【表16】

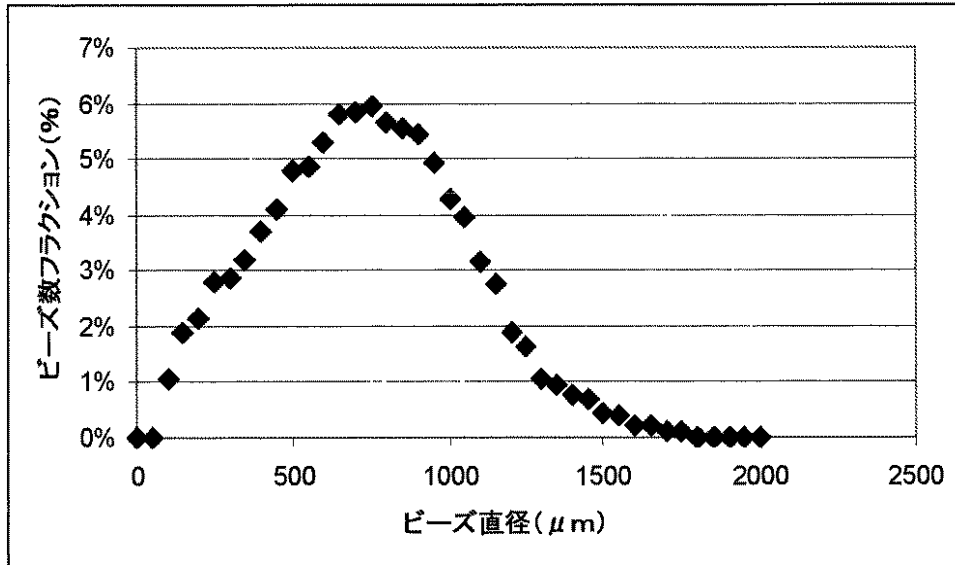


図6.12. スタチックミキサー法を用いて製造されたビーズの典型的なサイズ分布。この例におけるプロセスパラメーターは： $D_S = 12.7$ mm, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10.5$ cm/秒 および $\square_c = 0.25$

【0114】

【表17】

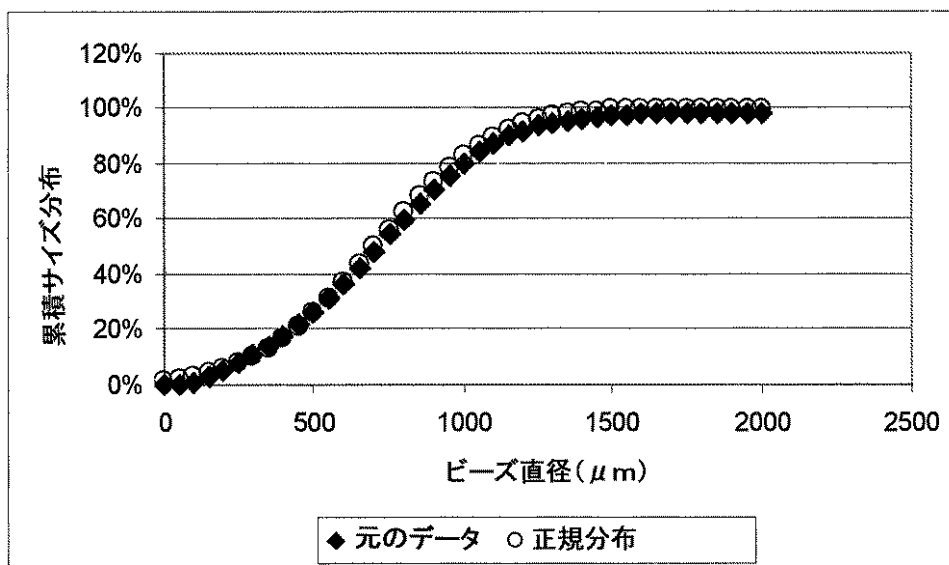
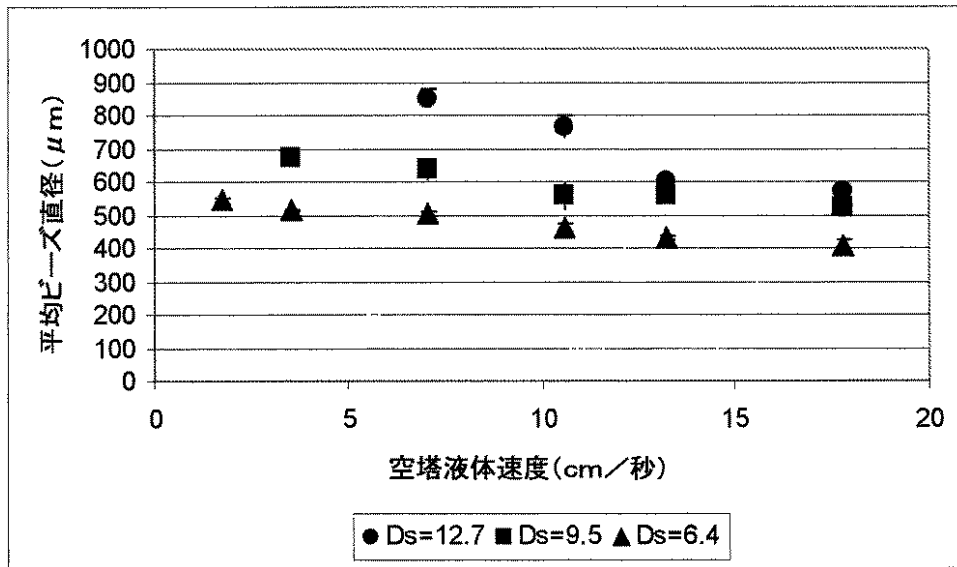


図6.13. スタチックミキサー法を用いて製造されたビーズの典型的な累積サイズ分布。この例におけるプロセスパラメーターは： $D_S = 12.7$ mm, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10.5$ cm/秒 および $\square_c = 0.25$

【0115】

【表18】



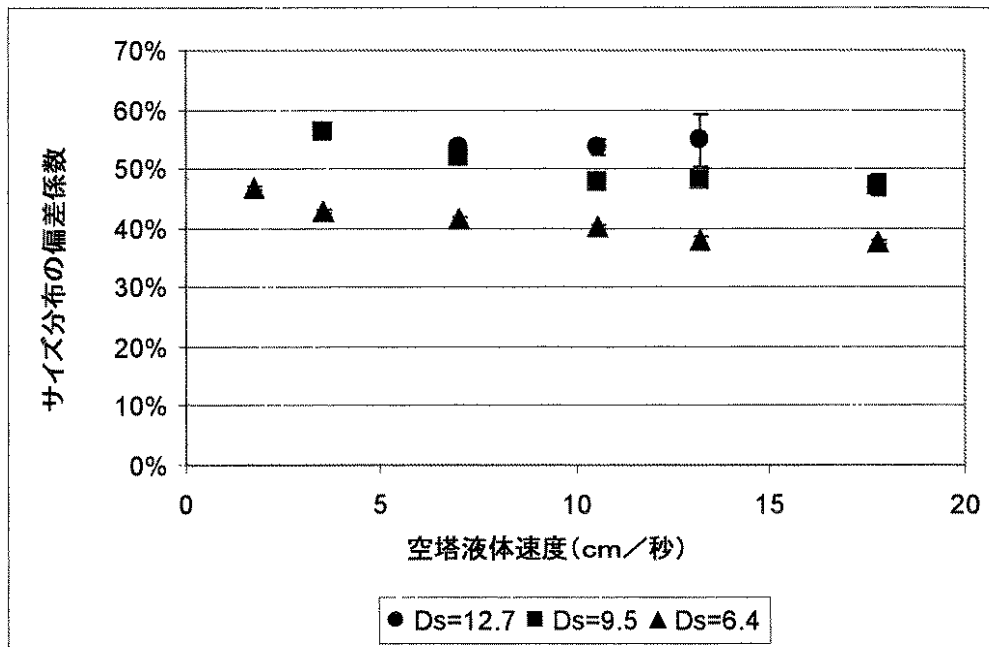
10

図 6. 1 4. 空塔液体速度 (c m / 秒) 対平均ビーズ直径 (μ m) 。 3 つの異なるスタチックミキサー直径 (D_s 1 2 . 7 m m 、 9 . 5 m m および 6 . 4 m m) を評価した。スタチックミキサーエレメント数 (N_s) を 4 8 の一定値に保ち、ポリマーフラクション ($\square_c$) を 0 . 2 5 にセットした。

20

【 0 1 1 6 】

【 表 1 9 】



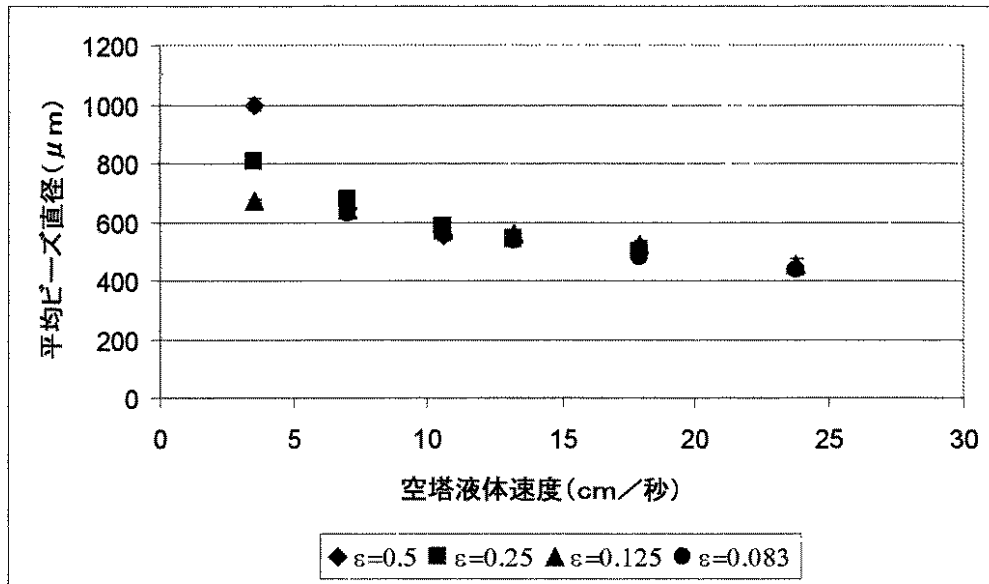
30

図 6. 1 5. 空塔液体速度 (c m / 秒) 対ビーズ直径の偏差係数 (%) 。 3 つの異なるスタチックミキサー直径 (D_s 1 2 . 7 m m 、 9 . 5 m m および 6 . 4 m m) を評価した。スタチックミキサーエレメント数 (N_s) を 4 8 の一定値に保ち、ポリマーフラクション ($\square_c$) を 0 . 2 5 にセットした。

40

【 0 1 1 7 】

【 表 2 0 】



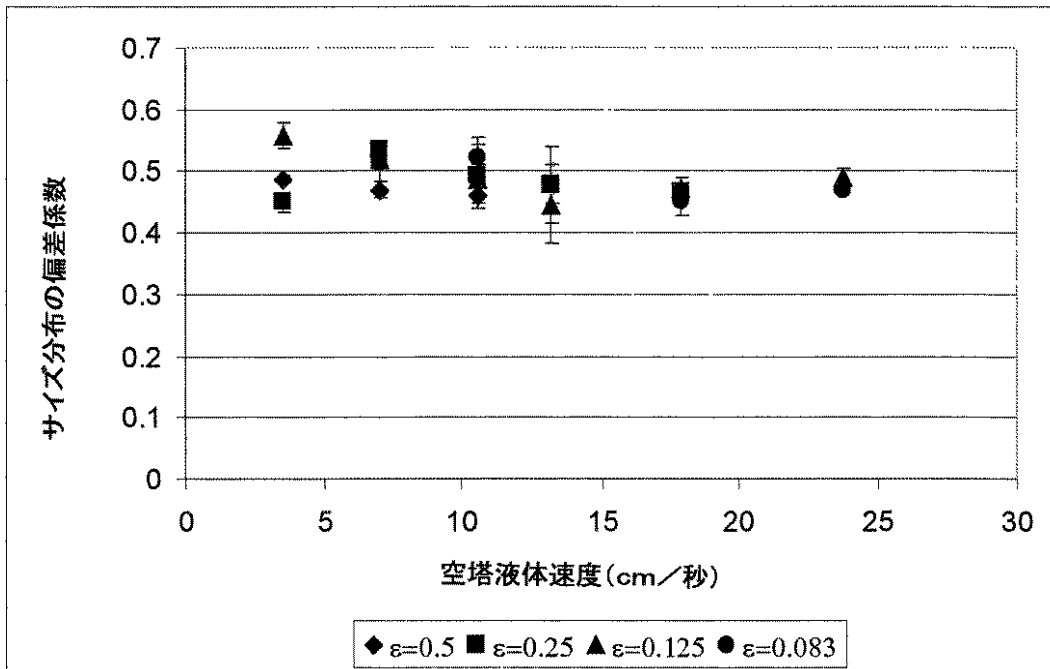
10

図 6. 1 6. 空塔液体速度 (c m / 秒) 対平均ビーズ直径 (□ m)。4 つのポリマーフラクション (□_c 0. 5、0. 2 5、0. 1 2 5 および 0. 0 8 3) を評価した。スタチックミキサーエレメント数 (N_s) を 4 8 の一定値に保ち、スタチックミキサー直径 (D_s) を 1 2. 7 mm にセットした。

20

【 0 1 1 8 】

【表 2 1 】



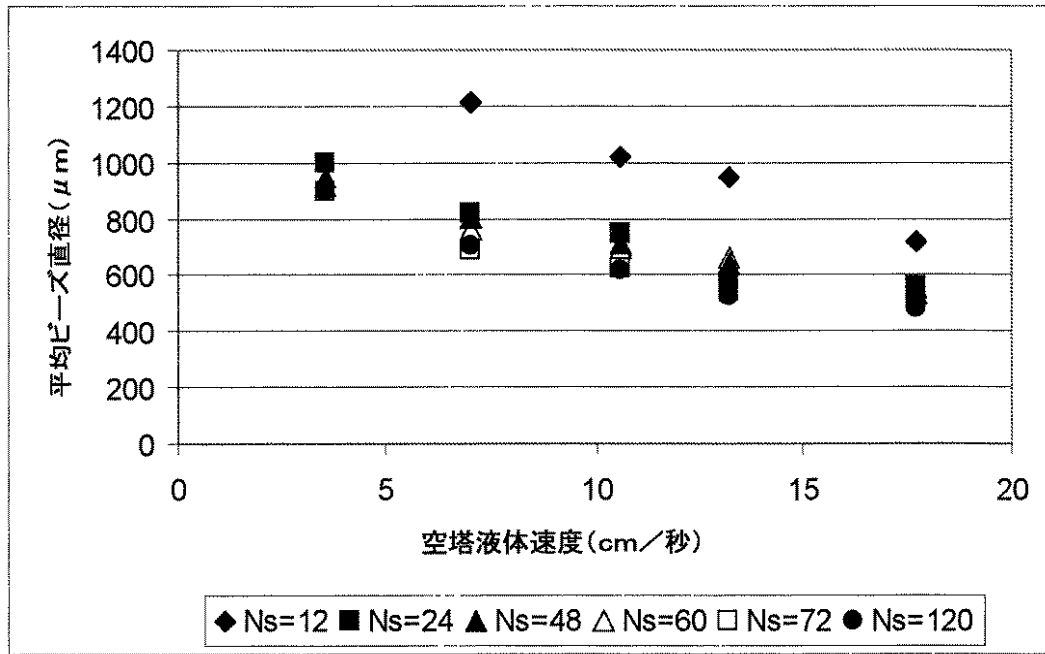
30

40

図 6. 1 7. 空塔液体速度 (c m / 秒) 対ビーズ直径の偏差係数 (%)。4 つのポリマーフラクション (□_c 0. 5、0. 2 5、0. 1 2 5 および 0. 0 8 3) を評価した。スタチックミキサーエレメント数 (N_s) を 4 8 の一定値に保ち、スタチックミキサー直径 (D_s) を 1 2. 7 mm にセットした。

【 0 1 1 9 】

【表 2 2 】



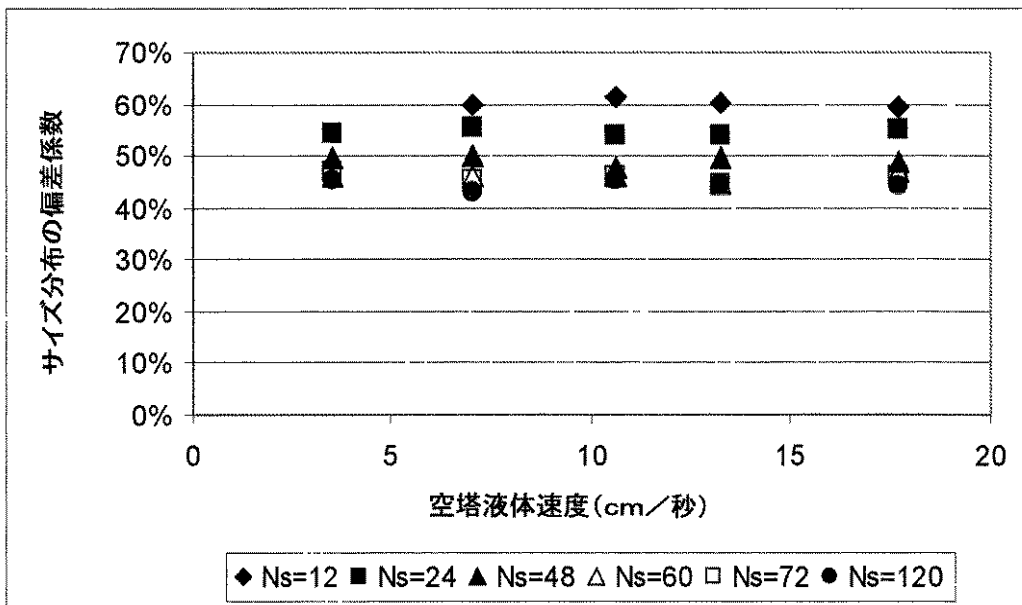
10

図 6. 18. 空塔液体速度 (cm/秒) 対平均ビーズ直径 (μm)。スタチックミキサーエレメント数 (Ns) を 12、24、48、60、72 および 120 に変化させた。ポリマーフラクション (φ_c) を 0.25 の一定値に保ち、スタチックミキサー直径 (D_s) を 12.7 mm にセットした。

20

【0120】

【表23】



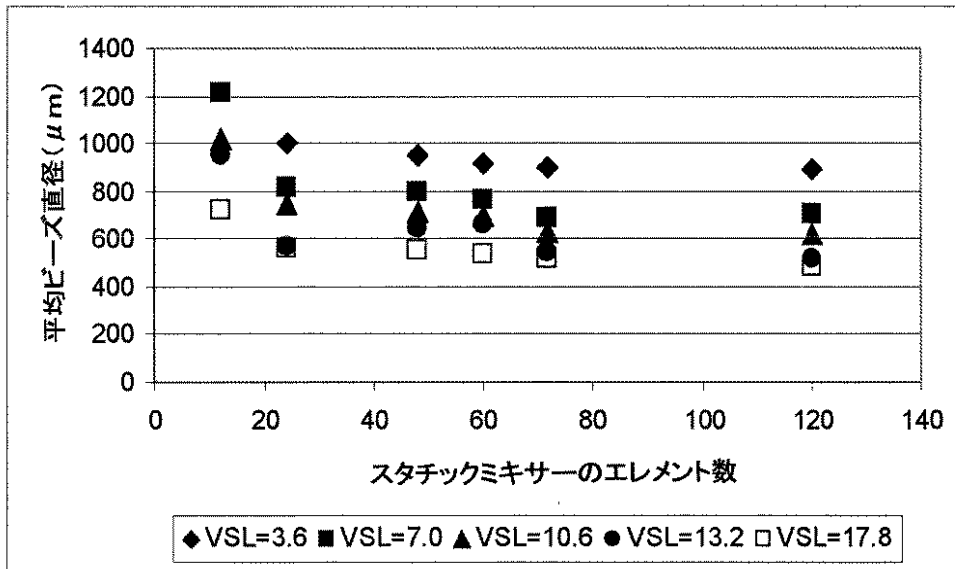
30

図 6. 19. 空塔液体速度 (cm/秒) 対ビーズ直径 (μm) の偏差係数。スタチックミキサーエレメント数 (Ns) を 12、24、48、60、72 および 120 に変化させた。ポリマーフラクション (φ_c) を 0.25 の一定値に保ち、スタチックミキサー直径 (D_s) を 12.7 mm にセットした。

40

【0121】

【表24】



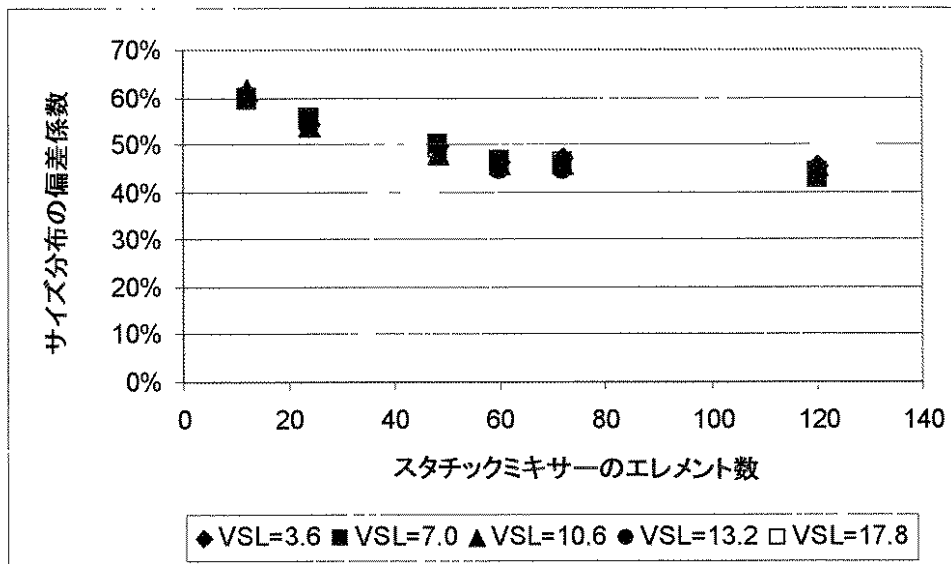
10

図 6. 2 0. 平均ビーズ直径 (μm) 対スタチックミキサーエレメント数 (N_s)。空塔液体速度 (cm/秒) を 3. 6、7. 0、10. 6、13. 2 および 17. 8 に変化させた。ポリマーフラクション (ϕ_c) を 0. 25 の一定値に保ち、スタチックミキサー直径 (D_s) を 12. 7 mm にセットした。

20

【0 1 2 2】

【表 2 5】



30

図 6. 2 1. ビーズ直径偏差係数 (%) 対スタチックミキサーエレメント数 (N_s)。空塔液体速度 (cm/秒) を 3. 6 および 17. 8 に変化させた。ポリマーフラクション (ϕ_c) を 0. 25 の一定値に保ち、スタチックミキサー直径 (D_s) を 12. 7 mm にセットした。

40

【0 1 2 3】

6. 2. 1. 2 ビーズ製造プロセス：□ーカラギーナンビーズの特性

前のセクションに記載したデータから、発酵試験に必要な特性を有するビーズを製造するためのビーズ製造プロセスのパラメーターを選択することが可能となった。特定のスタチックミキサー直径に関する偏差係数を最小にするために、60個の混合エレメントを選択して油ーゲル分散状態を作成した。約1mmの平均直径を有するビーズを選択して外部物質移動を最小化し、機械的手段により発酵液からの分離を容易ならしめた。これを行うために、試験した最大のスタチックミキサー (12. 7 mm) および試験した最低の速度 (

50

3. 6 cm/秒) を選択した。ポリマーフラクションは偏差係数にほとんど影響しないので、50/50 ($\square = 0.5$) の油対ゲル比を用いてビーズ生産性を最大化した。

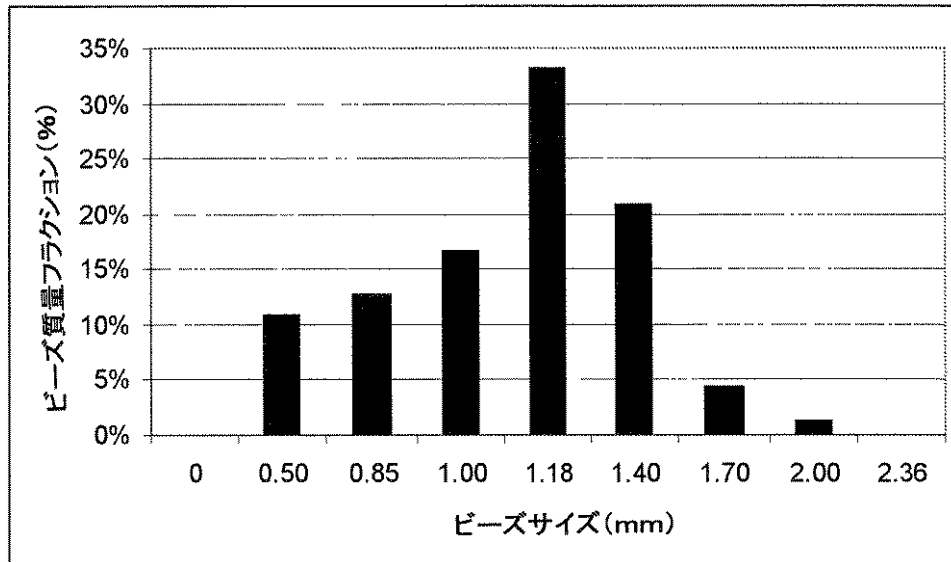
【0124】

セクション5. 2に記載の方法を用い、 $D_s = 12.7$ mm, $N_s = 60$, $V_{SL} = 3.9$ cm/s および $\square_c = 0.5$ として、LCC3021酵母を包括したゲルビーズの数個のバッチを研究室で製造した。得られたビーズ(図11)を一連のふるいに通して2.0 mmよりも大きいビーズおよび0.5 mmよりも小さいビーズを除去した。得られた粒子サイズ分布を図6. 23に示す。図6. 24はこれらのビーズの累積サイズ分布を支援す。これは50 Lのガスリフト発酵試験に一貫して使用された典型的な分布であった。

【0125】

【表26】

10



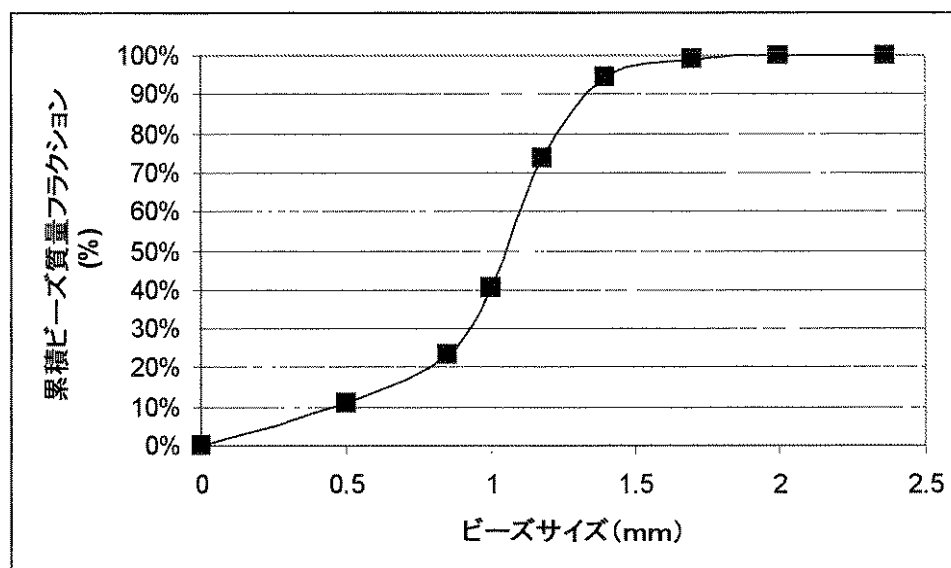
20

図6. 23 50 Lのガスリフトドラフト管バイオリアクター中の連続発酵試験に使用された κ -カラギーナンゲルビーズのビーズサイズ分布

【0126】

【表27】

30



40

図6. 24 50 Lのガスリフトドラフト管バイオリアクター中の連続発酵試験に使用された κ -カラギーナンゲルビーズの累積ビーズサイズ分布

50

【0127】

6. 2. 1. 3 工業的スケールへの応用に関するビーズ法の制限因子

1個のスタチックミキサーにて1時間で10Lのビーズを製造するプロセスを開発し、パイロットプラントレベルで実施した。工業的スケールでのビーズ製造が検討されるまでに、このプロセスのいくつかの態様はさらなる開発および／または最適化を要した。大規模なバイオリアクターにフィードする必要がある一定体積の固定化細胞を供給するには、システムの体積測定上の生産性の増加が必要である。例えば、2000-hLのガスリフトドラフト管バイオリアクターは約800hLのビーズを必要とするであろう。かかる体積を達成するためには、ゲル流速および油の両方の増加が必要である。データは、6.4mmないし12.7mmの直径のスタチックミキサーを用いて得られる速度の増加により小さすぎて発酵システムに使用できないビーズの形成が誘導されることを示唆する。それゆえ、スタチックミキサー直径を増加させ、かくして平均ビーズ直径を増加させることが必要となるであろう。しかしながら、より大きな直径を有するスタチックミキサーの使用は、ビーズサイズ分布も増加させ、所望範囲以外のビーズのパーセンテージが増加する。

【0128】

もう1つの方法は、並行に配置された中程度のサイズ(12.7mm)のスタチックミキサーを用いるシステムを実行することであろう。10のスタチックミキサーシステムを用いると、100L/hに達する生産性が想定される。2000-hLの工業的な例をとると、プロセスは800時間あるいは約34日間連続して作動して、所望体積のビーズを生じるであろう。いくつかのシステムを使用して製造時間を短縮することができたが、このことはさらに別のレベルの困難性を付加した。長時間にわたりビーズを貯蔵し、かつその間酵母を生存させておくことができれば、製造時間はあまり問題でなくなる。真空密閉容器中でのビーズ乾燥あるいはビーズ貯蔵のためのプロセスが開発できると思われる。Poncelletおよび共同研究者(1993年)らは、分散物を作成するための使用されるタイプのスタチックミキサーを考慮しなければならないことを示す研究を発表した。本研究に使用したKinicsタイプのものに対して別のタイプのスタチックミキサーを使用する彼らの提案したシステムを用いると、ビーズのサイズ分布の問題がなく(偏差係数は低く維持される)、より大きな直径のミキサーを使用することができるかもしれない。

【0129】

現状のパイロットプロセスに関するさらなる問題は、40℃でシステムを運転することならびに植物油および塩化カリウム溶液をビーズ製造に用いることを包含する。高い製造温度のため、加熱および冷却システムがプロセスに必要となる。酵母細胞がさらされる潜在的な熱ショックについてはさらに検討を行って、負の関連性に関して評価できるようにしてはならない。この研究において、高い酵母生存率(90%以上)を有する固定化細胞を得たが、プロセスが酵母集団に及ぼした可能性のある他の影響について検討しなかった。油を用いて所望エマルジョンおよびその後のビーズの製造を行ったので、そして油は界面活性剤として作用し、そのことにより泡立ちを抑制するので、ビーズ表面上の油の残存が問題となる。この残存は、発酵段階において役立つが、最終ビール中への混入が欠点である。なぜなら最終製品に泡立ちが必要だからである。油相から固相(ビーズ)を分離するために用いられる大きな体積の塩化カリウムならびにビーズをバイオリアクターに導入する前にビーズスラリーからこの塩溶液を除去するための方法には注意が必要である。さもなくば、ビーズをリアクターに入れた後にこの溶液をリアクターから流し去ることが必要となるかもしれない。

【0130】

固定化細胞ビーズはバイオリアクターの外で製造されるので、ビーズ製造プロセスを行っている間無菌的方法を用いなくてはならず、ビーズがバイオリアクターに導入されるまで滅菌状態を維持しなくてはならない。タンク間の種々の輸送ポイントはコンタミネーションの機会を与え、ビーズ中に同時固定化される汚染菌が存在するという事実のためにモニターされなくてはならない。研究室での熱心な研究の結果として、汚染のないビーズを一貫して得ることが可能になった。しかしながら、プラント設置中の環境は研究室ほど良

いものではなく、それゆえさらに厳密な管理が必要である。

【0131】

6. 2. 2 フロック形成酵母細胞

最も自然な形態の固定化の1つは微生物の細胞フロックへの自己凝集である。Calleja and Johnson (1977)は、細胞が互いに接触してすべて異なる結合特性を有する凝集体を形成するようになる3つの可能な理由を提案している。第1の理由はフェロモン（□およびα-因子）を分泌することにより互いに接着する異なる性別の細胞に関するものである。このタイプの結合は一時的なものであり、相補的な細胞壁に存在する□およびα-凝集素間の蛋白-蛋白結合に関連するものである。細胞は出芽プロセスの間に母細胞からの分裂不全により凝集する可能性もある。この不全は特定の酵母株に固有のものであるか、あるいは栄養分の枯渇または一定数の遺伝子の変異により生じさせることができる。この現象は鎖形成と呼ばれ、フロック形成ではない。これらの細胞間の結合は機械的なせん断力により不可逆的に破壊されうる (Stratford, 1996)。

10

【0132】

第3のシナリオはフロック形成としてより普通に知られているものである。Stewart and Russell (1981)はフロック形成を可逆的な「酵母細胞が固まりとなって接着し、細胞が懸濁されている培地から迅速に沈殿するか、あるいは培地表面に上昇する現象」として定義した。さらなる証拠は、一般的にはフロック形成は制御されるものであり、フロック形成機構は隣接する細胞壁間の架橋物として作用する選択された分子に依存することを示す。より詳細には、 Ca^{2+} イオンの存在下において隣接細胞の□-マンナンに特異的なレクチンが結合すると考えられる (Calleja and Johnson, 1977)。この蛋白/炭水化物結合は、キレート剤または特異的な糖類により可逆的に阻害されることがわかった。

20

【0133】

図12は3つの可能な酵母細胞の外形、すなわち、非フロック形成酵母、鎖形成酵母およびフロック形成酵母を示す。鎖形成酵母の場合、細胞は凝集するが、これらの細胞ははじめから1個ではないこと、ならびにフロック形成とは好ましい環境条件（ Ca^{2+} イオンおよび低レベルの阻害性糖類）のために単一の細胞が一緒になって固まりを作ることをいうので、フロック形成のタイプではない。フロック形成酵母の場合、個々のフロックのサイズは細胞の遺伝的要素ならびに細胞がさらされている流体力学的条件（せん断力のある条件）に依存する。

30

【0134】

図13および図14は、種々のフロック形成程度の2種のLabattのラガー酵母株を示す中程度のフロック形成酵母株 LCC3021 を図13に示す。カルシウムイオンの存在下において、この株は、液体培地からグルコースが枯渇すると0.5 mmないし1.0 mmの凝集体を形成するであろう。図14は超フロック形成酵母株 LCC290 の写真であり、この株は1 mmよりも大きいサイズのフロックを形成し、低せん断力条件下では凝集して直径5 mmまでの塊となるであろう。中程度に攪拌された条件下では LCC290 のフロック直径は1 mmないし2 mmの間であろう。

【0135】

酵母のフロック形成の評価のためのいくつかの測定法が提案されている (Speers & Ritcey, 1995; Akiyama-Jibiki et al., 1997; Teixera et al., 1991; Stewart & Russell, 2000)。"Brewer's Yeast" (Stewart & Russell, 2000)において、酵母フロック形成法をさらに3つに分類することが提案されており、すなわち沈降法、スタチック発酵法および増殖培地でのフロック形成直接観察法である。

40

【0136】

沈降法はBurnsにより1937年にはじめて記載され、1953年にHelmおよび共同研究者らにより改変され、現在、the Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992)により認められている標準的分析方法の一部となっている。この方法は、この方法は、実際の発酵培地中ではなくカルシウム-硫酸塩バッファー中で酵母の沈降特性を評価するため、インビトロ法とよばれている。

50

スタチック発酵法（Gilliland法としても知られる）は、ホップを添加した麦汁中で酵母を増殖させ、そのフロック形成特性をインビボで測定することを包含する。これらの方法はいずれも、脱フロック形成酵母試料に対する沈降酵母試料の吸光度をUV／可視分光光度計を用いて測定することを包含する。

【0137】

Stewart and Russell (2000)は、20 mLのスクリーキャップつきガラス瓶中で増殖した酵母の試料中に生じるフロック形成のレベルを可視的に記載することによる酵母のフロック形成測定方法を提示している。フロック形成の程度を表現するために、彼らは主観的な尺度、例えば、5－極端にフロック形成性、4－非常にフロック形成性、3－中程度にフロック形成性、2－弱いフロック形成性、1－あまりフロック形成性でない、0－非フロック形成性を用いた。超フロック形成性酵母株LCC290は分類4－非常にフロック形成性の評価であったが、LCC3021酵母は分類3－中程度にフロック形成性の評価であった。

10

【0138】

沈殿あるいは表面に上昇するという酵母本来の傾向がこのような酵母を発酵液から分離するための分離方法として通常に使用されているので、醸造工業においてフロック形成性は重要な特徴である。しかしながら、発酵が完了する前にフロック形成する酵母株は、液が理想的なアルコールおよび糖類のレベルに達しないため、望ましくない。連続発酵において、特にガスリフトドラフト管連続発酵において、フロック形成酵母は固定化マトリックスとし作用する。それらの沈降傾向がスパーキングガスを注入することにより補償され、スパーキングガスは酵母を懸濁状態に保つ。かかるシステムを用いると、固体粒子が連続的に循環し、発酵液との密な接触が保たれるので、液体培地の発酵不足の恐れは除去される。

20

【0139】

セクション6. 2. 2. 1において、超フロック形成性酵母LCC290の沈降特性および発酵品質が特徴つけられる。興味はこの特別な酵母株のフロック形成の開始を確認することにあった。さらに、酵母の沈降速度を決定して、酵母沈降容器を設計する際に将来的に利用できる価値のある情報を得た。

【0140】

6. 2. 2. 1 超フロック形成性酵母LCC290の特徴付け
ガスリフトドラフト管バイオリアクター中で酵母LCC290を用いて連続発酵を行う前に、研究室スケールの振盪フラスコ発酵において酵母を特徴付けることにした。図6. 28は酵母集団の経時的進展を示す。予想したように、最初の48時間で濃度が急激に上昇し、次いで、発酵終了時までレベルがわずかに低下していった。最初の48時間において十分な栄養分と酸素が麦汁中に存在したために酵母の増殖が可能となった。しかしながら、酸素不存在下で酵母が炭水化物を消費し続けるので、再増殖できなくなり、嫌気発酵期に入るのであろう。炭水化物供給が枯渇すると、酵母の小集団が死滅し始めた。この現象は図6. 29に示され、そこでの細胞生存率は約97%から90%を少し上回る程度にまで低下した。

30

【0141】

図6. 30は発酵経過における炭水化物消費を示す。酵母細胞は、先ず、単糖グルコースおよびフラクトースを消費し、次いで、マルトースおよびマルトトリオースを消費した。しかしながら、醸造用酵母はマルトテトロースあるいはより長鎖の多糖類（ポリ1および2）を代謝できない。全炭水化物濃度が低下するにつれ（図6. 31の比重曲線により示される）、エタノール濃度が比例的に増加した。発酵約37時間目でエタノールおよび炭水化物の濃度が等しくなった。

40

【0142】

増殖および炭水化物代謝の見通しから、超フロック形成酵母LCC290は工業的な酵母株LCC3021と同様に挙動すると思われた。発酵は、液体比重が約2. 7°Pに達すると完了するように思われた。発酵終了前に大きな塊（フロック）を形成し、溶液から沈

50

降することがフロック形成酵母に共通している。この現象は醸造業界では「ハング (hung)」発酵として知られている。我々のバッチにおいて、フラスコを攪拌し、それゆえ酵母を懸濁状態に保ち、栄養供給物と密着させておいたので、発酵を完了させることができた。

【0143】

検討したもう1つの重要な特徴は酵母のフロック形成能であった。特に、我々は、酵母が沈降する速度を確認し、そして個々の酵母株がいつフロック形成を始めるのかを調べた。これらの特徴はいずれも、ガスリフト発酵装置中に健康な酵母集団を維持する役割を果たすので、連続発酵試行にとり重要である。図6.32は発酵経過に対する酵母の沈降曲線を示す。試験した試料において、発酵から24時間においてはほとんど沈降が起らなかった。ある種の糖類の存在によりフロック形成が抑制される。グルコースは既知の阻害剤であり、それゆえフロック形成はこの阻害剤が枯渇してからでないと開始しない。40時間のバッチ発酵試料において細胞はフロック形成を開始し、セクション4.7に記載の方法を用いて試験した場合、溶液から沈降した。沈降が起らなかった24時間を除いて、試験したすべてのインターバルにおいて沈降は非常に早かった。40時間目に行った最も遅い試行の間、酵母は試験装置で完全に沈降するまでに90秒かかった。71時間目において、沈降には50秒もかからなかった。

10

【0144】

研究者は、沈降速度は固形物濃度の関数であると提案している (Coe and Clevenger, 1916)。図6.33は酵母細胞濃度に対して固形物の沈降速度をプロットしたものである。この曲線のためのデータポイントは、各発酵インターバルにおいて収集された沈降のデータに関して提案されたKynch (1952)により提案された法を用いて得られた。結果はほぼ同じ曲線となり、Coe and Clevenger (1916)と同じ現象が観察されたことが確認された。

20

【0145】

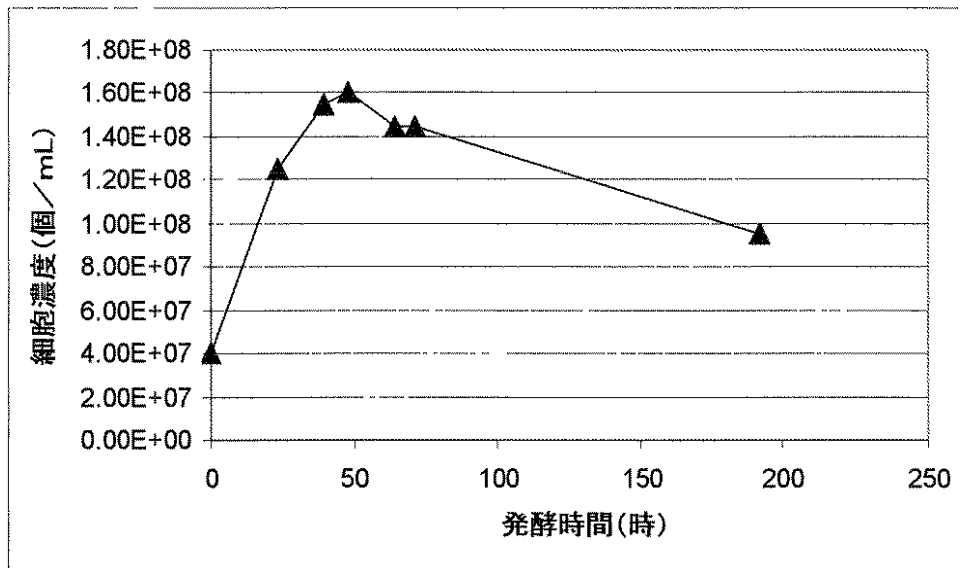
沈降試験中に収集された結果は、超フロック形成酵母株 LCC290 は比重 6°P およびそれ未満の液体中でフロック形成するであろうことを示した。細胞がフロック形成を続けることを望む場合に偽定常状態の液体の比重をどこで保つのかを示す連続発酵の指針としてこの値を用いることができる。 6°P よりも高いリアクターの操作はフロック形成細胞を不安定化させ、おそらく固定化酵母集団のウォッシュアウトを導く危険性がある。超フロック形成酵母の沈降特性は、停滞したままだと酵母集団が非常に早く沈降するであろうことを示す。三相ガスリフトドラフト管バイオリアクターを用いると、これらの細胞を循環させておくことが可能になるだろう。しかしながら、ガス供給システムがうまく作動しない場合には、細胞集団は迅速に沈降し、おそらく固形物を再懸濁させるために補助的なスパージガスが必要となるだろう。発酵後の処理のために、この迅速な沈降特性は有利である。なぜなら重力沈降装置のごとき固形物の分離デバイスを用いてバルク固形物を除去できるからである。醸造工業において、このことは遠心分離装置に対する固形物負荷を軽減し、それゆえ遠心ボウルからの排出間隔を長くできる。ビールの損失が少ないと考えられ、遠心分離によるオフフレーバーがビールに与える損傷レベルも少ないと考えられる (最小ではないとしても)。なぜなら遠心分離機を通過する酵母バイオマスのレベルが低いからである。

30

40

【0146】

【表28】



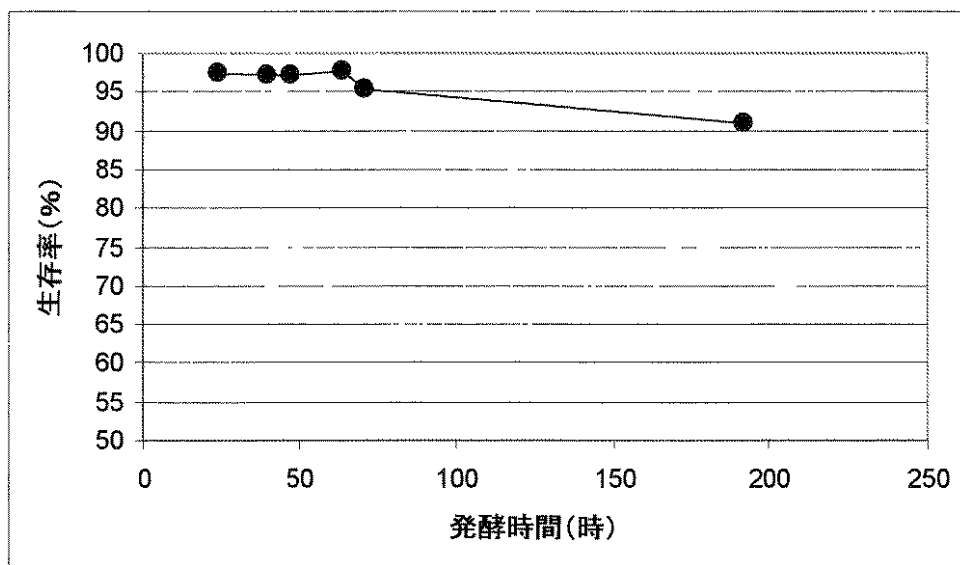
10

図 6 . 2 8 発酵時間に対する全 L C C 2 9 0 酵母細胞濃度。発酵温度を 1 5 °C に維持した。

【 0 1 4 7 】

20

【 表 2 9 】



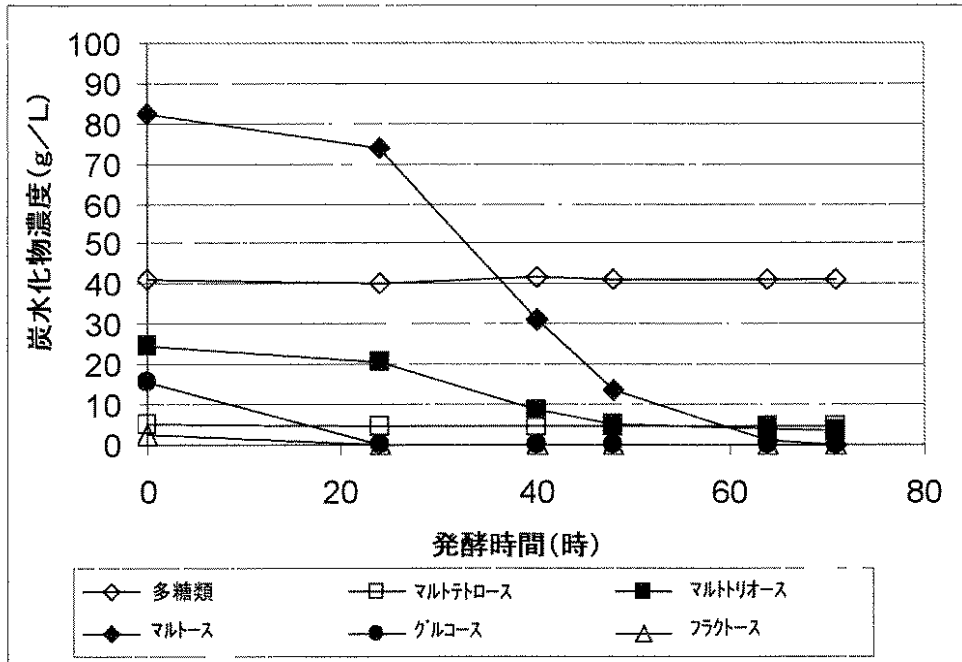
30

図 6 . 2 9 発酵時間に対するメチレンブルーにより測定された酵母細胞生存率

【 0 1 4 8 】

40

【 表 3 0 】

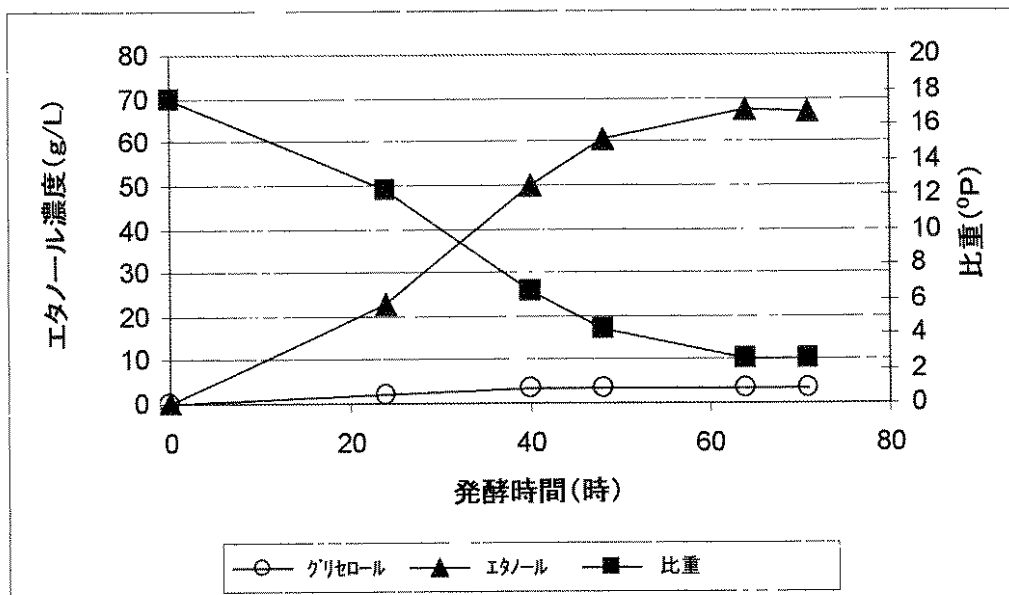


10

図 6. 30 LCC290 酵母バッチ発酵に関する発酵時間に対する炭水化物濃度プロファイル

【0149】

【表 3 1】



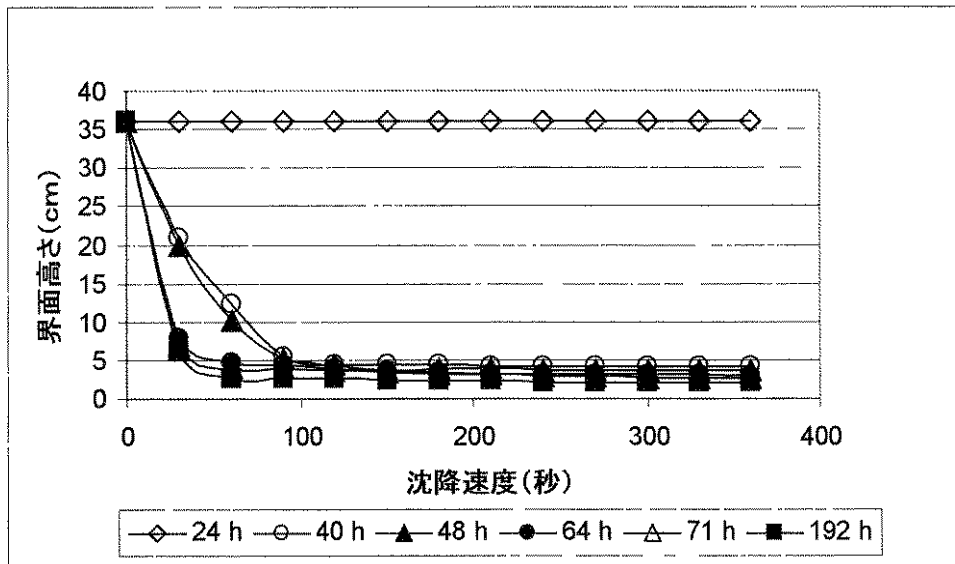
30

40

図 6. 31 LCC290 酵母バッチ発酵に関する発酵時間に対するエタノールおよびグリセロール濃度ならびに液体の比重

【0150】

【表 3 2】



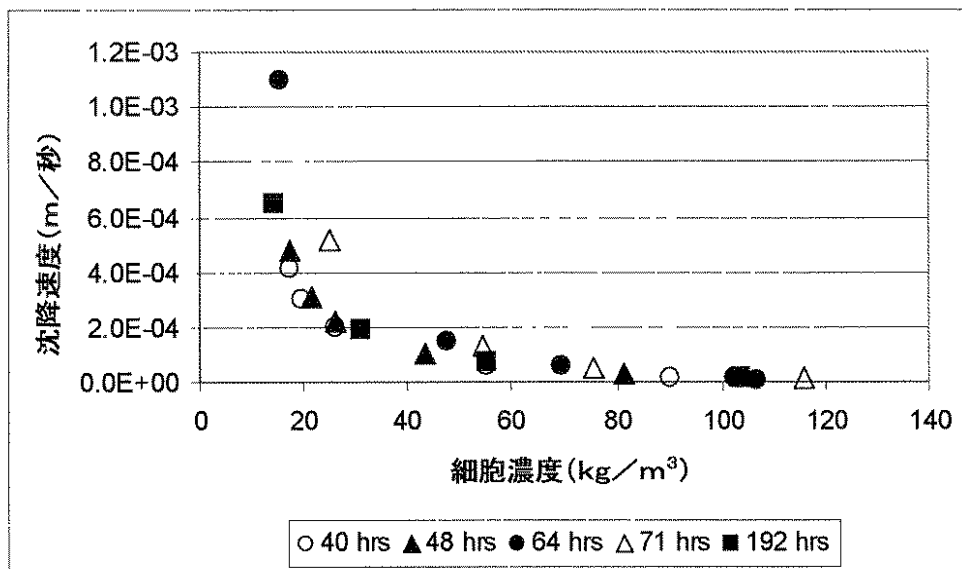
10

図 6. 3 2 沈降時間に対する酵母懸濁物の界面高さ。このチャートの値はいくつかの発酵インターバルにおいて収集された。

【 0 1 5 1 】

20

【 表 3 3 】



30

図 6. 3 3 細胞濃度に対する酵母懸濁物の沈降速度。このチャートの値はいくつかの発酵インターバルにおいて収集された。

【 0 1 5 2 】

40

6. 3 ビールの連続発酵に関するガスリフト法の評価

この研究の最初のかつ最も重要な目標は、*Saccharomyces carlsbergensis*細胞（セクション 6. 2. 1 にて説明）を包括するための□ーカラギーナンゲルビーズを用いた連続モードの 50 L のパイロットスケールのガスリフトバイオリアクターの操作可能性を評価することであった。さらに、許容できるフレーバー品質を有する北アメリカタイプのビールがかかるシステムにおいて得られるかどうかを調べるのが我々の目的であった。我々は、高比重麦汁の完全なアッテネーションに必要な滞留時間を決定し、連続発酵システム中の酸素に関する操作範囲を確認することも決定した。

【 0 1 5 3 】

すべての麦汁が消費される最小滞留時間は 24 時間であった。これを古典的なバッチ発酵

50

時間である5ないし6日と比較することができる。スパージングガスに酸素が添加されていた（0ないし20体積%）にもかかわらず、バイオリアクター中の定位置のインゴルド酸素プローブにより測定された溶存酸素濃度はほとんどゼロであった。このことは、麦汁に供給された酸素が酵母細胞により迅速に消費されたか、あるいは排出ガスとして出て行ったかのどちらかであることを示すものであった。ビールのオーバーフロー中の遊離細胞のレベルは若ビール1mlあたり 10^8 個のオーダーであった。ビシナルジケトン、ダイアセチルおよび2,3-ペンタンジオンならびにアセトアルデヒドのレベルは、スパージングガス中の酸素の割合の減少にともなって減少した（図6.34および6.35）。測定されたエステル（酢酸エチルおよび酢酸イソアミル）および高級アルコール（プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール）は酸素供給の変化の影響を受けないようであった（図6.36）。 10

【0154】

図6.37は、連続固定化細胞システムを用いて得られた2種の最終試験ビール中の種々のフレーバー化合物を、工業的に製造（遊離細胞バッチ発酵装置にて）された管理されたビールと比較するものである。酸素供給レベルに関係なく、エステル（酢酸エチル、酢酸イソアミル）および高級アルコール（プロパノール）におけるいくぶんかの相違が、連続発酵ビールと管理されたビールとの間に一貫して観察された。2%酸素を用いて製造された最終ビールの風味を経験を積んだ試験者により判定したところ、管理されたビール（工業製品）に比較的近いとされた。20%酸素を用いて製造されたビールは、酸化臭ならびに「紙のような」および「ワインのような」風味があり、許容されなかった。 20

【0155】

偽一定常状態において、パイロットスケールのバイオリアクターを24時間の滞留時間で6週間にわたり運転した。「若」ビールは許容されるフレーバープロファイルを有し、大きな欠点（イオウのようなオフノート）はなかった。スパージングガス中の酸素量がこの実験に重要な要素であることがわかった。スパージングガス中2ないし5%の酸素を用いて製造されたビールが最高の風味を呈した。この重要なコントロールポイントについては、大きなセットの発酵前およびは発酵後の分析物に対して行われる、より正確な酸素測定法による測定値に関してさらなる注意を払う必要がある。

【0156】

伝統的なバッチ主発酵において、発酵装置に移す前に、麦汁に酸素を供給する。培地をインキュベーションした後、酵母細胞が消費するので溶存酸素濃度は急速に低下する（酵母の増殖が起こる発酵の最初の24時間）。それゆえ、発酵の残りの部分はほとんど嫌気的条件下で行われる。連続的で均質なシステムを主発酵に使用すると、この経時的な酸素濃度変化が起こらない。このため、連続発酵およびバッチ発酵を用いて得られるビールの完全な風味の合致を達成することが非常に困難でありうる。これらの相違にもかかわらず、試験したバイオリアクターにより、この最初の評価において許容できるフレーバー品質および分析プロファイルのビールが得られた。比較的小さいサイズのビーズ（約1mm）とともにガスリフトバイオリアクターを用いることによって、主発酵時間を数日減らすことにより体積測定的なバイオリアクターの生産性を増加させることが可能となった。出てきたビール中に放出されたバイオマスのレベルは、固定化細胞バイオリアクター中で増殖した酵母のレベルが同様の条件下での遊離細胞バッチ発酵と同じレベルであることを示すものであった。これらの観察結果は、酵母増殖のレベルにフレーバー生成が依存することを確認するものである。このことは、制限された増殖の固定化細胞システムを用いる許容されうるビールの製造のための従来の試みの失敗を説明しうるものであった。制御されたガス混合物の供給は、連即固定化細胞発酵におけるビールの官能的特性の微細な調節における有力なツールでありうる。 30 40

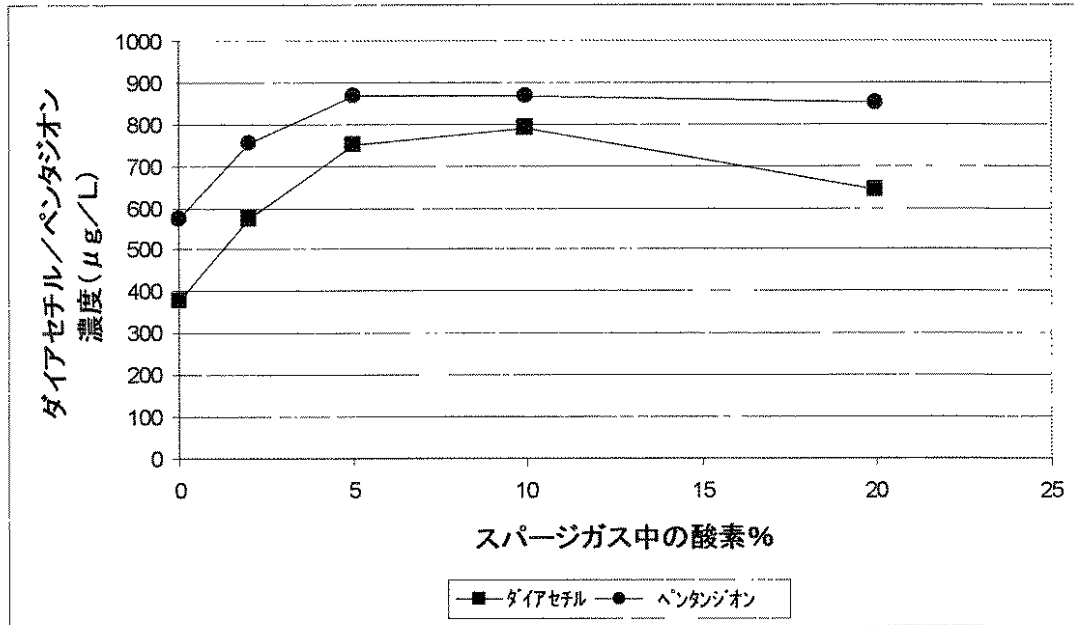
【0157】

液中に存在する高レベルのダイアセチルも他の研究者により観察された（Virkejärvi & Pohjala, 1999; Kronlof et al., 2000）。北アメリカタイプのビールにおいて、ダイアセチルの目標レベルは30□g/Lであり、一方、出てくる連続発酵液中に存在するレベル 50

は400～800 μ g/Lである。伝統的な熟成法（2℃で14日間の冷所熟成）を使用すると、ダイアセチルは所望範囲にまで減少したが、プロセス全体の生産性に悪影響を及ぼした。第2章で報告した迅速二次発酵法（2時間のプロセス）を使用すると、生産性を有意に低下させずにダイアセチルを減少させることができよう。しかしながら、さらなるコストが阻害要因であり、そのうえすべての醸造家は彼らのビールを高温（80℃ないし90℃）にさらすことを好まないであろう。

【0158】

【表34】



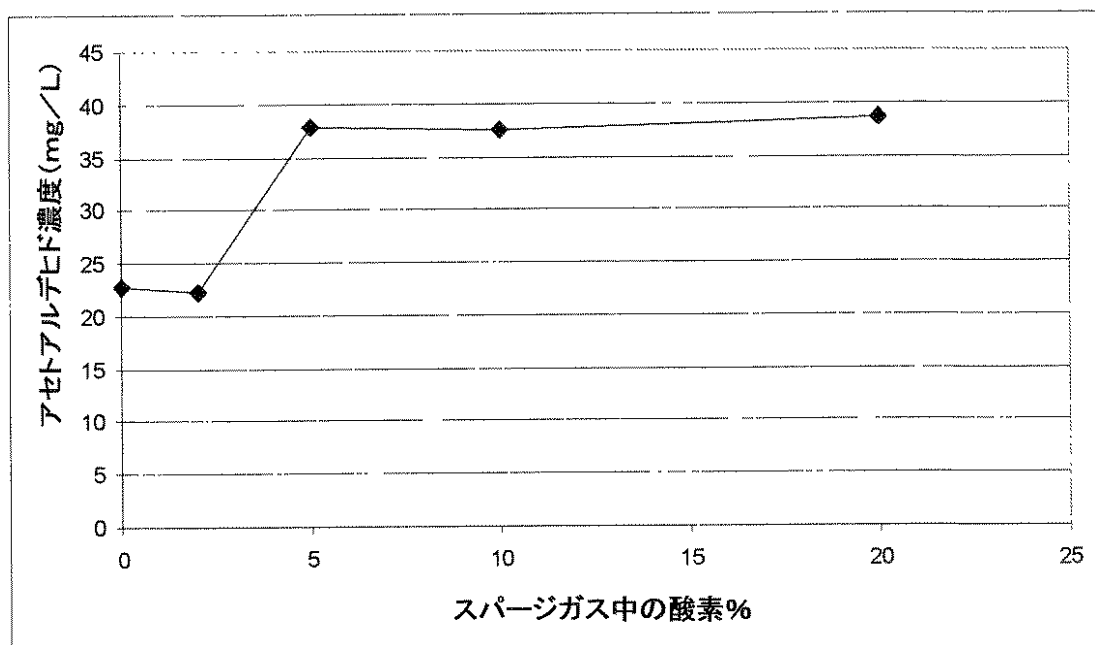
10

20

図6. 34 スパージガス中の酸素パーセントに対するピシナルジケトン類濃度。40体積%のカラギーナンゲルビーズを入れた50Lのガスリフトシステム中で発酵を行った。全ガススパージ速度を6.4 s c f hに保った。滞留時間は24時間であった。

【0159】

【表35】



30

40

図6. 35 スパージガス中の酸素パーセントに対するアセトアルデヒド濃度。40体積

50

%のカラギーナンゲルビーズを入れた50 Lのガスリフトシステム中で発酵を行った。全ガススパージ速度を6.4 s c f hに保った。滞留時間は24時間であった。

【0160】

【表36】

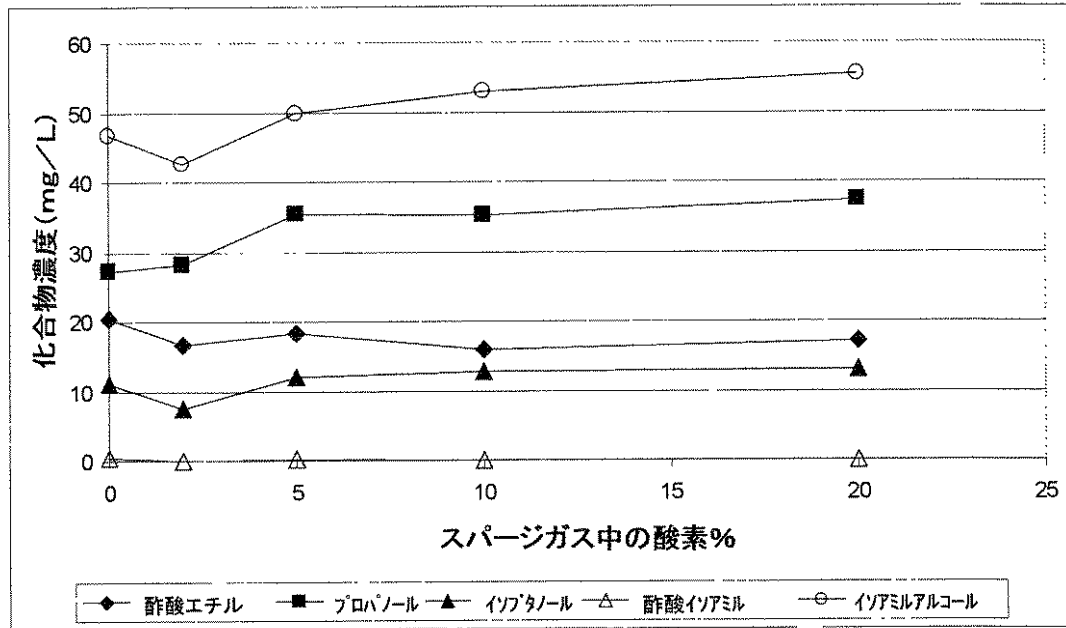


図6.36 スパージガス中の酸素パーセントに対するエステル類およびフーゼルアルコール類濃度。40体積%のカラギーナンゲルビーズを入れた50 Lのガスリフトシステム中で発酵を行った。全ガススパージ速度を6.4 s c f hに保った。滞留時間は24時間であった。

【0161】

【表37】

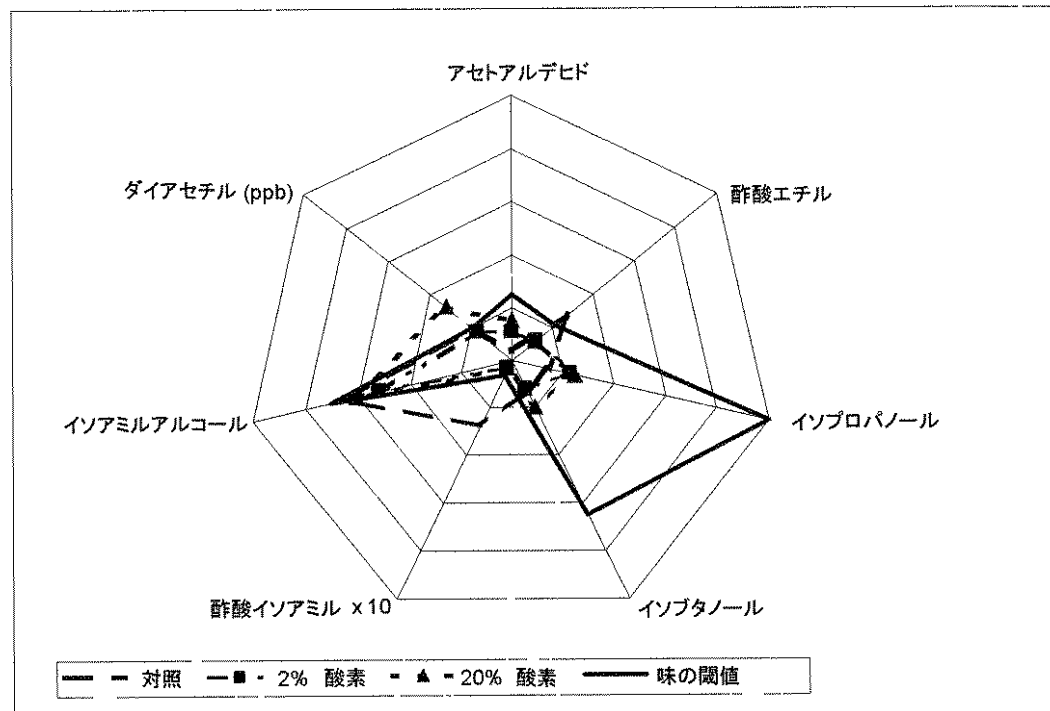


図6.37 スパージガス中2%酸素および20%酸素を用いて製造された最終製品と工業的に製造されたビールとの比較ならびに風味の閾値。連続発酵製品については、40体積%のカラギーナンゲルビーズを入れた50 Lのガスリフトシステム中で発酵を行った。

全ガススパージ速度を 6.4 s c f h に保った。滞留時間は 24 時間であった。

【0162】

6.4 三相ガスリフトドラフト管バイオリアクター中の発酵物の混合および循環速度
セクション 4.8 に概説した酸注入法を用いて混合実験を行った。この実験の目的には 2
つの要素があった。我々は、異なる空塔流動化ガス速度において多くの固定化担体に関し
て液循環速度および得られる混合速度を計算することによってガスリフトシステムが十分
に混合されるかどうかを調べようと考えた。文献で報告された試行とこれらの試行との区
別は、すべての実験がモデル溶液（水-固体-ガス系）ではなく生きた酵母細胞を含む実
際の発酵培地に関して行われたことであった。これらの混合実験は空塔速度を計算するた
めのものでもあり、空塔速度を用いてパイロットシステムを将来スケールアップすること
ができた。 10

【0163】

6.4.1 プロブのキャリブレーション
セクション 4.8 において説明した方法を用いて混合の研究に使用した pH プロブをキ
ャリブレーションした。pH プロブから発せられる 4~20 mA のシグナルを 250 オ
ームの抵抗に通し、1~5 ボルトのシグナルに変換し、これをデータ獲得カード（DAC）
に記録することができた。pH プロブを下記の一連のバッファー：pH 4.6 のバッ
ファー、pH 4.0 のバッファー、pH 5.0 のバッファー、pH 6.0 のバッファーに
順次浸し、最後に pH 7.0 のバッファー（Beckman certified standards, Cole Parmer）
に浸した。図 6.38 は、5 つの標準 pH 溶液に対する Ingold pH プロブの応答に 20
関して獲得システムにより収集されたデータを示す。図 6.39 は、測定されたシグナル
電圧に対して実際の pH 値をプロットした pH プロブキャリブレーション曲線である。
このシステムのベストフィットキャリブレーション曲線（相関係数 0.9996）を下式
により定義した：

$$\text{pH} = 3.68 * \text{電圧} - 3.53 \quad (6.1)$$

等式 6.1 を用いて収集した混合のデータを変換して、ガスリフトバイオリアクター内部
で測定された pH 値を反映させた。

【0164】

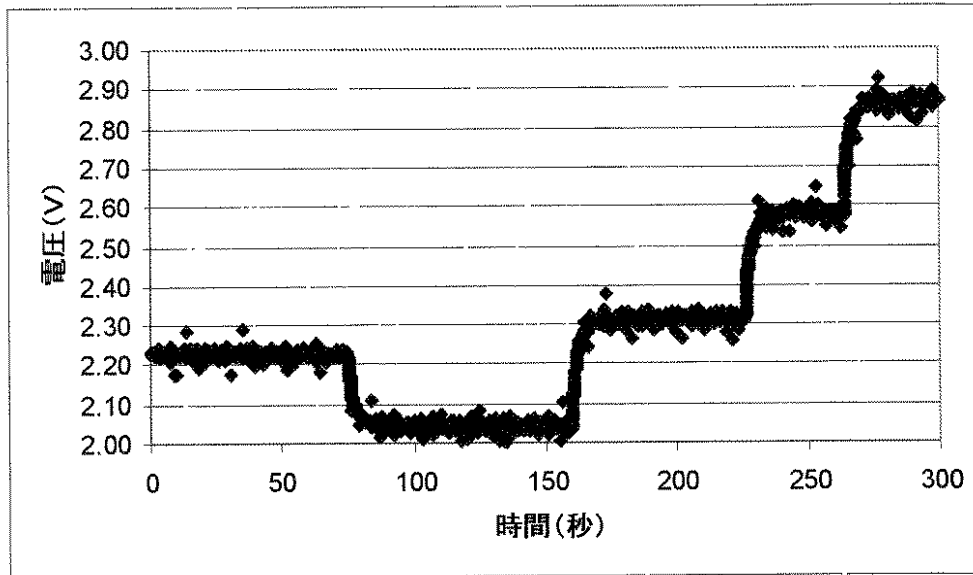
pH 変化に対する pH プロブの応答時間も測定した。図 6.40 から図 6.43 までは
、4 つの異なる pH の段階的变化、すなわち 0.6、1.2、2.3 および 3.4 単位の 30
変化に対する pH プロブの典型的な応答を示す。TableCurve 2D (Jandel Scientific)
データプロットングおよび分析ソフトウェアのビルトインキャパシティーを用いて元の
データをパルス関数に適合させた。得られた曲線の適合は 0.994 よりも高い相関係数
を有していた。これらの曲線から、98% の段階的变化に対するプロブの応答時間（応
答時間）を計算し、次いで、pH の段階的变化に対してプロットした（図 6.44）。応
答時間は試験した範囲では pH の段階的变化とともに短くなった。最小の pH の段階的
変化 0.6 では、pH プロブ応答時間は約 6.4 秒であった。pH の段階的变化 3.4
では、応答時間は約 4.2 秒に短縮された。

【0165】

特に、システムが混合時間および循環時間の評価のために使用される場合には、プロブ 40
の特徴づけのタイプは重要である。プロブは、測定している培地の変化を反映するには
、応答時間が短くなければならない。特に、pH プロブの応答時間は、かかる測定に正
確に使用される場合にはリアクター中の循環速度よりも短くなければならない。しかしな
がら、準一即座の応答は必要ない。なぜなら応答のわずかなラグが連続した循環速度に反
映されるだけであり、それゆえ無視できるからである。

【0166】

【表 38】



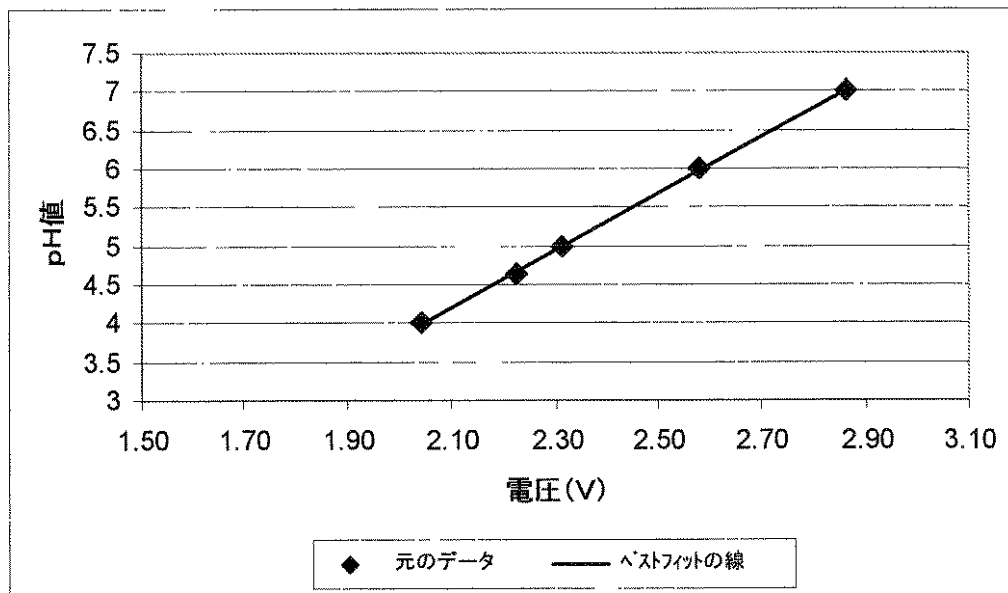
10

図 6. 38 種々のバッファー溶液に対するIngold pHプローブ応答に関するデータ獲得システムにより獲得された元のデータを時間に対して示す。

【0167】

【表39】

20



30

図 6. 39 測定された電圧 (V) に対して pH をプロットした pH プローブキャリブレーション曲線。ベストフィットのラインまたはキャリブレーションのラインは下記の等式を有する：

$$\text{pH} = 3.68 \times \text{電圧} - 3.53$$

(6. 1)

相関係数は 0.9996 (N = 2500)。

【0168】

【表40】

40

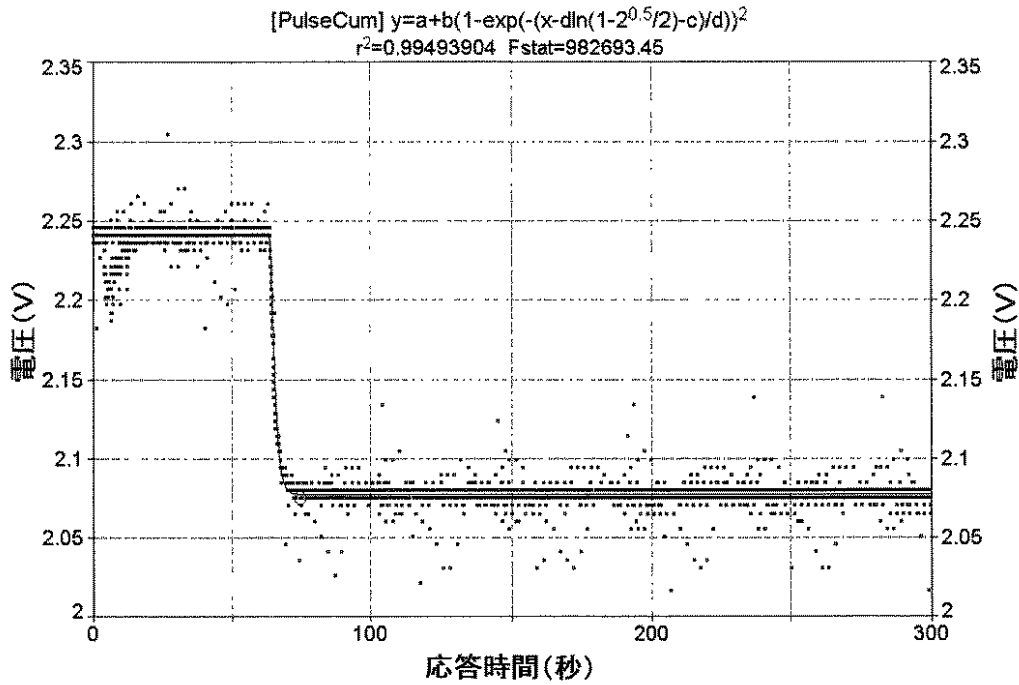


図 6. 4 0 pH 段階変化約 0.6 の場合の pH プロブ応答時間の典型的データ。TableCurve ソフトウェアを用いて応答を適合させた。ベストフィットパルス関数は相関係数 0.995 を有していた。

【0169】

【表 4 1】

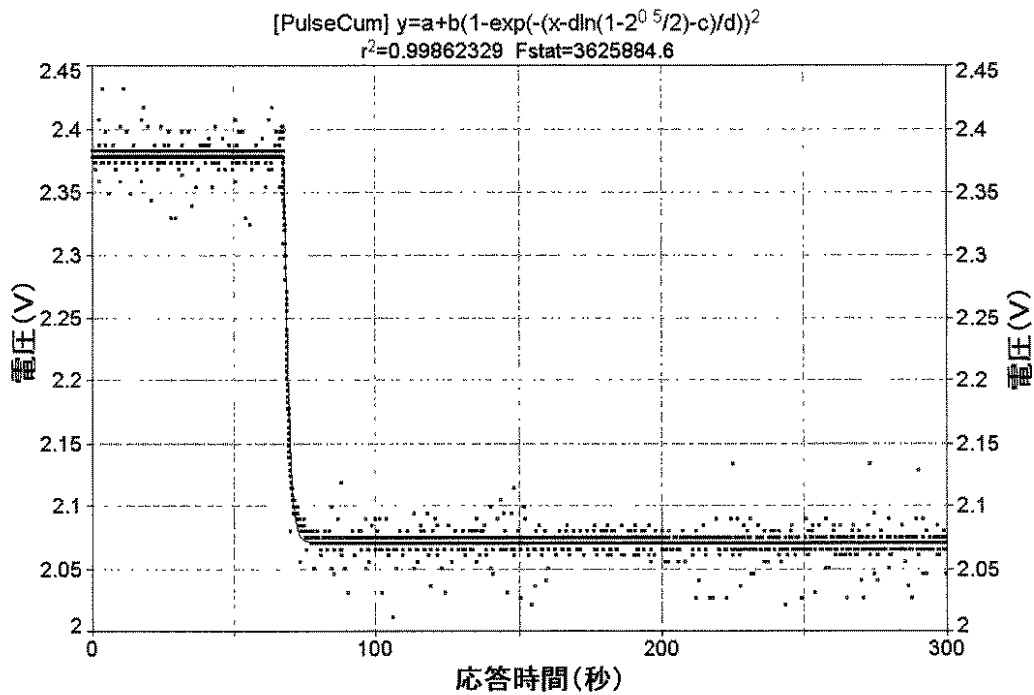
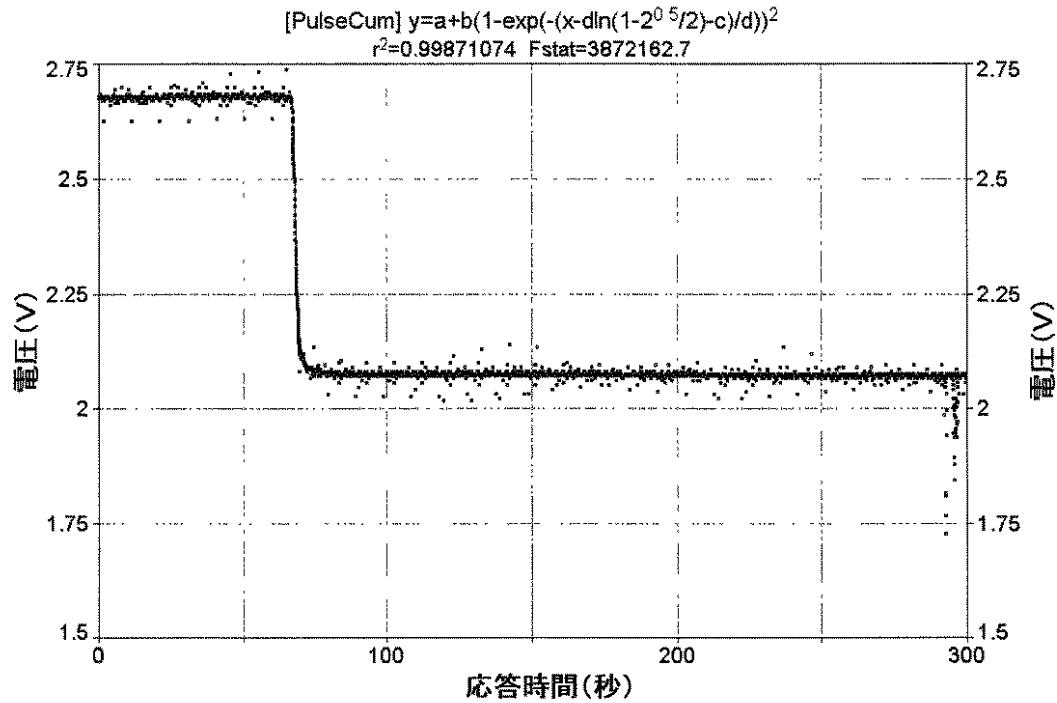


図 6. 4 1 pH 段階変化約 1.2 の場合の pH プロブ応答時間の典型的データ。TableCurve ソフトウェアを用いて応答を適合させた。ベストフィットパルス関数は相関係数 0.999 を有していた。

【0170】

【表 4 2】



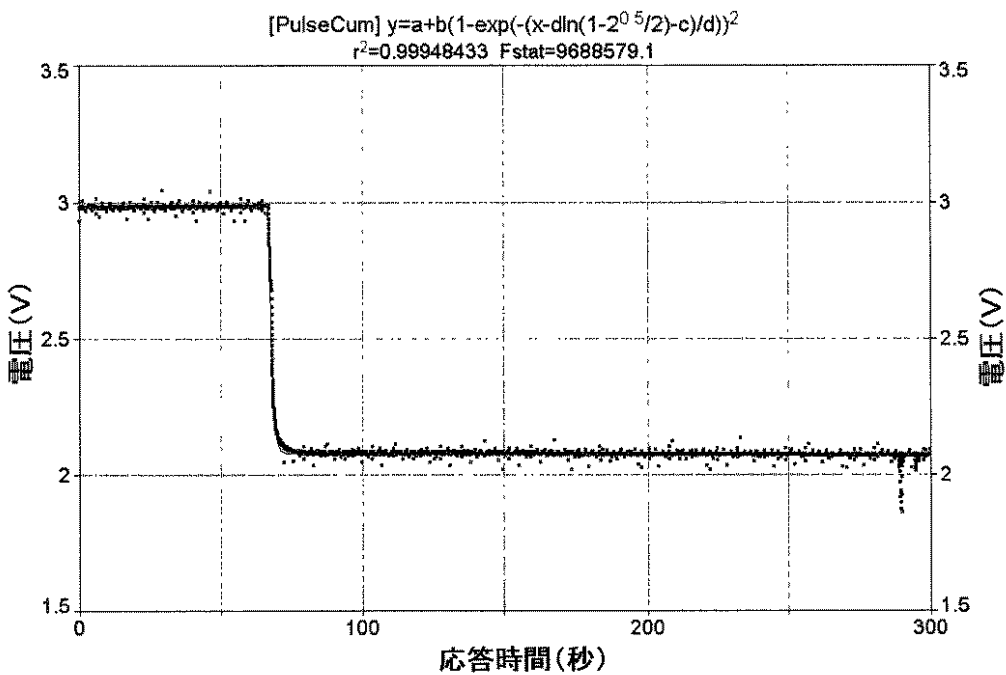
10

20

図 6. 4 2 pH段階変化約 2. 3 の場合の pH プローブ応答時間の典型的データ。TableCurveソフトウェアを用いて応答を適合させた。ベストフィットパルス関数は相関係数 0. 9 9 9 を有していた。

【 0 1 7 1 】

【 表 4 3 】



30

40

図 6. 4 3 pH段階変化約 3. 4 の場合の pH プローブ応答時間の典型的データ。TableCurveソフトウェアを用いて応答を適合させた。ベストフィットパルス関数は相関係数 0. 9 9 9 を有していた。

【 0 1 7 2 】

【 表 4 4 】

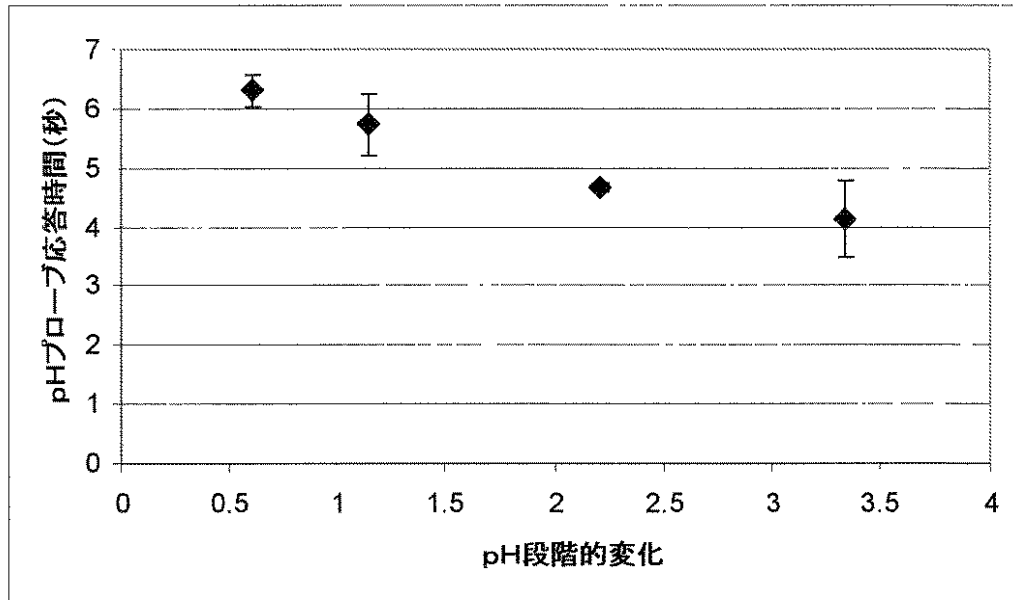


図 6. 4 4 段階変化に対するIngold pHプローブ応答時間 (N = 3)。プローブをより高い pH のバッファーに浸し、その後即座により低い pH 4. 0 のバッファーに浸した。各応答曲線のベストフィットラインを用いて、プローブが段階変化の 98 % に到達するのに必要な時間を計算した。

【0173】

6. 4. 2 混合時間および循環速度

3つのタイプの固定化細胞発酵装置に関して混合時間および循環速度の実験を行った。50 L のパイロットスケールのドラフト管バイオリアクター内で固体を含まないモデル水溶液に関して、次いで、□ーカラギーナンゲルビーズ、超フロック形成 L C C 2 9 0 酵母または中フロック形成 L C C 3 0 2 1 酵母のいずれかを含む比重 2. 7 ° P の発酵ブロスに関して実験を行った。図 6. 4 5 および 6. 4 6 は、酸パルス注入後に pH プローブシステムを用いて収集した生データをサンプル的に示したものである（方法はセクション 4. 8 において説明）。図 6. 4 5 は、固体を含まない水溶液中への酸注入に対する pH プローブの応答を示し、図 6. 4 6 は非常にフロック形成性の酵母 L C C 2 9 0 を含む発酵ブロス中への酸注入に対する pH プローブ応答を示す。シグナルを崩壊シヌソイダル曲線に適合させたところ、対応等式から計算された相関係数はそれぞれ 0. 96 および 0. 90 であった。チャート上の適合パラメーター「b」および「c」は崩壊シヌソイダル等式（3. 1）中に記載された「a」および「□」値に対応する。これらの数値を等式 3. 2 および 3. 3 に用いて、システムの循環速度および混合時間を計算した。付録 B はすべての実験の残りの混合データおよび曲線適合を含む。

【0174】

図 6. 4 7 および 6. 4 8 は、固体を含まない水溶液中への酸注入に関する混合時間および循環速度のグラフである。図 6. 4 9 および 6. 5 0 は、非常にフロック形成性の酵母 L C C 2 9 0 を用いた混合実験に関する対応グラフであり、□ーカラギーナン混合試験から得られた結果を図 6. 5 1 および図 6. 5 2 に示す。最後に、中フロック形成酵母 L C C 3 0 2 1 の場合の混合時間および循環時間を図 6. 5 3 および 6. 5 4 に示す。試験した固体のタイプにかかわらず、混合時間および循環速度は両方とも、空塔ガス速度の増加に伴って減少した。循環速度と空塔液体速度との関連性は、試験した 4 つの系すべてについて、Kennard and Janekah (1991) により提案された等式 3. 11 に従った。混合時間は水／固体不含系および□ーカラギーナンゲルビーズ系に関する等式 3. 1 に従った。フロック形成酵母を固定化マトリックスとして用いた両系は Kennard and Janekah の理論モデルに対して強い関連性はなかった。L C C 2 9 0 および L C C 3 0 2 1 系はモデルにより推定されるよりも低い初期混合時間（空塔ガス速度が 4 mm / 秒を超えるまで）を有して

いた。しかしながら、混合時間の減少速度は 4 mm/秒 以上の空塔ガス速度において鈍化した。表 6. 1 は、空塔ガス速度に関連する循環時間および混合時間に関して誘導された等式を示す。

【0175】

図 6. 55 は、空塔ガス速度に対する混合時間の関係を、4 つすべての系について示したものである。水／固体不含のシナリオは pH パルスの 98 % の混合に最大時間を示し (3 mm/秒 の V_{sg} において約 220 秒)、LCC290 系は系中の酸パルスの影響を最小化するための最大能力を示した (3 mm/秒 の V_{sg} において約 110 秒)。LCC3021 および κ -カラギーナン系に関する値は、水／固体不含と LCC290 系との間であった。ガスリフトバイオリアクター中の固体は、渦の形成を刺激し、同軸混合を促進することにより、液相の流体エレメントの分散を助ける。超フロック形成酵母 LCC290 は、中フロック形成酵母 LCC3021 と同じ固体負荷 ($16 \% \text{ w/v}$) において、試験したすべての空塔ガス速度においてより早い混合時間を可能にした。

10

【0176】

図 6. 56 は、試験した 4 つすべての系に関する空塔ガス速度に対する循環時間を示す。 2 mm/秒 の空塔ガス速度において、循環時間は 28 秒ないし 35 秒の間であり、水／固体不含系は最も早い循環速度を有し、LCC290 系は最も遅い循環速度を示した。最高のガス速度において、4 つの系の間の相違は約 3 秒にまで減少した。しかしながら、試験したすべての速度において、LCC290 系はわずかに遅い循環速度を示し、水／固体不含系は最も早い循環速度を有していた。

20

【0177】

図 6. 57 は、空塔ガス速度と空塔液体速度との間の関連性を示す。Livingston and Zhang (1993) により提案された等式 3. 7 を用いて、循環速度および固体タイプが与えられた場合 m の空塔液体速度を計算した。空塔液体速度は空塔ガス速度の増加に対応して相かした。LCC3021 および水／固体不含系は同様の傾向を有していたが、LCC290 および κ -カラギーナン系はいくぶんかの類似性を示した。Kennard and Jenekah により提案されたモデル等式を図 6. 57 における空塔ガス速度曲線に対する空塔液体速度に適合させた。図 6. 58 は、等式 3. 10 を用いて理論的に計算された空塔液体速度に対して実験から計算された空塔液体速度をプロットしたものである。 $y = 0$ から出発する傾き 1 の直線関数により示される提案された等式に 4 つの系すべてが適合した。表 6. 1 は、この研究において試験された系に関して誘導された関連性を示す。

30

【0178】

【表 45】

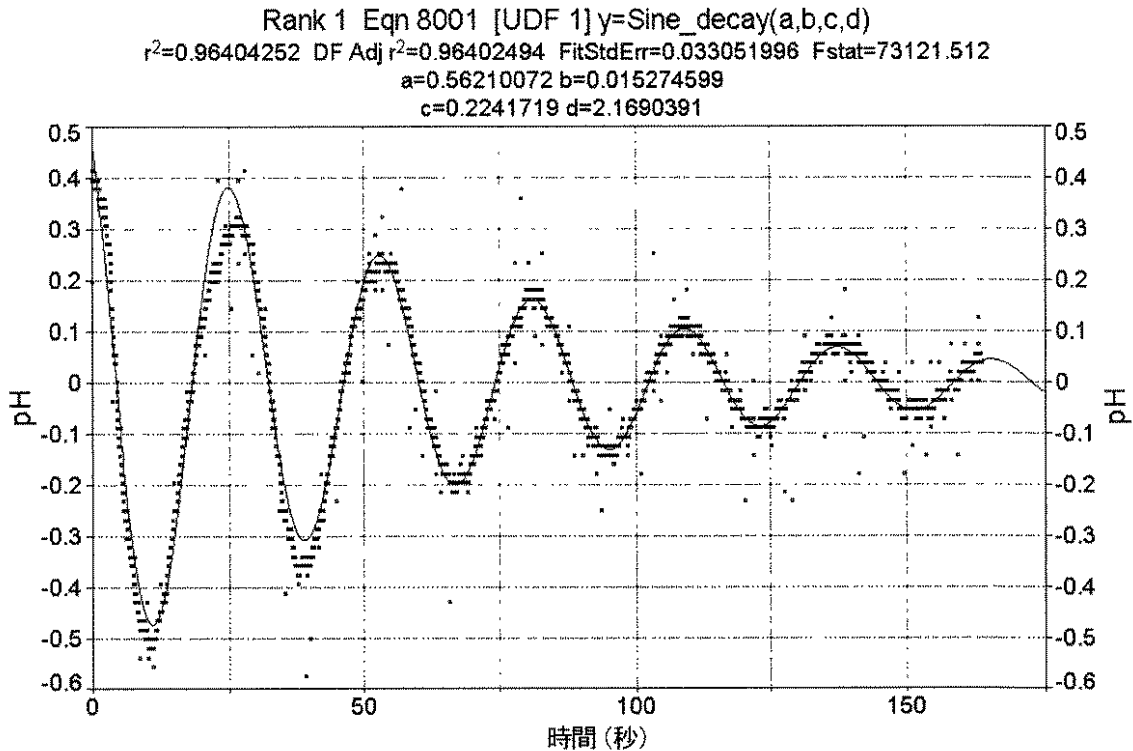


図 6. 45 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクター中の pH プロブ応答データ。固体を含まない水溶液中に酸パルスを入力した。空塔ガス速度を 1.94 mm/秒にセットした。元のデータを崩壊シノソイダル曲線に適合させた。相関係数は 0.96 であった。

【 0 1 7 9 】

【 表 4 6 】

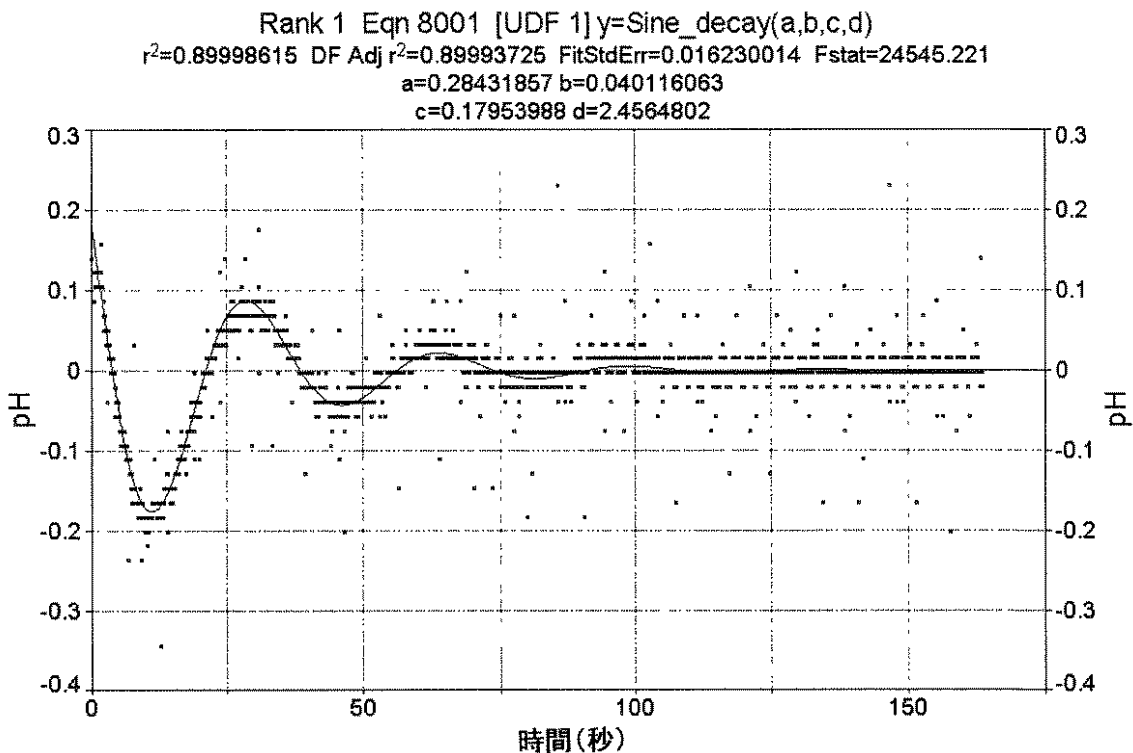


図 6. 46 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクター中の pH プロブ応答データ。高フロック形成性酵母 LCC290 を含む発酵培地中に酸パルスを入力した。空塔ガス

速度を 1.94 mm/秒 にセットした。元のデータを崩壊シノソイダル曲線に適合させた。相関係数は 0.90 であった。

【0180】

【表47】

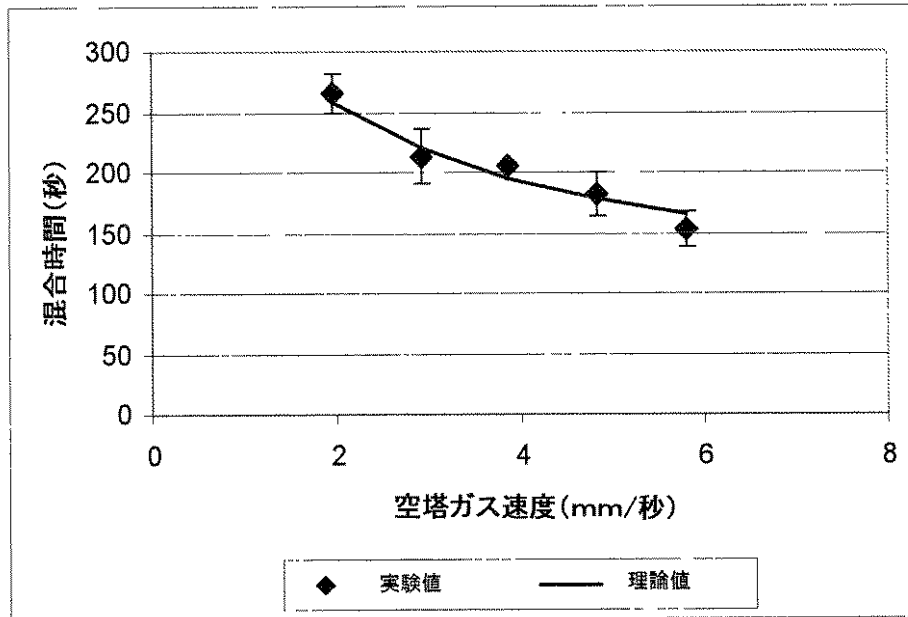


図6.47 50 Lガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する混合時間。固体を含まない水溶液中に酸パルスを注入した。混合時間は98%の段階的変化が無視されるに必要な時間に対応する ($N=3$)。

【0181】

【表48】

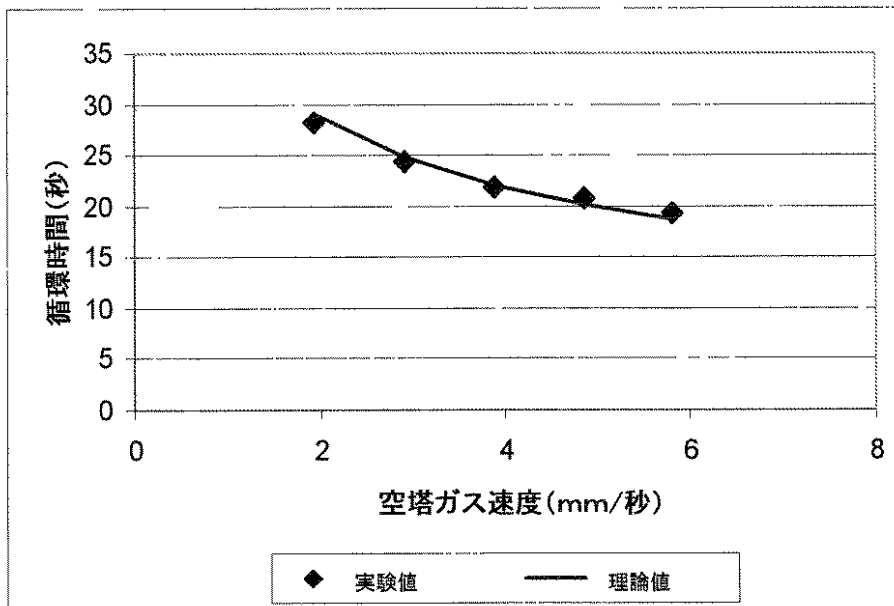
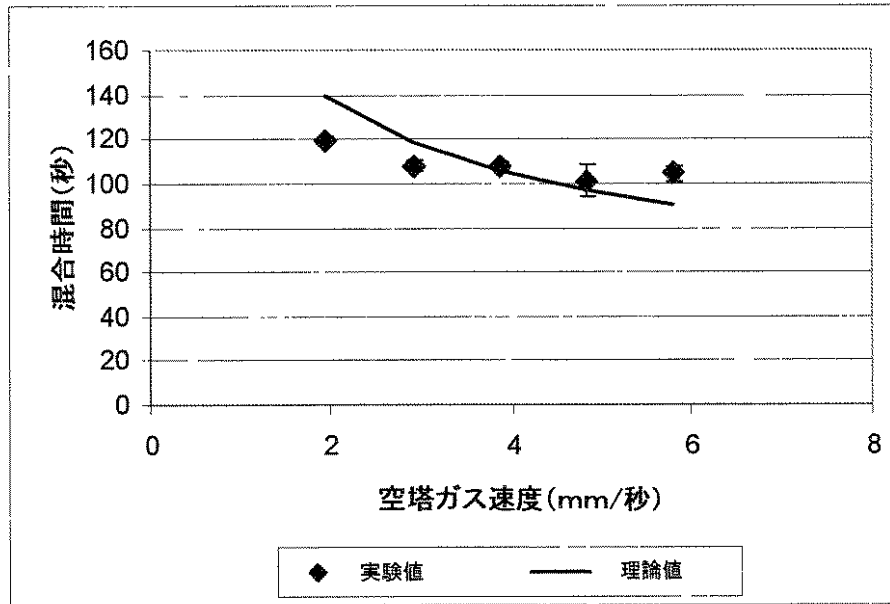


図6.48 50 Lガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する循環時間。固体を含まない水溶液中に酸パルスを注入した ($N=3$)。

【0182】

【表49】



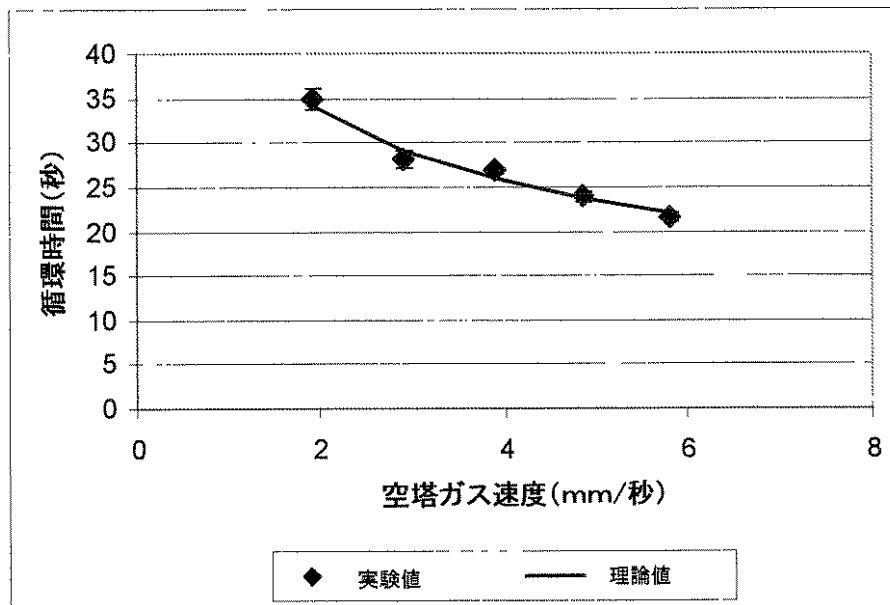
10

図 6. 49 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する混合時間。高フロック形成性酵母 L C C 2 9 0 (フロックサイズ > 1. 0 mm) を含む発酵培地中に酸パルスを注入した。混合時間は 98 % の段階的変化が無視されるに必要な時間に対応する (N = 3)。

20

【 0 1 8 3 】

【 表 5 0 】



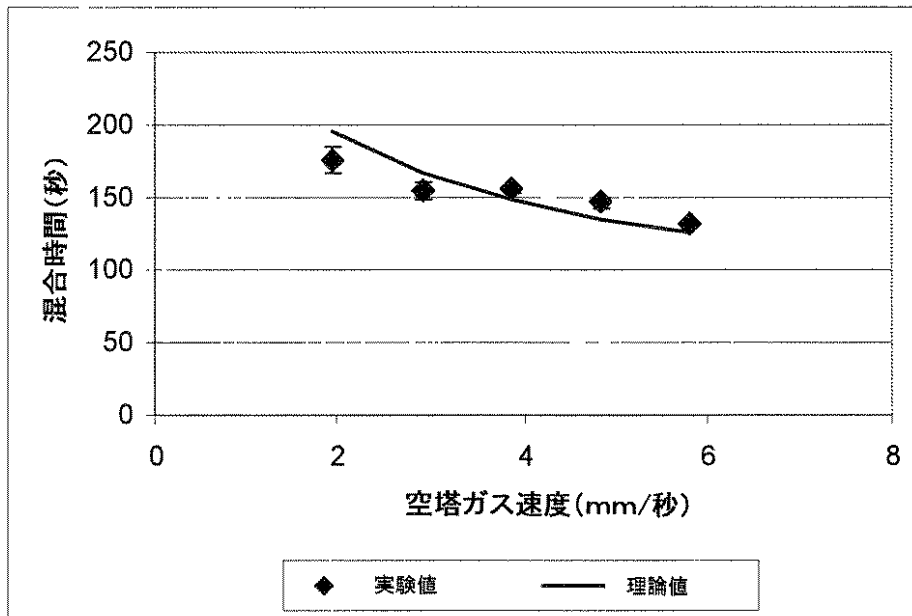
30

図 6. 50 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する循環時間。高フロック形成性酵母 L C C 2 9 0 (フロックサイズ > 1. 0 mm) を含む発酵培地中に酸パルスを注入した (N = 3)。

40

【 0 1 8 4 】

【 表 5 1 】



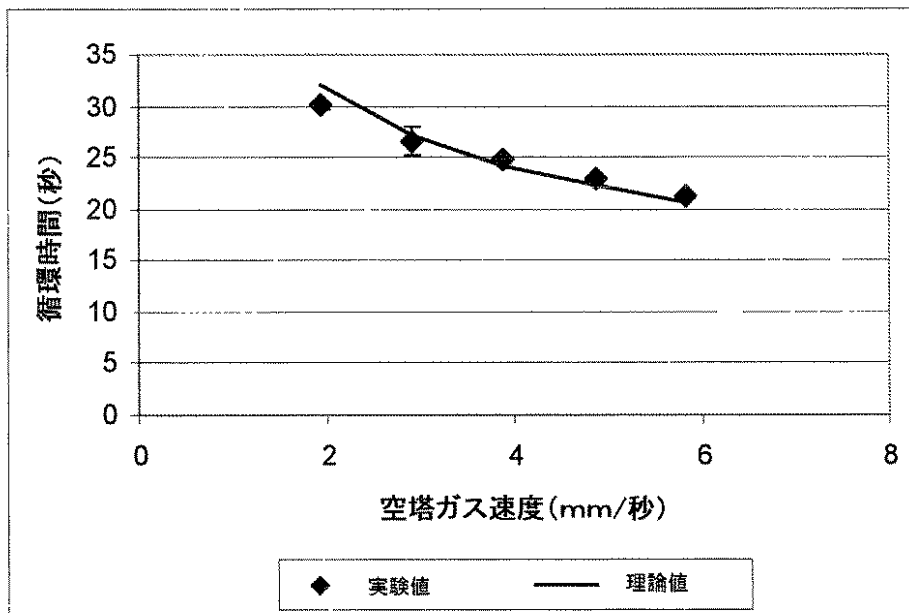
10

図 6. 5 1 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する混合時間。□—カラギーナンゲルビーズ（ビーズサイズ 1～2 mm）中に固定化された中フロック形成性酵母 L C C 3 0 2 1 を含む発酵培地中に酸パルスを注入した。混合時間は 9 8 % の段階的変化が無視されるに必要な時間に対応する（N = 3）。

20

【 0 1 8 5 】

【 表 5 2 】



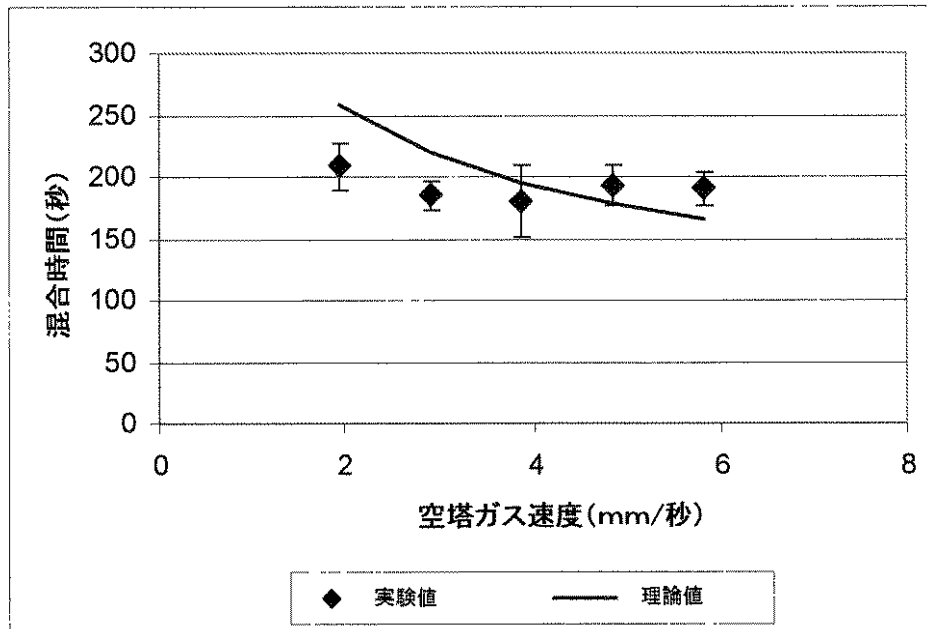
30

図 6. 5 2 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する循環時間。□—カラギーナンゲルビーズ（ビーズサイズ 1～2 mm）中に固定化された中フロック形成性酵母 L C C 3 0 2 1 を含む発酵培地中に酸パルスを注入した（N = 3）。

40

【 0 1 8 6 】

【 表 5 3 】



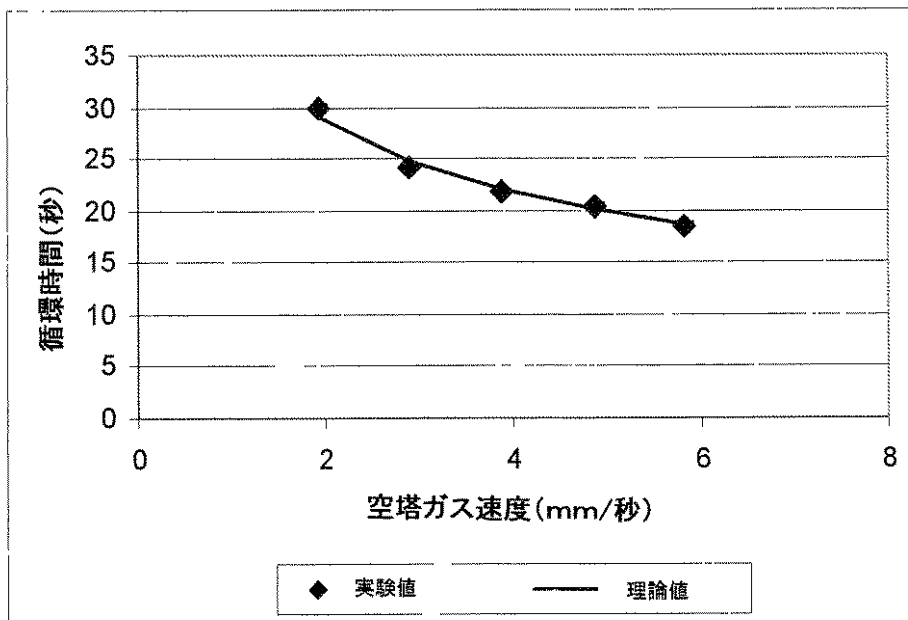
10

図 6. 53 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する混合時間。中フロック形成性酵母 L C C 3 0 2 1 (フロックサイズ $< 0.5 \text{ mm}$) を含む発酵培地中に酸パルスを注入した。混合時間は 98 % の段階的変化が無視されるに必要な時間に対応する (N = 3)。

20

【0187】

【表 5 4】



30

図 6. 54 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する循環時間。中フロック形成性酵母 L C C 3 0 2 1 (フロックサイズ $< 0.5 \text{ mm}$) を含む発酵培地中に酸パルスを注入した (N = 3)。

40

【0188】

【表 5 5】

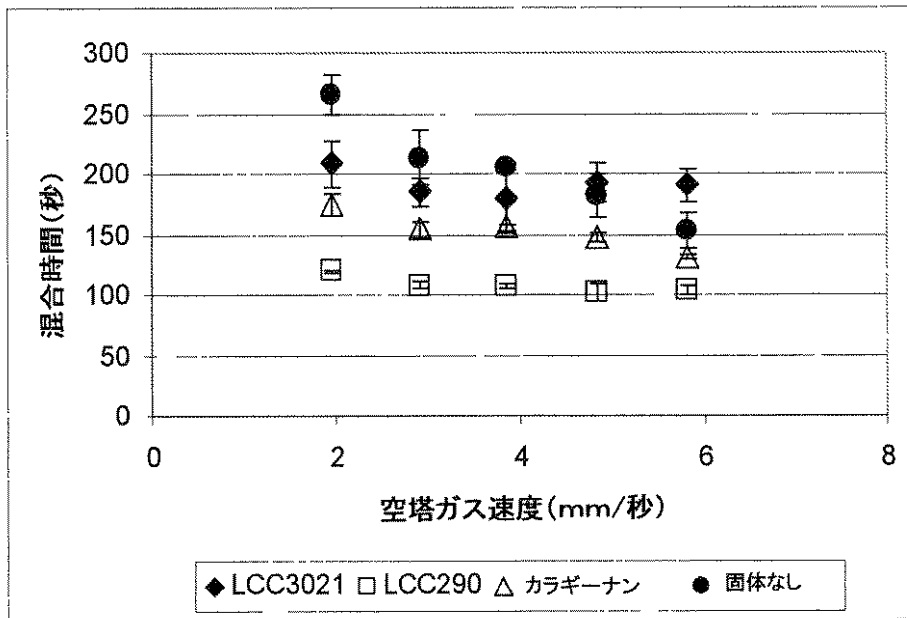


図 6. 5 5 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する混合時間。異なる固体を含む発酵培地中に酸パルスを注入した。混合時間は 98 % の段階的変化が無視されるに必要な時間に対応する (N = 3)。

【 0 1 8 9 】

【 表 5 6 】

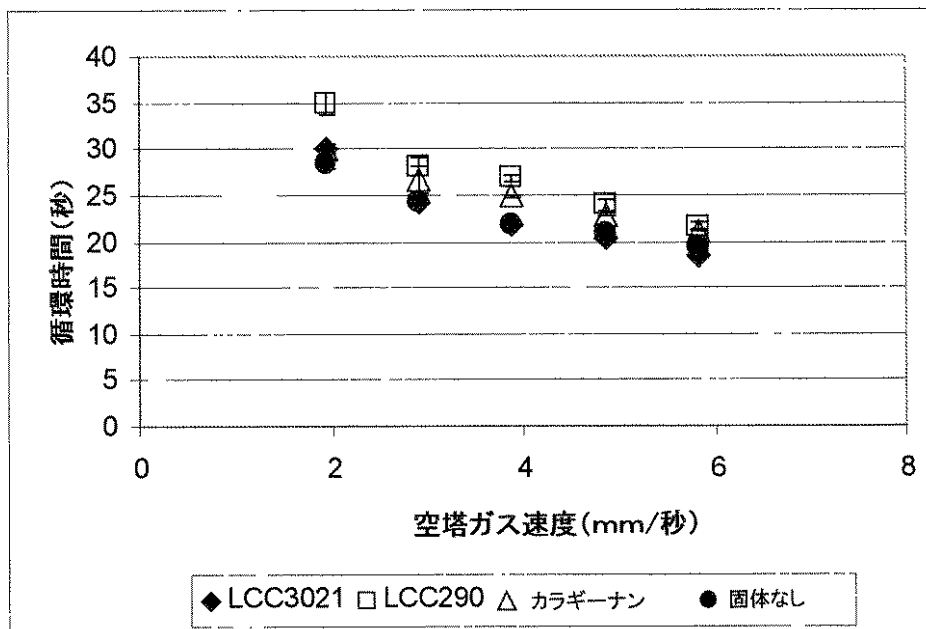


図 6. 5 6 50 L ガスリフトドラフト管バイオリアクターにおける空塔ガス速度に対する循環時間。異なる固体を含む発酵培地中に酸パルスを注入した。(N = 3)。

【 0 1 9 0 】

【 表 5 7 】

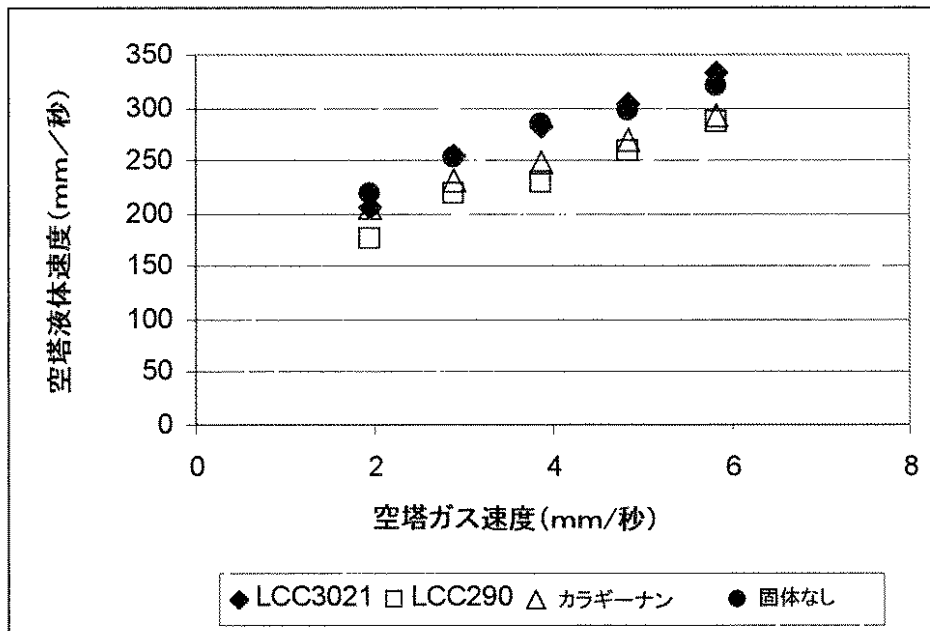


図 6. 57 試験した 4 つの系—LCC3021 酵母、LCC290 酵母、カラギーナンゲルビーズおよび水／固体不含系に関する空塔ガス速度 (mm/秒) に対する空塔液体速度 (mm/s)。50 L パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター中で試験を行った。

【0191】

【表 5 8】

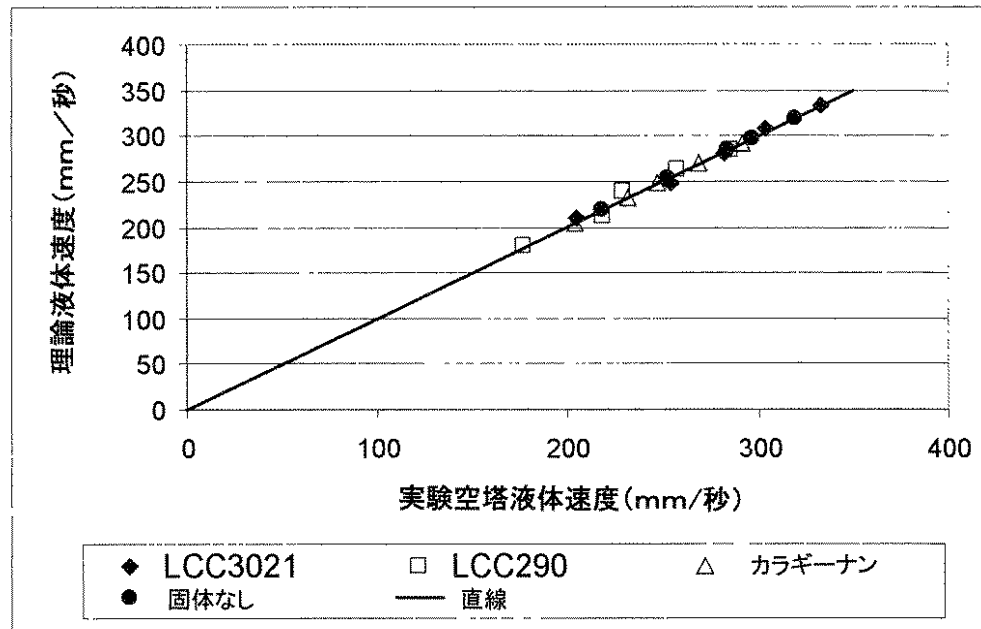


図 6. 58 試験した 4 つの系に関して実験による空塔液体速度 (mm/秒) に対する理論空塔液体速度 (mm/秒)。Kennard および Janekah (1991) により提案された下記の関連性を用いて理論値を計算した： V_{SL} は V_{SG}^M に比例する。直線は傾き 1 を有し、y 切片は 0 である。

【0192】

【表 5 9】

10

20

30

40

表 6. 1 試験した 4 つの系についての、混合時間、循環速度および空塔液体速度の計算された相関関係のまとめ

	混合時間	循環速度	空塔液体速度
水/固体不含	$t_m=336.04 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c=37.94 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL}=189.06 V_{SG}^{0.283}$
LCC290 酵母	$t_m=181.55 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c=44.67 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL}=134.75 V_{SG}^{0.419}$
?-カラギーナンゲル	$t_m=254.68 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c=41.73 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL}=171.92 V_{SG}^{0.283}$
LCC3021 酵母	$t_m=322.07 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c=37.90 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL}=158.12 V_{SG}^{0.427}$

10

【0193】

空塔液体速度に関し、Kennard and Janekah (1991)は水中で 0.41 乗、そして溶液がカルボキシメチルセルロースおよびエタノールを含む場合には 0.64 乗を提案した。LCC290 および LCC3021 系はそれぞれ 0.419 乗および 0.427 乗を有していたが、□-カラギーナン系および水/固体不含系は 0.283 乗を有していた。

【0194】

ガスリフトドラフト管法の基本的な仮定は、システムが十分な混合をすることができ、その結果、リアクターから出て行く流体エレメントが完全に混合されるというものである。50 L のパイロットスケールのシステムを連続発酵装置として運転するに際し、新鮮栄養培地をリアクター底部から毎分 36 mL の流速で 50 L のリアクター中に注入した。このことは、供給成分を約 1000 倍に希釈することを示す。LCC290 酵母系に関して計算された混合特性を用いて、約 3 リアクター循環ループにおいて流体エレメントを混合したが、水/固体不含系では 10 リアクター循環ループが必要となる。さらに、滞留時間(24 時間)は混合時間(180 秒)よりも約 1000 倍長い。系中の栄養分の希釈にカップリングした迅速な混合および混合時間と滞留時間との大幅な相違は、十分に混合された系を示唆する。ガスリフトバイオリアクターを用いることの元々の前提は、ビール発酵のための理想的に混合された環境を提供することであった。3 つの担体すべてについて行った混合の研究の結果はこの前提を支持するものである。

20

【0195】

6. 5 ガスリフトシステム中での連続主発酵用のいくつかの固定化方法の評価
3 つのタイプの固定化担体-□-カラギーナンゲルビーズ、超フロック形成 LCC290 酵母および中フロック形成 LCC3021 酵母を用いて 50 L のパイロットスケールガスリフトドラフト管バイオリアクター中で連続発酵を行った。すべての発酵において同じレベルの酵母を接種(4 g/L)し、工業用ラガー麦汁を栄養培地として用いた。発酵をバッチで開始させて、麦汁の糖類を迅速に減少させ、なおかつ発酵装置中での酵母の増殖を促進させた。フロック形成酵母の場合、このバッチ期間により酵母フロック形成が可能となり、その後、連続フィードが開始されてからそれらはバイオリアクター中に保持された。発酵液中のダイアセチルレベルが 30 □ g/L 未満に低下したならば、連続的麦汁フィードを開始した。以下のセクションでは、これらの 3 タイプの固定化マトリックスにより得られた詳細な発酵の分析につき説明する。

30

40

【0196】

6. 5. 1 □-カラギーナンゲルビーズの使用：包括
固定化マトリックスとしての□-カラギーナンゲルビーズの使用は、ビールの連続主発酵のためのガスリフト法(セクション 6. 3)の評価の実行を助けた。かかるシステムが発酵の不安定さやコンタミネーションなどの大きな運転上の問題もなく長時間にわたり(2 ヶ月まで)作動しうるかどうかを評価することがやはり必要であった。この発酵試験に関する運転パラメーターを図 6. 59 に示す。このスパージガス中において二酸化炭素空塔ガス速度を 5.5 mm/秒にセットし、空気を 0.9 mm/秒にセットしてリアクターに導入した。それゆえ、酸素富化速度は全スパージガスの 3% にセットされ、2~5% の酸

50

素がシステムに導入された場合に好ましいビールが製造されることを示したセクション 6. 3 の結果と一致した。発酵温度を 15℃ にコントロールした。データにいくぶんかのばらつきが見られ、それらは使用したコントロールループの性質に関連していた。

【0197】

図 6. 60 は経時的な遊離酵母細胞集団の発生を示し、酵母の生存率も示す。2 ヶ月の発酵期間中、生存率は 200 時間目あたりで一時的な低下があったものの、比較的高く維持された。このことは、連続麦汁フィードの開始直前に時点に対応する。バッチ発酵において、生存率が発酵の終りに低下することは普通のことである。なぜなら細胞は栄養飢餓にあるからである。連続発酵が開始されると、生存率は回復し、約 90% となった。遊離酵母集団は発酵の最初の 400 時間は少なく、次いで、その後の 300 時間で約 10 倍に増加し、1 mL あたり 100 万個ないし 15 億個となった。この最大濃度に達してから、遊離酵母細胞集団は残りの発酵期間中この偽定常状態値を維持した。

10

【0198】

遊離酵母濃度の突然の増加は、おそらく、固定化酵母細胞集団にリンクしているのであろう。発酵開始時において、すべての利用可能な空間が占領されるまでゲルに包括された酵母がゲル内部で増殖するであろう。ゲルビーズが酵母で満たされると、増加し続ける集団が液体培地中に溢れるであろう。我々の結果は最初の 400 時間においてこれか酵母はゲル中で増殖し、次いで、700 時間目あたりで酵母はビーズ中で増殖しなくなり、それゆえ大量の細胞が発酵プロセス中に遊離し始めることを示すように思われる。

【0199】

この酵母集団の不安定さはエタノールおよび比重のプロファイルに反映される（図 6. 61）。発酵の最初の 200 時間の間、伝統的なバッチキネティクスに従ってエタノールは経時的に増加し、比重は低下すると考えられた。200 時間ないし 600 時間において、エタノールは 45 g/L のプラトーに達し、比重は約 6°P に維持された。発酵終了液が約 2.5 ないし 2.7°P の比重を有していたので、この結果は予想されなかったものである。約 600 時間目において、遊離酵母集団がほぼその最大値に達したばかりである場合に、エタノールレベルは約 70 g/L に増加し、麦汁の比重は約 2.2°P に低下した。経時的な特定の炭水化物のプロファイルも近似しており（図 6. 62）、マルトース濃度はプロセス中において約 600 時間目まで低下しなかったことが示される。他の糖類は予想どおり減少した。

20

30

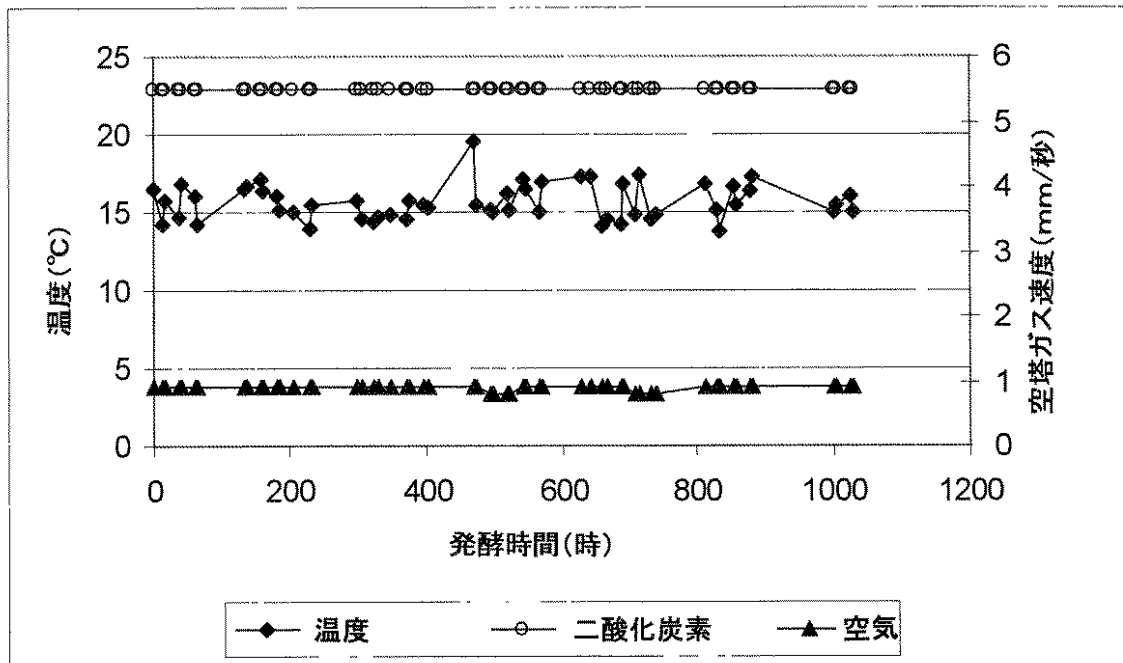
【0200】

2 ヶ月の連続運転中、他の 2 つの重要な分析対象ーダイアセチルおよび 2, 3-ペンタジオンをモニターした（図 6. 63）。約 180 時間目の低い点はバッチ期間の終了に対応する。連続フィードが開始されると、ダイアセチルおよび 2, 3-ペンタジオンが急激に増加し、それぞれ約 500 □g/L および 400 g/L に達した。この初期の増加は予想されたものであった。なぜなら新鮮な栄養分の供給は酵母の増殖を刺激し、それゆえ、オーバーフロー代謝物のレベルを増加させ、ダイアセチルおよび 2, 3-ペンタジオンを生じさせるからである。発酵運転中、2, 3-ペンタジオンレベルは約 400 □g/L を維持し、ダイアセチル濃度は連続発酵運転中の半ばで 500 □g/L から 275 □g/L に低下した。このポイントは、セクション 6. 3 に報告した実行可能性の評価において観察されたダイアセチルレベルの 2, 3-ペンタジオンレベル以下への低下にも一致していた。

40

【0201】

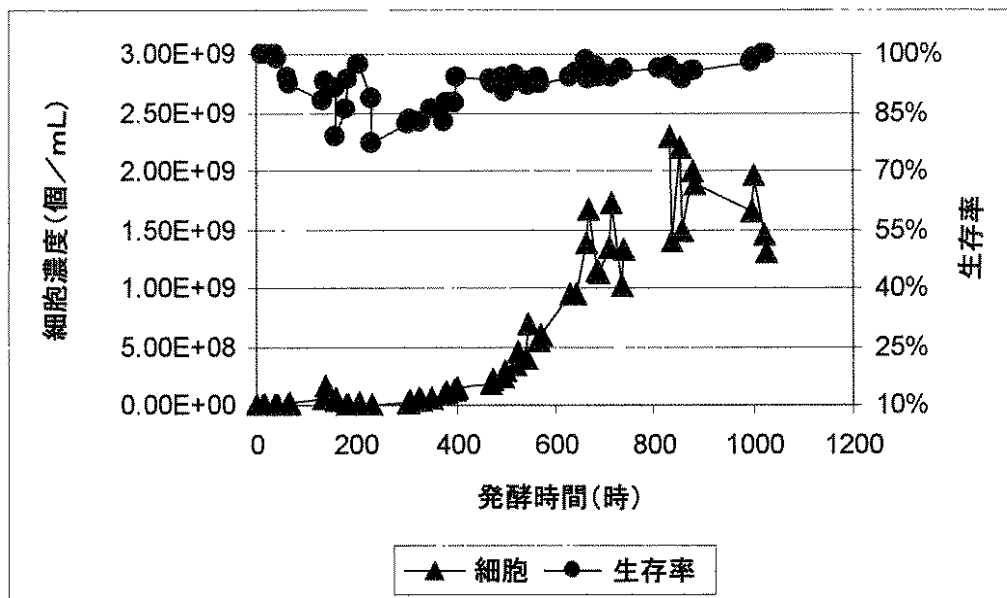
【表 60】



10

図 6. 59 発酵時間に対するカラギーナン固定化発酵の運転パラメーター。
 【 0 2 0 2 】
 【 表 6 1 】

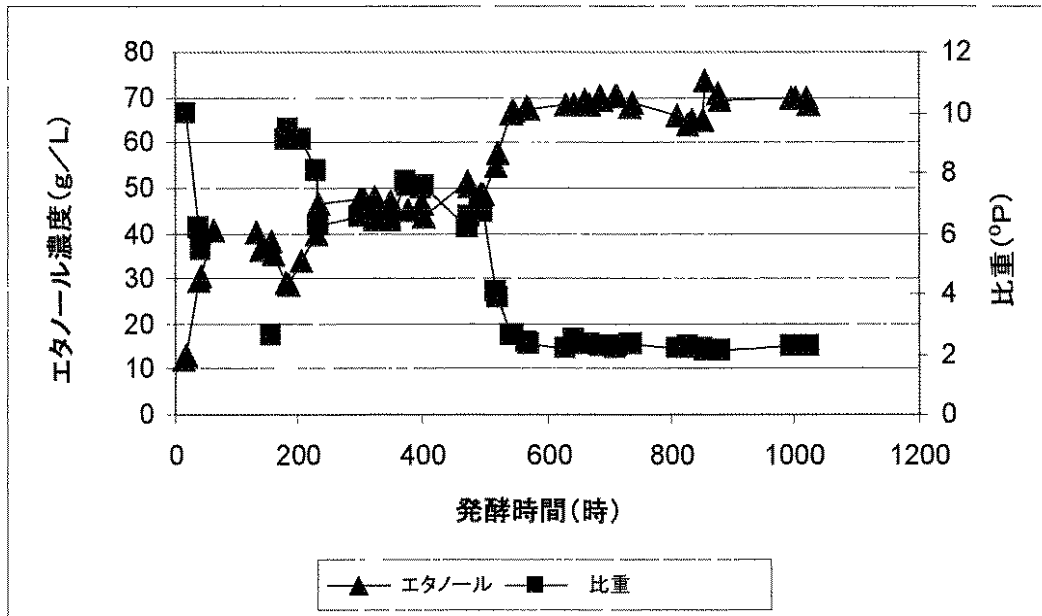
20



30

図 6. 60 発酵時間に対する□-カラギーナン固定化酵母の全酵母濃度および生存率。
 【 0 2 0 3 】
 【 表 6 2 】

40



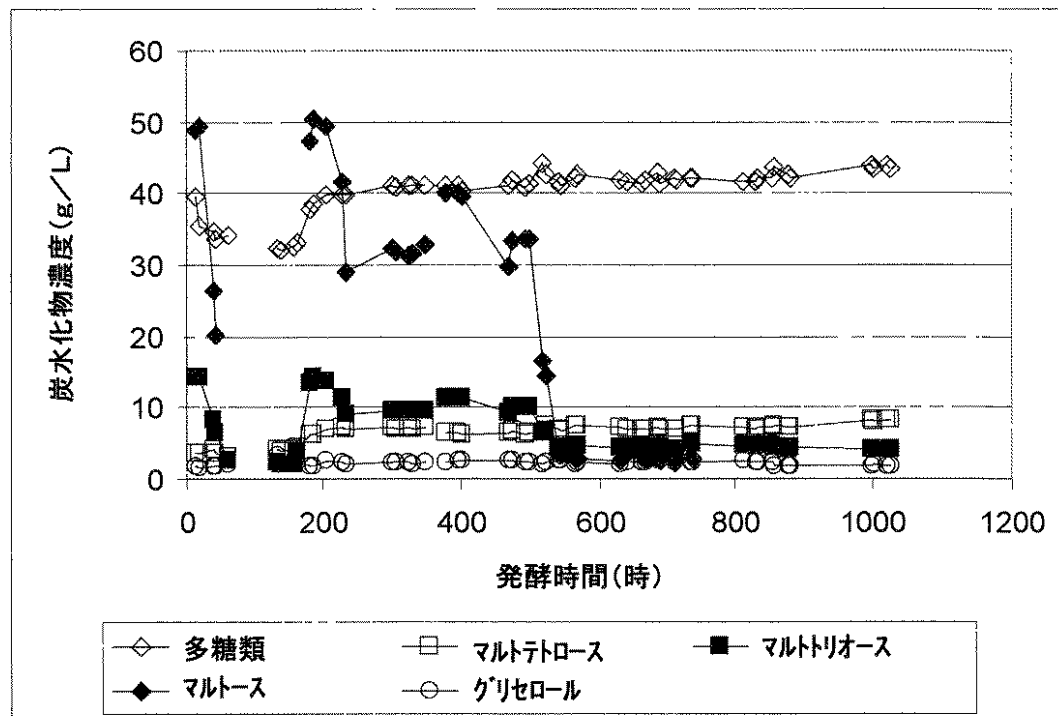
10

図 6. 6 1 発酵時間に対するカラギーナン固定化酵母連続発酵のエタノール濃度および比重。

20

【 0 2 0 4 】

【 表 6 3 】



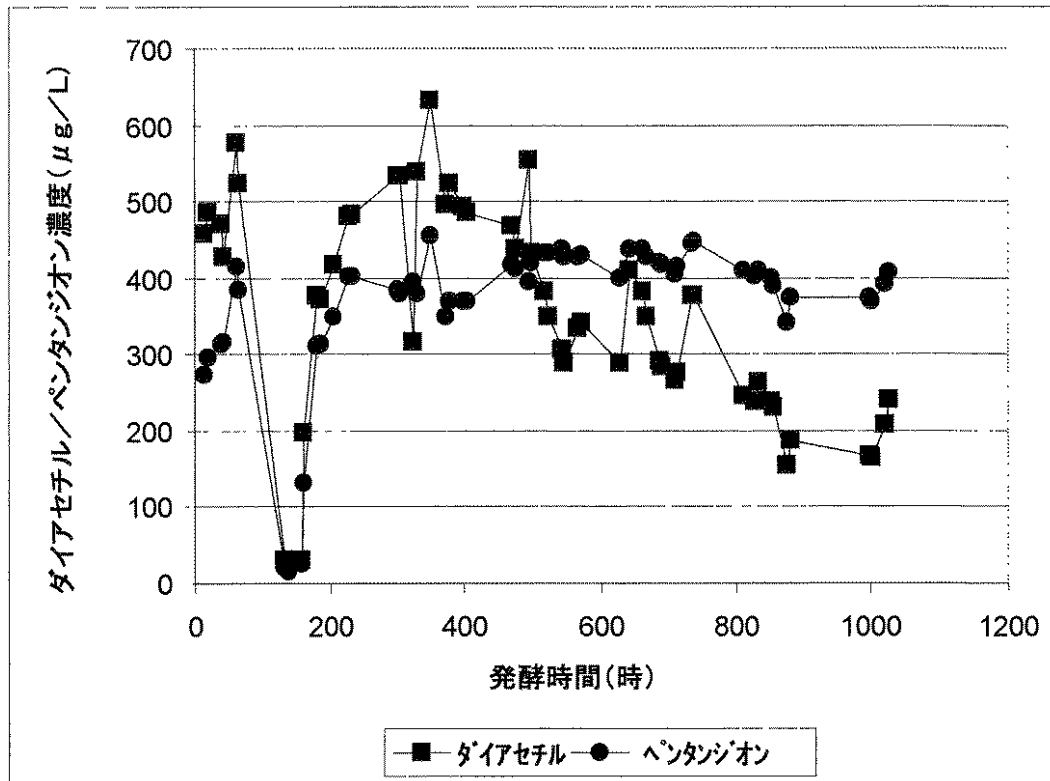
30

図 6. 6 2 発酵時間に対するカラギーナン固定化酵母連続発酵の炭水化物プロファイル。

40

【 0 2 0 5 】

【 表 6 4 】



10

20

30

40

50

図 6. 6 3 発酵時間に対するカラギーナン固定化連続発酵のビシナルジケトン類濃度【0206】

6. 5. 2 超フロック形成酵母株の使用：自己フロック形成

LCC290超フロック形成酵母を入れた50Lのパイロットスケールのガスリフトバイオリアクターを用いる連続発酵を3ヶ月の期間にわたって行った。CO₂スパーキングガスを約2.5mm/秒にセットし、空気を約0.4mm/秒で導入して（これは毎分合計1.51Lの3%酸素含有ガスを導入したことに対応する）、いくぶんかの酵母の増殖を促進させた。運転中ずっとリアクター中の発酵温度を約15℃に維持した。パワーサプライの中断により3日間ファーマンター温度が4℃に低下した（発酵時間はほぼ1700時間目）（図6.64）。このリアクターのクールダウンにより、パワー中断中に酵母の代謝が鈍化し、酵母の生存率が維持された。この予期せぬ出来事は、工業的状況において通常起こりうる出来事に対するシステムの復元力を評価する機会を与えた。電氣的に回復してから、リアクター温度を15℃に再調整し、さらに30日間発酵を進行させた。

【0207】

バッチ期間（約180時間）が完了したら、麦汁を毎時2.16Lの流速で連続的にシステムに供給し、かくしてリアクター有効体積50Lに基づく24時間の滞留時間を提供した。はじめのバッチ期間の後、細胞濃度が増加し、約750時間目に発酵物中約30億個/mLに達した（図6.65）。その後、この酵母量は減少して約1000時間目には1mLあたり約10億個となり、発酵終了までこのレベルを維持した。酵母の生存率は発酵期間中ずっと90%よりも高かった（図6.65）。

【0208】

エタノール濃度および発酵ブロスの比重は連続フィード開始から間もなく偽定常状態に達した（図6.66）。エタノール濃度は約70g/Lに上昇し、発酵の残りの期間中液の比重は約2.3°Pであった。図6.67中の炭水化物のプロファイルは、連続発酵運転270時間目のこの偽定常状態を確認するものである。多糖類濃度は発酵1400時間目で約42g/Lから約33g/Lに低下した。この結果は麦汁のバッチの変化によるものであった。ラガー酵母はこれらの多糖類を消費することができないので、麦汁栄養分のこの変化は主発酵容器の品質に顕著な影響を与えるものではなかった。非発酵可能糖類の割

合のこの相違は、製品が「薄い」ボディーを有すると気づく熟練したパネリストによって検知されたであろう。

【0209】

ダイアセチルおよび2, 3-ペンタジオン濃度の経時変化を図6. 68に示す。□-カラギーナンでの連続発酵に関しては、連続麦汁フィードを開始するとすぐにダイアセチルおよび2, 3-ペンタジオンレベルが上昇した。ダイアセチルは約375□g/Lに達し、2, 3-ペンタジオン濃度は約600□g/Lに達した。約1700時間目のパワー中断までの発酵運転中ずっとこれらの濃度レベルが維持された。液がさらなる酵母の代謝を受けずに（栄養供給がなくなったため）バッチ中に3日間存在していたので、ビシナルジケトン類のレベルが低下した。麦汁フィードが再開されると、ダイアセチルおよび2, 3-ペンタジオンは両方ともそれらの偽定常状態値に戻った。

【0210】

【表65】

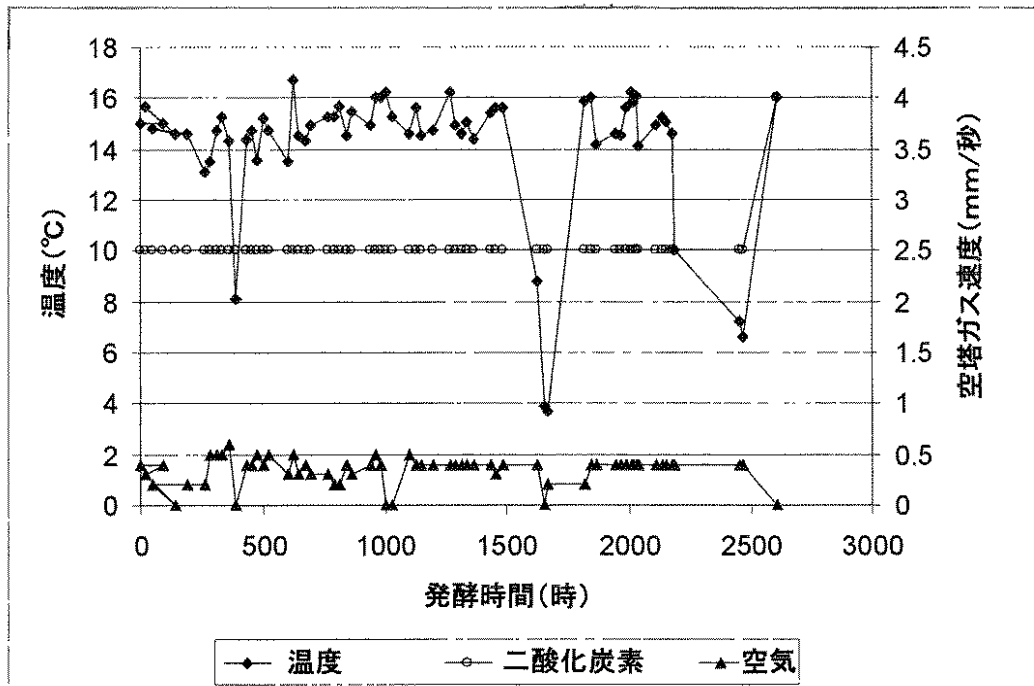
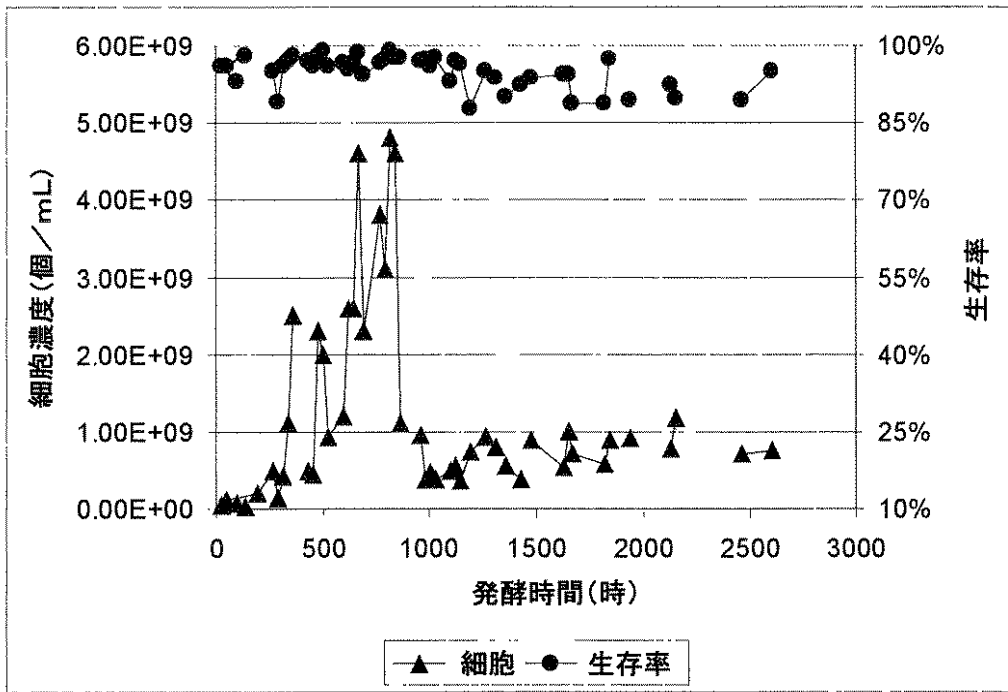


図6. 64 発酵時間に対するLCC290発酵の運転パラメーター。

【0211】

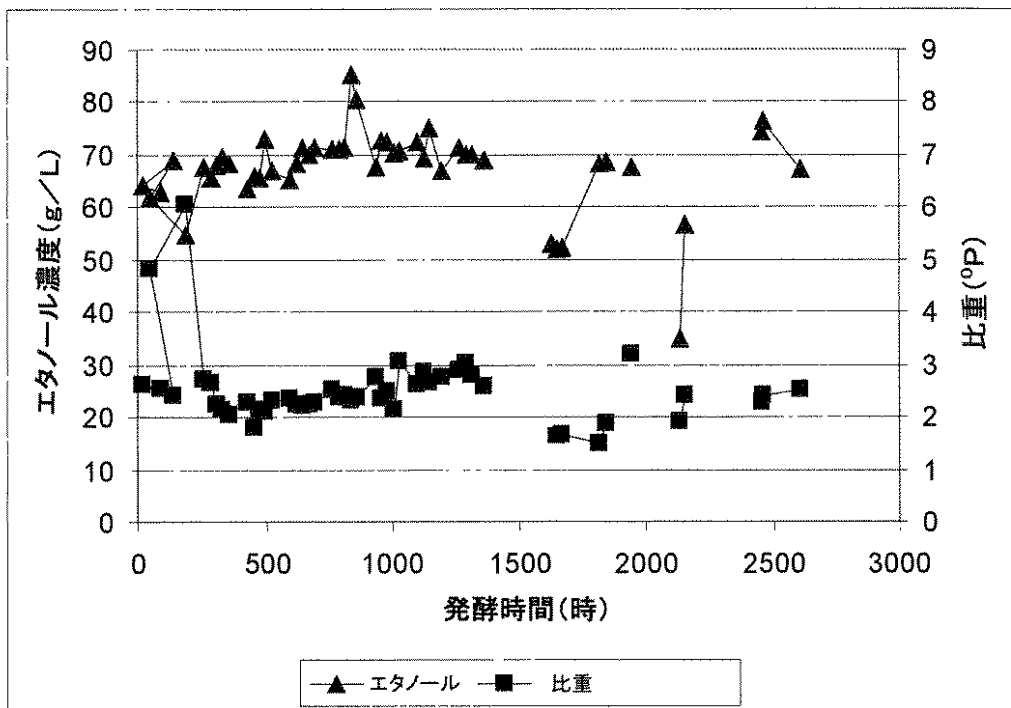
【表66】



10

図 6. 6 5 発酵時間に対する L C C 2 9 0 酵母の全酵母細胞濃度および生存率。
 【 0 2 1 2 】
 【 表 6 7 】

20



30

40

図 6. 6 6 発酵時間に対する L C C 2 9 0 酵母連続発酵のエタノール濃度および比重。
 【 0 2 1 3 】
 【 表 6 8 】

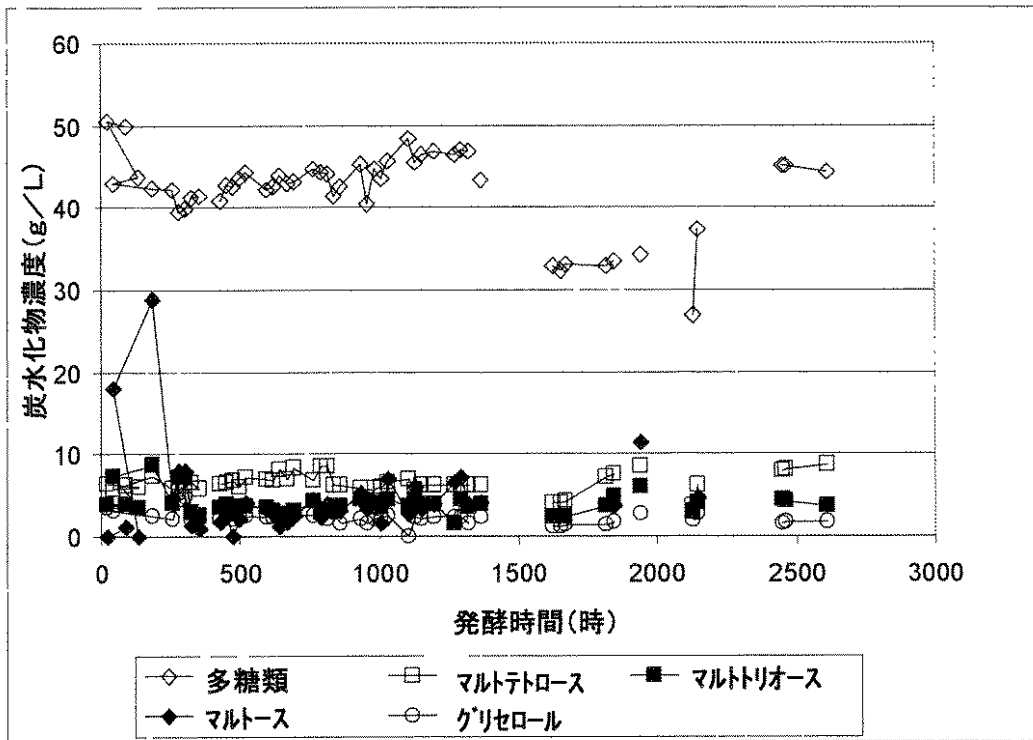


図 6. 67 発酵時間に対する L C C 2 9 0 酵母連続発酵の炭水化物プロファイル。
 【 0 2 1 4 】
 【 表 6 9 】

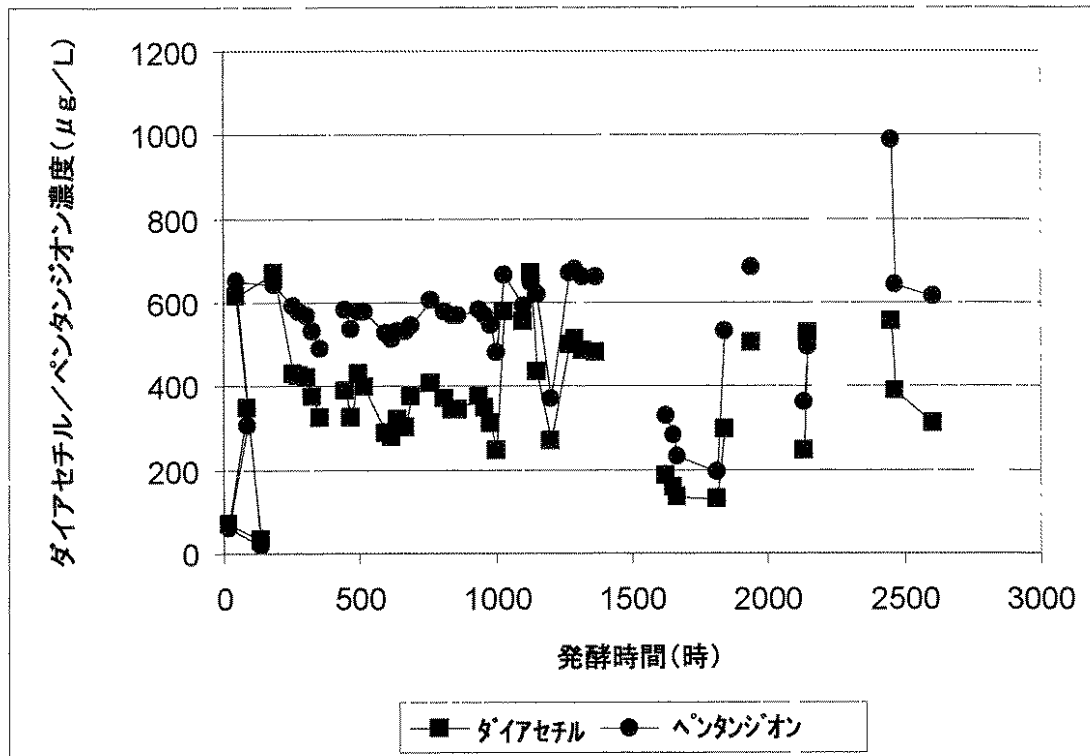


図 6. 68 発酵時間に対する L C C 2 9 0 連続発酵のビスナルジケトン類濃度。
 【 0 2 1 5 】

6. 5. 3 中フロック形成酵母の使用：自己フロック形成

中フロック形成酵母株 L C C 3 0 2 1 を固定化マトリックスとして用いて 5 0 L のパイロットスケールのガスリフトバイオリアクター中でいくつかの発酵運転を行った。以前の 2 つの固定化モデルの場合と同様に、最初の酵母濃度を 4 g / L にセットした。この酵母を

10

20

30

40

50

工業用ラガー麦汁に入れ（セクション 4. 2 で説明）、すべての発酵可能な糖類が消費され、ダイアセチルレベルが $30 \square \text{g/L}$ 未満に低下するまでバッチで発酵させた。発酵温度を 15°C に調節し、スパージガス速度を $\text{LCC} 290$ の発酵と同じレベルに調節した（空塔二酸化炭素ガス速度約 2.5 mm/秒 、空気約 0.4 mm/秒 、よって全スパージガス中酸素約 3% ）（図 6. 69）。

【0216】

この初期バッチ段階により酵母細胞がフロックを形成でき、それゆえガスリフトシステム中により容易に保持されることとなる。バッチ工程の終りに、麦汁フィード速度を毎時 2.16 L にセットし、それは 50 リットルのリアクター有効体積を基礎として約 24 時間の滞留時間に相当した。酵母集団（図 6. 70）が増加し、 1 ミリリットル中約 10 億個となり、ちょうど 1000 時間にわたりこのレベルを維持した（連続発酵運転中 500 時間目ないし 1500 時間目）。約 1500 時間目に発酵物中の酵母集団が突然 2 倍になり、その後 20 億個/ mL のレベルとなった。酵母数のこの変化は予期されないものであった。発酵期間中の酵母の生存率は 90% よりも高く維持された（図 6. 70）。

10

【0217】

図 6. 71 は、3 ヶ月にわたる発酵運転中のエタノール濃度および発酵ブロスの比重のデータを示す。バッチ期間のすぐ後に（ 180 時間目）、エタノール濃度が 70 g/L のレベルとなり、比重が最小値約 2.2°P に達した。上記の酵母数の突然の増加はエタノール濃度に反映されなかった。この酵母数の増加についての最も論理的な説明は、全酵母集団の大部分が増殖期に入り、酵母濃度のこのような倍加を示したというものである。エタノール濃度の低下は酵母濃度の上昇と合致すると考えられたが、このことは明確ではない。なぜなら連続運転中エタノールがその偽定常状態値 70 g/L のままであったからである。発酵時間に対する炭水化物濃度プロファイル（図 6. 72）は、エタノールと比重の曲線の場合と同じ結論を明らかにした。この運転は連続発酵約 250 時間目にその偽定常状態に達した。

20

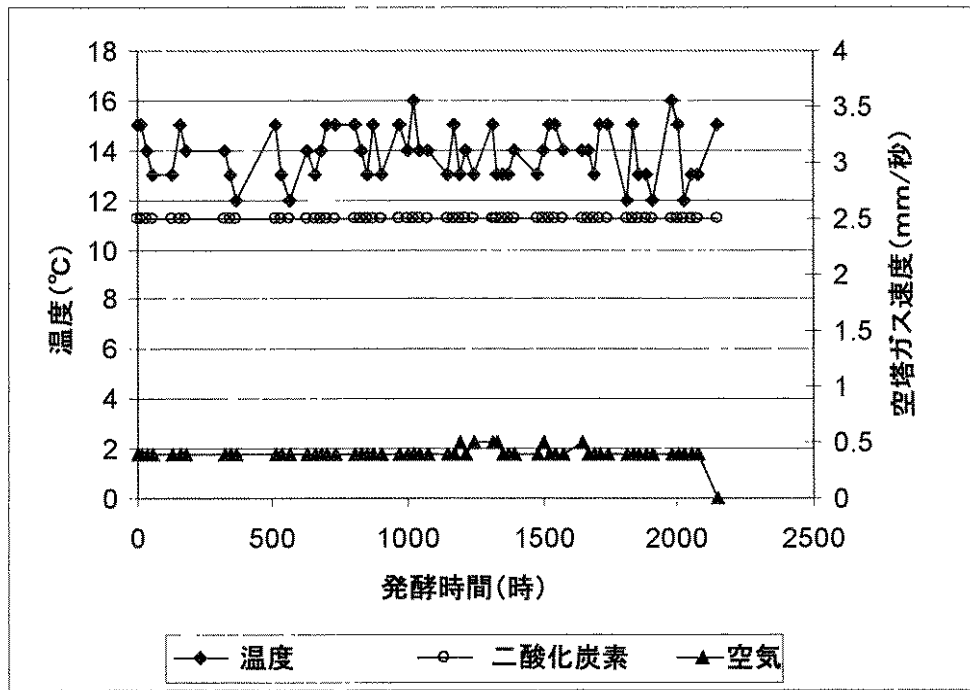
【0218】

図 6. 73 は、発酵時間に対するダイアセチルおよび $2, 3$ -ペンタンジオン濃度の曲線を示す。 $\square$ -カラギーナンゲルおよび $\text{LCC} 290$ ビシナルケトンの結果と同様に、ダイアセチルおよび $2, 3$ -ペンタンジオン濃度はバッチ期間後に増加して、それぞれ約 $225 \square \text{g/L}$ および $400 \square \text{g/L}$ の偽定常状態に達した。

30

【0219】

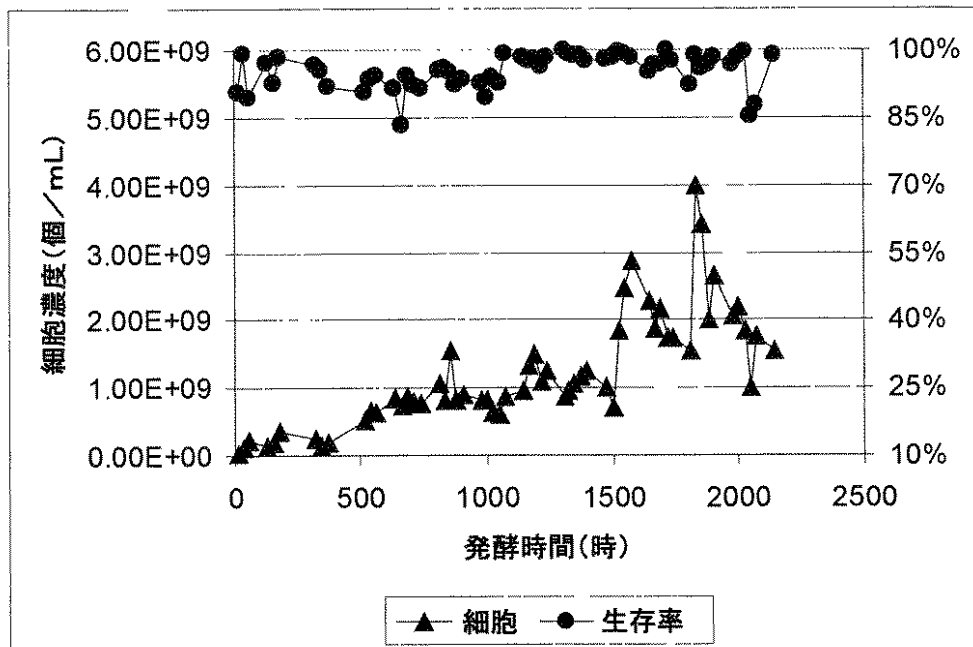
【表 70】



10

図 6. 69 発酵時間に対する L C C 3 0 2 1 発酵に関する運転パラメター。
【 0 2 2 0 】
【 表 7 1 】

20



30

図 6. 70 発酵時間に対する L C C 3 0 2 1 酵母の全酵母細胞濃度および生存率。
【 0 2 2 1 】
【 表 7 2 】

40

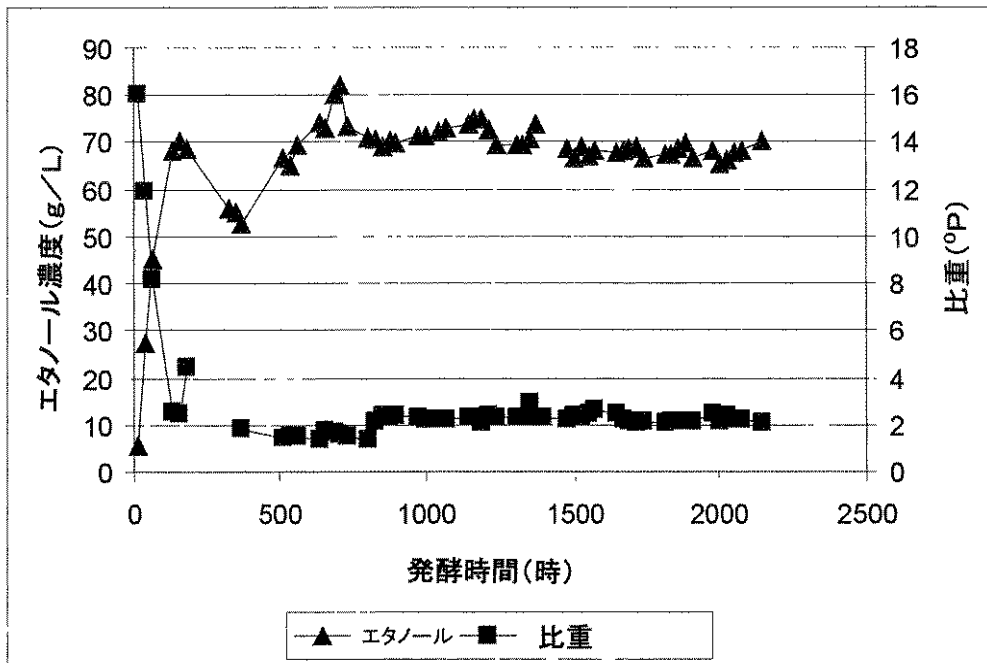


図 6. 7 1 発酵時間に対する L C C 3 0 2 1 酵母連続発酵のエタノール濃度および比重
 【 0 2 2 2 】
 【 表 7 3 】

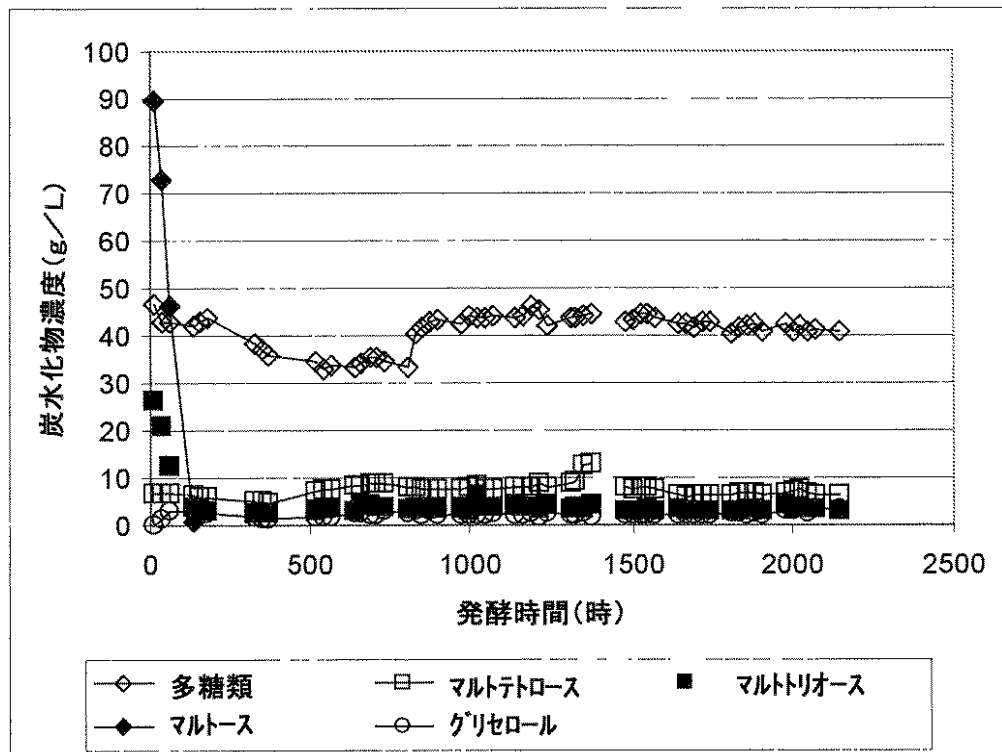
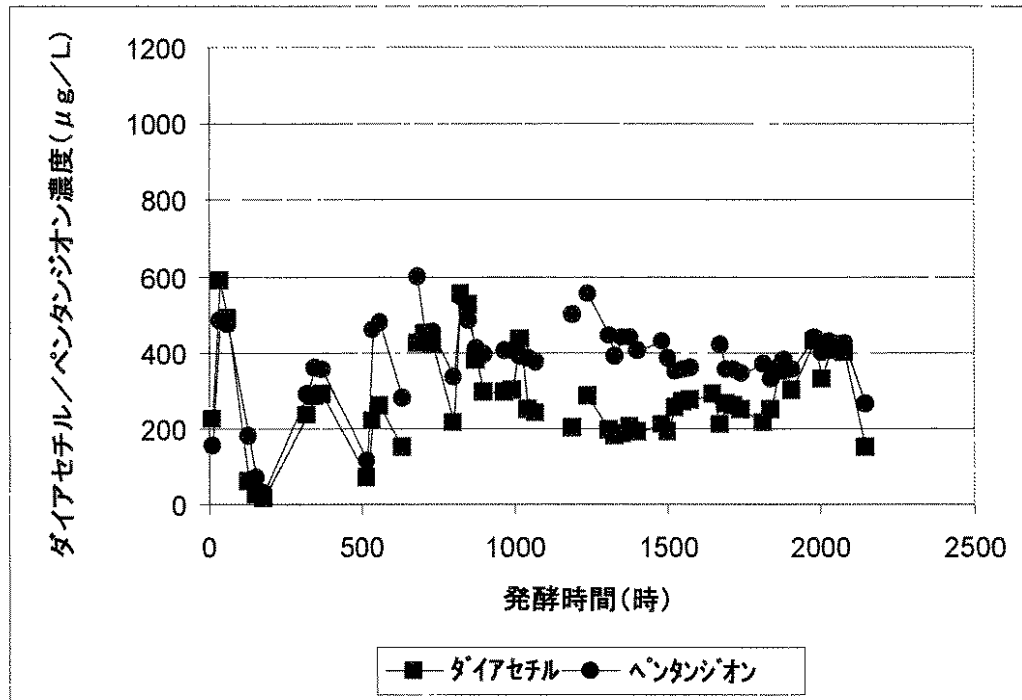


図 6. 7 2 発酵時間に対する L C C 3 0 2 1 酵母連続発酵の炭水化物プロファイル。
 【 0 2 2 3 】
 【 表 7 4 】



10

図 6. 73 発酵時間に対する L C C 3 0 2 1 連続発酵のビシナルジケトン類濃度。

20

【0224】

6. 5. 4 種々の担体の比較

セクション 6. 5. 1 から 6. 5. 3 までにおいて、固定化マトリックスとしての □ーカラギーナンゲルビーズ、L C C 2 9 0 超フロック形成酵母および L C C 3 0 2 1 中フロック形成酵母の発酵の質を示した。3 種すべての担体は 5 0 L のパイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター中での連続主発酵に適していると考えられた。2 4 時間という液の滞留時間が 3 種すべての場合に達成された。L C C 2 9 0 超フロック形成酵母を用いる発酵運転は、L C C 3 0 2 1 中フロック形成酵母および □ーカラギーナン固定化酵母システムよりもずっと早く偽定常状態に達した。L C C 2 9 0 発酵は運転中ほぼ 2 5 0 時間目にその最大エタノール濃度 7 0 g / L に達した。L C C 3 0 2 1 での運転では約 6 0 0 時間目にその定常状態エタノール濃度 7 0 g / L となった。□ーカラギーナン連続発酵の間、エタノールレベルは運転中 2 つの別個のポイントでレベル変化があった。先ず、エタノールは 2 0 0 ないし 5 0 0 時間目に 4 5 g / L となり、次いで、約 5 7 5 時間目に 7 0 g / L となり、試行の終りまでその濃度が維持された。

30

【0225】

3 種の発酵システムは 1 ミリリットルあたり最大約 1 0 億個の酵母細胞濃度に達すると思われた。酵母濃度の一貫性のなさは □ーカラギーナンシステムのエタノール生産性に負の影響を与えた (L C C 2 9 0 酵母システムと比較して低い最初の偽定常状態エタノール濃度)。各システムにおいて異なる時間間隔で酵母濃度のピークがあった。L C C 2 9 0 での運転に関しては、連続発酵 5 0 0 ないし 1 0 0 0 時間目にエタノールがその最大値に達し、L C C 3 0 2 1、での発酵では、連続運転 1 5 0 0 ないし 2 0 0 0 時間目に最大細胞数となった。□ーカラギーナン固定化システムは連続運転 7 0 0 ないし 1 0 0 0 時間目に最大細胞濃度に達した。

40

【0226】

3 タイプの固定化細胞ー L C C 2 9 0 超フロック形成酵母、L C C 3 0 2 1 中フロック形成酵母および □ーカラギーナン固定化酵母ーでの発酵におけるダイアセチルおよび 2 , 3 -ペンタンジオンの偽定常状態濃度は類似していなかった。L C C 2 9 0 での発酵では、ダイアセチルは 3 7 5 μ g / L に落ち着いたが、L C C 3 0 2 1 発酵物中のレベルは約 2 2 5 μ g / L となった。□ーカラギーナンでの発酵の場合、ダイアセチル濃度は 5 0 0 μ g / L に達し、連続運転の中ごろにそのレベルは徐々に低下し、5 0 0 時間の時間枠内で

50

約 200 □ g / L に低下した。3 種すべての運転において 2, 3-ペンタンジオン濃度はダイアセチル濃度と同様の变化を示し、LCC290 および LCC3021 での発酵中は 2, 3-ペンタンジオン濃度はダイアセチルよりも高かった。□-カラギーナンでの発酵の場合には異なったパターンが示され、その最初の偽定常状態の間はダイアセチルレベルは 2, 3-ペンタンジオンよりも高く、その後、ダイアセチル濃度は 2, 3-ペンタンジオン濃度を下回った。酵母濃度のデータおよびエタノール産生のデータもまた、□-カラギーナンでの発酵の間に 2 つの別個かつ独特な偽定常状態が達成されたことを示唆するものである。

【0227】

異なる発酵システムを比較し、1 つよりも多い判断基準に基づいてシステムのメリットを判断した場合、いずれがより良いものであるかを評価する研究を行った。例えば、正味のエタノール産生能だけを成功の尺度として用いた場合、3 つの試験したシステムはすべて同等に良好なものであろう。なぜなら 50 L のリアクター中、24 時間の滞留時間での 70 g / L のエタノールの産生がすべての場合において達成されたからである。

【0228】

販売可能なビールの製造には単なるエタノール産生以上のものが求められる。許容できるビールの生産能（とりわけ、エタノール生産性およびダイアセチルレベル）、担体の潜在的なコスト増、担体の利用可能性、システム運転の容易さ、担体の廃棄のごとき環境問題、担体の安定性、ならびに担体系により提供されるフレキシビリティに基づいて、提案された発酵システムを評価すべきである。かかる多要素シナリオを評価するために、ビジネスの世界では、「バランスト・スコアカード (Balanced Scorecard)」と呼ばれるディメンジョンレス分析法が用いられている (Kaplan and Norton, 1996)。最初の工程は、システムを評価する判断基準の確認を包含する。次いで、各判断基準に 1 から 5 までの評点を与え、1 は最も好ましくないであり、5 は最も好ましいである。分析の終りに、各オプションに関する評点を合計し、最高評点の選択物がその状況下でのベストチョイスである。

【0229】

表 6. 2 は、50 L のパイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター中で発酵に使用される潜在的な選択物としての固定化担体について行ったバランスト・スコアカード分析の結果を示す。合計 6 種の担体-キトパール（登録商標）、キトサンビーズ、セライト（登録商標）珪藻土ビーズ、シラン（登録商標）ガラスビーズ、□-カラギーナンゲルビーズ、中フロック形成 LCC3021 酵母および超フロック形成 LCC290 酵母を、販売可能なビールの製造という最初の目的に関して評価した。上記尺度を用いて各担体系を評価した。総体的には、LCC290 超フロック形成酵母が最良の品質であり、それに近いものが中フロック形成酵母 LCC3021 であった。他の 4 種の担体は 16 ないし 20 点であった。第 3 位は□-カラギーナン系であった。なぜなら販売可能な液体がパイロットユニットにおいて製造されたからである。この担体の評価から、連続発酵システムの開発における将来の研究対象を、固定化方式として自己凝集に絞るべきであることが示唆される。かかる選択物により提供される利用可能性（容易に使用できること）、コスト（操作にさらなる装備を要さないために低コスト）、操作が簡単であること（既存のプラント運転に適合すること）は、攪拌系での酵母凝集物の不安定さに優るものである。自己凝集のせん断力感受性を利用して、発酵プロセス注のフロックのサイズを制御することが可能であり、物質移動が増加する可能性があるかもしれないし、それゆえ、さらにバイオリアクターの体積測定生産性が増加する可能性がある。

【0230】

【表 75】

	キト ^ハ ール (登録商 標)	セライト (登録商標)	シラン (登録商 標)	カラギーナン	LCC3021	LCC290
良いビール	3	1	1	4	5	4
コスト	2	3	1	3	5	5
利用可能性	1	5	5	2	5	5
操作容易性	3	1	1	3	4	5
廃棄/環境	4	3	4	2	3	3
安定性	4	1	1	3	2	3
フレキシビリティ	3	3	3	1	2	5
合計	20	17	16	18	26	30

10

【0231】

6. 6 ガスリフトドラフト管テクノロジーを使用した北米タイプのラガービールの製造
クリーンな味の北米 (N A) タイプのラガービールの製造が多数の醸造者により行われて
いる。N A タイプのラガービールは、淡色、苦味の少ない味プロファイル、残糖が少ない
こと (薄い)、支配的な風味がなく、それにより比較的后味が無いことによって特徴付け
られる。これらの固有の性質のために、醸造者は、風味の欠点をほとんど隠すことができ
ない。高レベルのダイアセチル (バター)、アセトアルデヒド (青リンゴ)、ならびに硫
黄の悪臭 (焼けたゴム、スカンク臭、腐った卵、調理済みの野菜類) は、現在の醸造者を
悩ませる最も一般的な風味の問題である。発酵培地の微生物汚染もまた、ビールにおける
これらの異常な風味の原因であり得るにもかかわらず、発酵過程の不適切な制御により予
期される異常な風味レベルよりも増加する。

20

【0232】

この論文の一部として行った連続培養試験を通して、麦汁および発酵槽の汚染レベルを、
入念な無菌法の実施により制御した。数ヶ月間にわたる3つ全てのキャリア型を使用した
発酵試験では、検出可能なレベルの汚染は認められなかった (第4章で報告した方法によ
ってモニターした)。連続主発酵由来の製品では所望レベルよりも高いダイアセチル (3
0 μ g/L 未満の標的) およびアセトアルデヒド (10 mg/L 未満の標的) が認められ
るが、これらのレベルは細菌感染によるものではなかった。これらの所見は、文献で報告
されたものと異なる (P a j u n e n ら、2000; K r o n l o f ら、2000)。
。ベルギーの醸造者は、連続発酵過程由来のビール中の高レベルのアセトアルデヒドを販
売のための特性に変化させて、リンゴ風味のエールとして製品を市場に出した (A n d r
i e s ら、1996b)。

30

【0233】

主発酵後の高レベルのダイアセチルもまた、醸造業では一般的である。醸造者の中にはダ
イアセチルの還元を補助するために主発酵の完了後に「温度自由上昇 (t e m p e r a t
u r e f r e e r i s e)」と呼ばれる手法を適用している。その他の醸造者は、熟
成プロセスの間のより長い期間その製品を単に保持することを選択し、ビシナルジケトン
(ダイアセチルおよび2, 3-ペンタンジオン) の所望のレベルの還元を達成した。別の
アプローチでは、いくつかの研究グループが、高ダイアセチルレベルを操作するために第
2章で考察した迅速な熟成テクノロジーを開発した。このアプローチは非常に有効である
にもかかわらず、醸造プロセス全体にいくつかの承認が困難な別のレベルの複雑さを付与
する。

40

【0234】

迅速な熟成過程の経済性は非常に明白であるが、醸造業において連続処理が導入されて間

50

もない頃に、伝統的なバッチ発酵から連続生産への移行を容易にするために複雑な技術を最小にすることが望ましいかもしれない。この理由のために、完成したビールの高レベルのダイアセチルを制御するために、50 Lのパイロットスケールのガスリフト系内での連続主発酵後にバッチ保持の使用を調査することを決定した。このさらなる処理工程はこのPh.Dプログラムの開始時に予測されていなかったが、連続製造されたビールとバッチ制御ビールとを比較するためにこのような測定を実施する必要があった。

【0235】

6. 6. 1 連続主発酵後のバッチ保持の使用

主発酵完了の重要な決定パラメータは、最終発酵液中のダイアセチルレベルである。ダイアセチル前駆体（□-アセトラクテート）のダイアセチルへの変換は、ダイアセチル経路における律速段階である（図3. 5）。この最初の反応は本質的に化学的であり、高度に温度に依存する。「若」ビールが□-アセトラクテートのダイアセチルへの化学的変換前に冷熱成プロセスに入った場合、冷熱成期間を延長して前駆体の変換を遅延させることができないかぎり、得られたビールのダイアセチルレベルは20 $\mu\text{g/L}$ の味の閾値を超え得る。第6. 5節に記載の3つ全ての連続発酵では、リアクターから排出される非希釈ビール中のダイアセチルレベルは、30 $\mu\text{g/L}$ の所望の標的値を超えていた。この段階で液体を濾過して酵母を除去した場合、ダイアセチルが大量に残存するので、加温バッチ期を使用してダイアセチル値を許容範囲未満に減少させた。

【0236】

連続発酵ビールを回収し、40 Lのステンレススチール製のビール容器中で21 $^{\circ}\text{C}$ に保持した。少量のサンプル（100 mL）を液体から定期的に回収し、ダイアセチル、エタノール、比重、エステル、およびフーゼルアルコールについて分析した。図6. 74は、固定化マトリックスとしてLCC290酵母を使用して連続的に発酵させたビールの1バッチについての加温保持時間に対するダイアセチルの還元を示す。加温保持期間は、ダイアセチルレベルを約600 $\mu\text{g/L}$ から30 $\mu\text{g/L}$ 未満（醸造業において「プレドロップ（pre-drop）」範囲として考慮されるもの）に減少させるのに有効であった。

【0237】

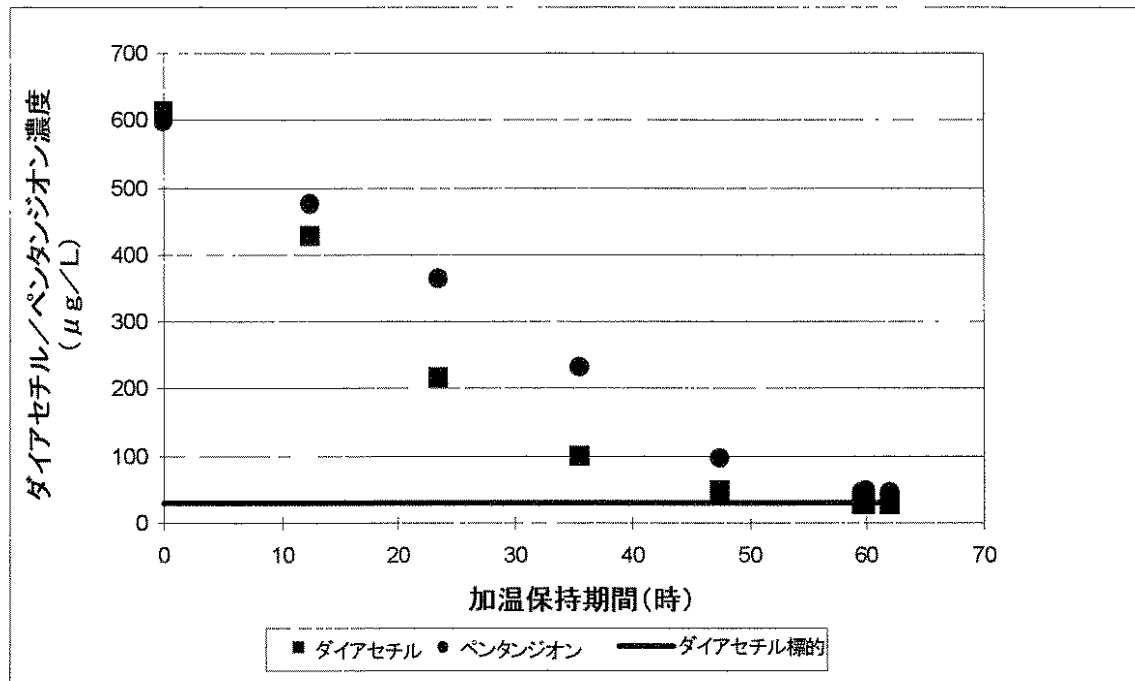
別の試験では、保持期間中のダイアセチル還元に対する攪拌の効果を調査した。保持期間中の液体攪拌を保持するために、ビール回収容器の底に1. 27 cmのステンレススチール配管を介して二酸化炭素スパーキングガス（0. 14 $\text{m}^3/\text{時}$ ）を導入した。図6. 75は、この実験の結果を示す。CO₂スパージによる攪拌はこの二次保持タンクにおけるダイアセチルの還元速度に直接ほとんど影響を与えないようであった。この結果は、CO₂混合ガスによって第1の化学反応（□-アセトラクテートのダイアセチルへの変換）の反応速度を増大させないか、第2の反応（酵母によるダイアセチルのアセトインへの変換）の物質移動速度より迅速に行えない不適切な混合であることを示し得る。律速化学変換（第1の工程）が一旦起こると、非攪拌容器が懸濁液中にダイアセチルの風味のある不活性アセトインへのさらなる還元に必要な細胞を有することも可能かもしれない。

【0238】

エステルおよびフーゼルアルコールの濃度ならびに液体のエタノール濃度および比重に対する連続主発酵後のこの加温バッチ保持の効果を、それぞれ図6. 76および6. 77に示す。これらの結果から、加温保持期間は、アセトアルデヒド、酢酸エチル、プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール、および酢酸イソアミルの濃度にほとんど影響を与えないようであった（図6. 76）。保持容器中の液体の比重は、保持期間の最初の12時間で2. 7⁰ Pから2. 0⁰ Pまで減少し、この低い値で安定した。エタノール濃度は、65時間の試験期間を通して70 mg/L で安定した。これらの結果は、保持期間は主にダイアセチルおよび2, 3-ペンタンジオンの濃度に影響を与え、エステル、フーゼルアルコール、およびエタノールへの影響は最小であることを示した。

【0239】

【表76】



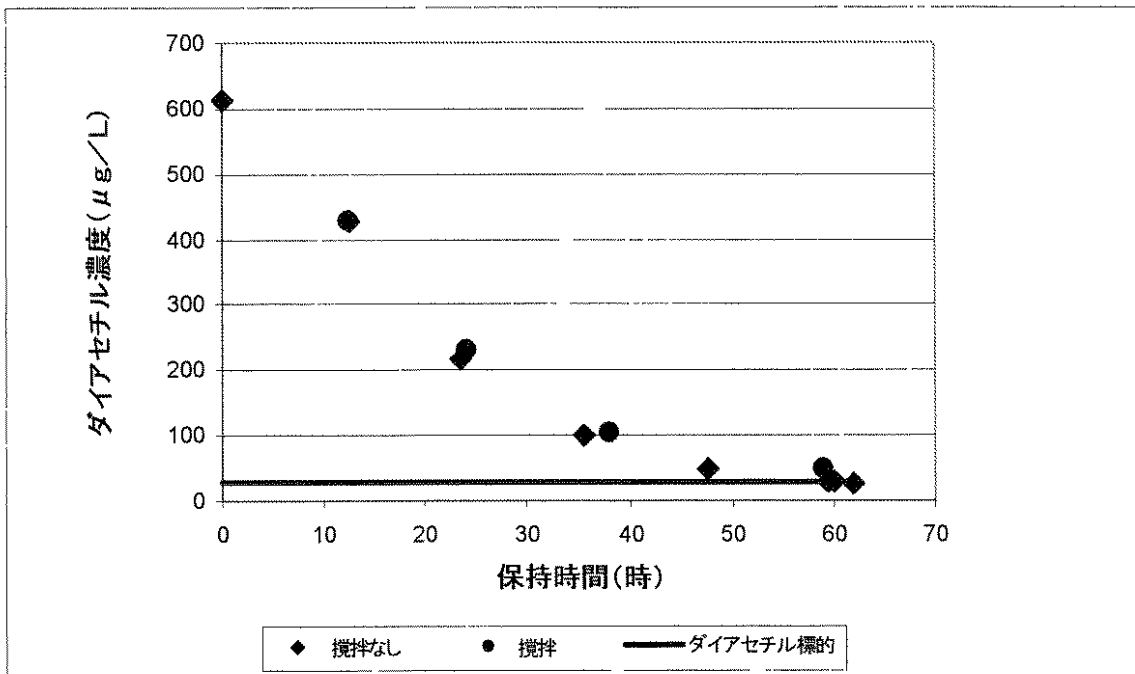
10

図 6. 7 4 ガスリフト系における L C C 2 9 0 酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するビシナルジケトン濃度

20

【 0 2 4 0 】

【 表 7 7 】



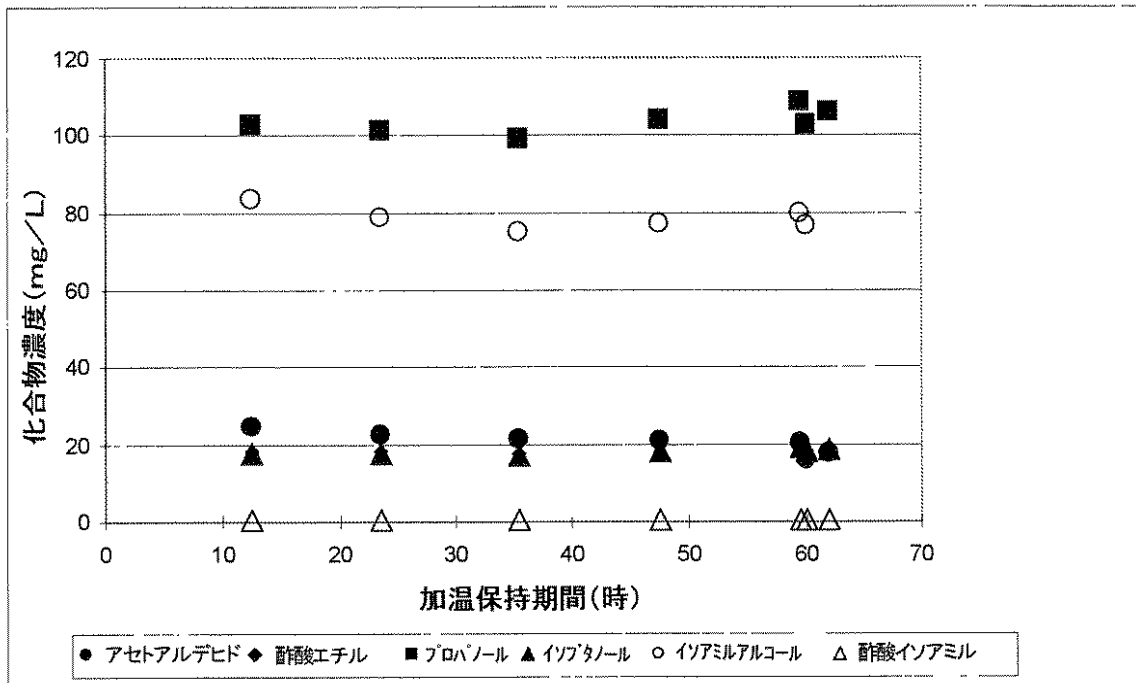
30

40

図 6. 7 5 ガスリフト系における L C C 2 9 0 酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するダイアセチル濃度。一方のサンプルを二酸化炭素ガススパージによって撹拌し、他方のサンプルを静置した。

【 0 2 4 1 】

【 表 7 8 】



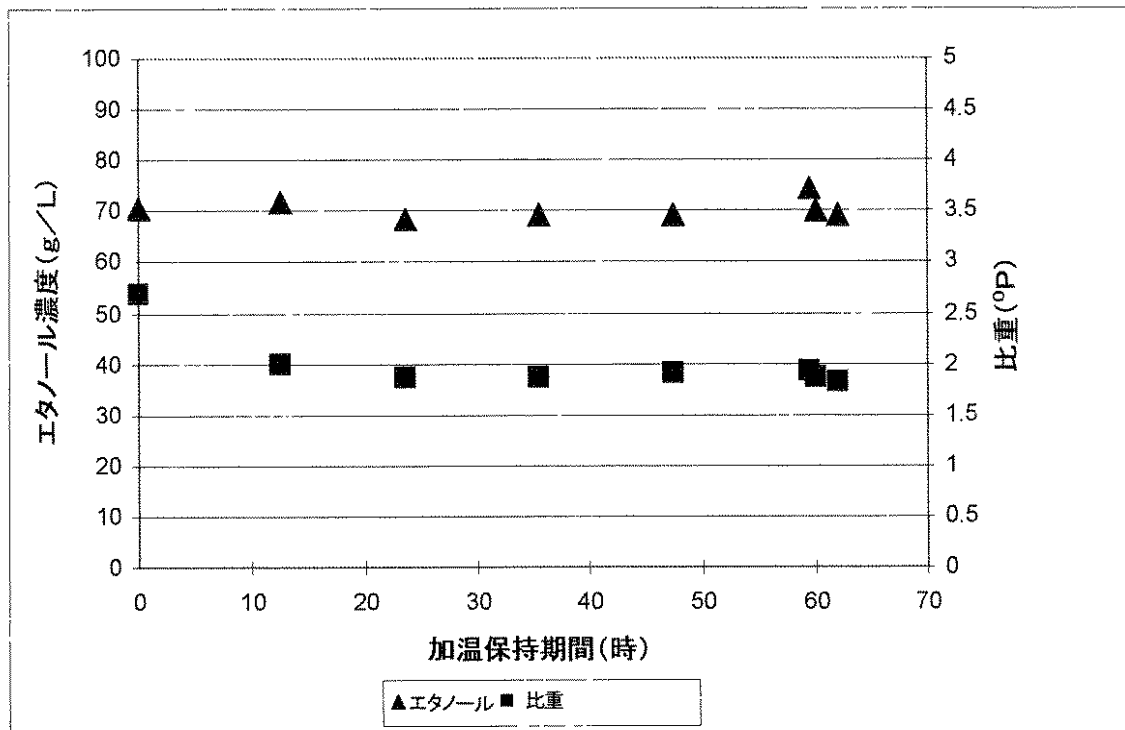
10

図 6. 76 ガスリフト系における LCC290 酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するエステルおよびフーゼルアルコール濃度

20

【0242】

【表 79】



30

40

図 6. 77 ガスリフト系における LCC290 酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するエタノール濃度および比重。

【0243】

LCC290 超フロック形成酵母、LCC3021 中間フロック形成酵母、または□ーカラギーナン固定化酵母を使用した 50 L のガスリフトバイオリアクターでの連続発酵から生成された液体に対してバッチ保持プロトコルを行った。これら 3 つの試験のダイアセチル還元プロファイルを、図 6. 78 に示す。3 つの場合において、ダイアセチルは 30

50

$\mu\text{g}/\text{L}$ の標的値に首尾よく還元された。しかし、この還元を達成するために必要な時間は、3つの場合でそれぞれ異なった。LCC290条件では、約48時間で $600\mu\text{g}/\text{L}$ から $30\mu\text{g}/\text{L}$ に還元し、LCC3021発酵および $\square$ -カラギーナン発酵ではこの標的値に達成するために約24時間および約40時間までしか必要としなかった。この矛盾はダイアセチルの初期開始値に関連し、使用した固定化マトリックスタイプに関連しないと見なされた。

【0244】

図6.79は、LCC3021および $\square$ -カラギーナン発酵由来の結果に対して行った時間を調整した図6.78と同一のダイアセチルの結果を示す。後者の2つの発酵由来の元のダイアセチル還元曲線を、その初期値をLCC290超フロック形成酵母によって作成されたダイアセチル還元曲線上に重なるようにシフトした。この変換を使用して、3つ全ての系についてのダイアセチル還元プロファイルは同一線上に重なるようであった。TableCurve2Dソフトウェアを使用して、これらの結果を、一次反応速度式の曲線にフィッティングした(Levenspiel, 1972)(図6.80)。調整した図6.79由来の実験データを相関係数0.96で以下の式:

$$[\text{ダイアセチル}] = 648.54 e^{(-0.0426t)} \quad (6.1)$$

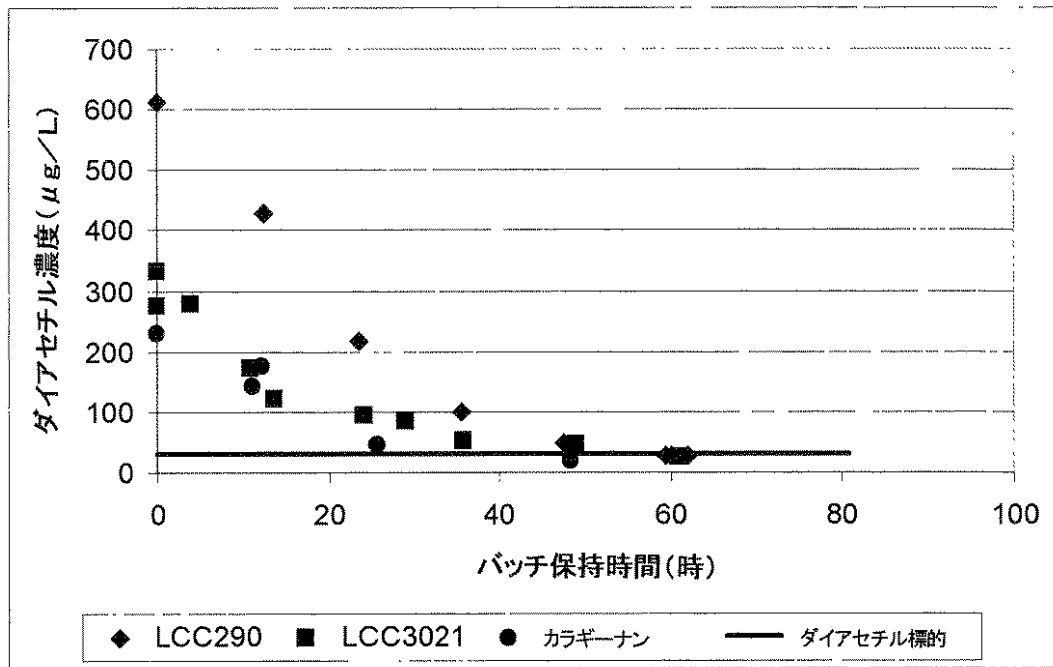
に当てはめて計算した。この結果は、3つ全ての固定化系が同一のダイアセチル還元ポテンシャルを示すという理論を強く支持する。ダイアセチル還元はしばしば酵母株に参与するので、この結果は驚くべきことではない(Nakataniら, 1984)。 $\square$ -カラギーナン系によりそのゲル構造内にLCC3021酵母が固定され、LCC290酵母はLCC3021株の選択された変異型であった。

【0245】

一旦ダイアセチルレベルが $30\mu\text{g}/\text{L}$ の標的レベル未満になると、得られたビールを最終製品の製造(濾過、希釈、炭酸化、および包装)から7日前に冷蔵(2°C)にて熟成させた。表6.3は、固定化マトリックスとしてLCC290酵母、LCC3021酵母、または κ -カラギーナン固定化酵母のいずれかを使用した50Lのパイロットスケール系で製造したビールの分析をまとめている。図6.81は、連続製造した3つのビールおよびバッチで工業的に製造した1つの対照ビールのエステルおよびフーゼルアルコールのリーダーグラフである。工業的に製造したバッチ液(対照)と比較して、連続液のエステル(酢酸エチル、酢酸イソアミル)濃度は低く、プロパノール濃度は高く、イソブタノール、第一級アミルアルコールおよびイソアミルアルコール濃度は低かった。連続発酵製品中のアセトアルデヒドレベルは、対照液よりも高かった。発砲レベル、初期寒冷混濁、加温混濁、硫化ジメチル、二酸化硫黄、二酸化炭素、および空気のレベルは、規定範囲内であった。

【0246】

【表80】



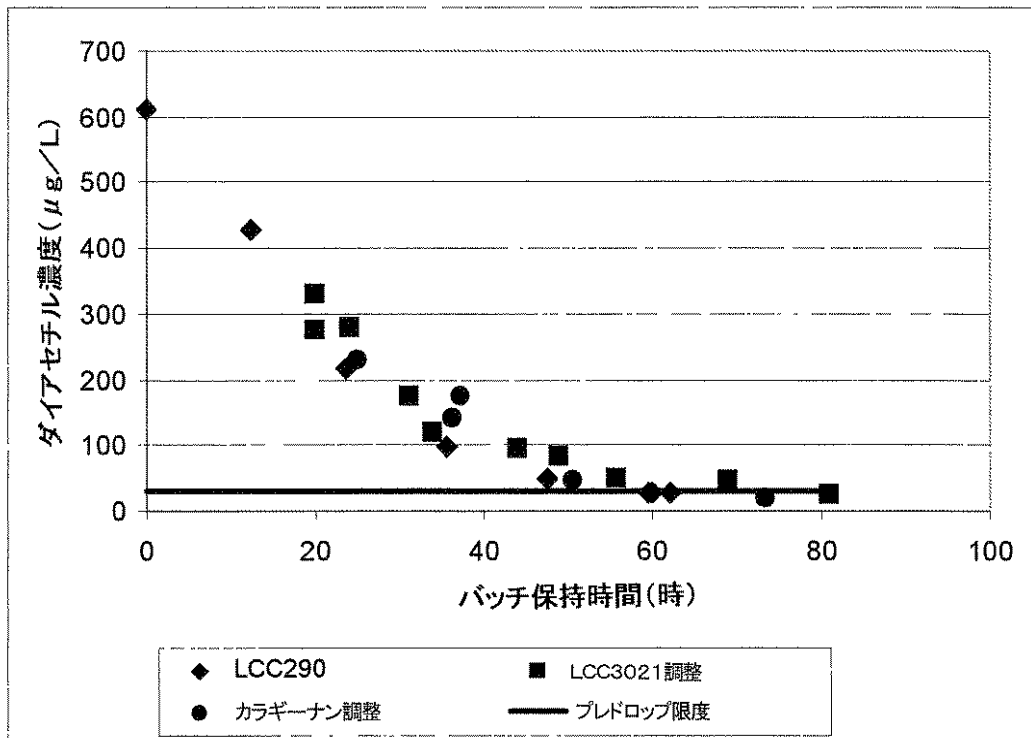
10

図6. 78 ガスリフト系におけるLCC290酵母、LCC3021酵母、およびカラギーナゲル固定化酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するダイアセチル濃度

20

【0247】

【表81】



30

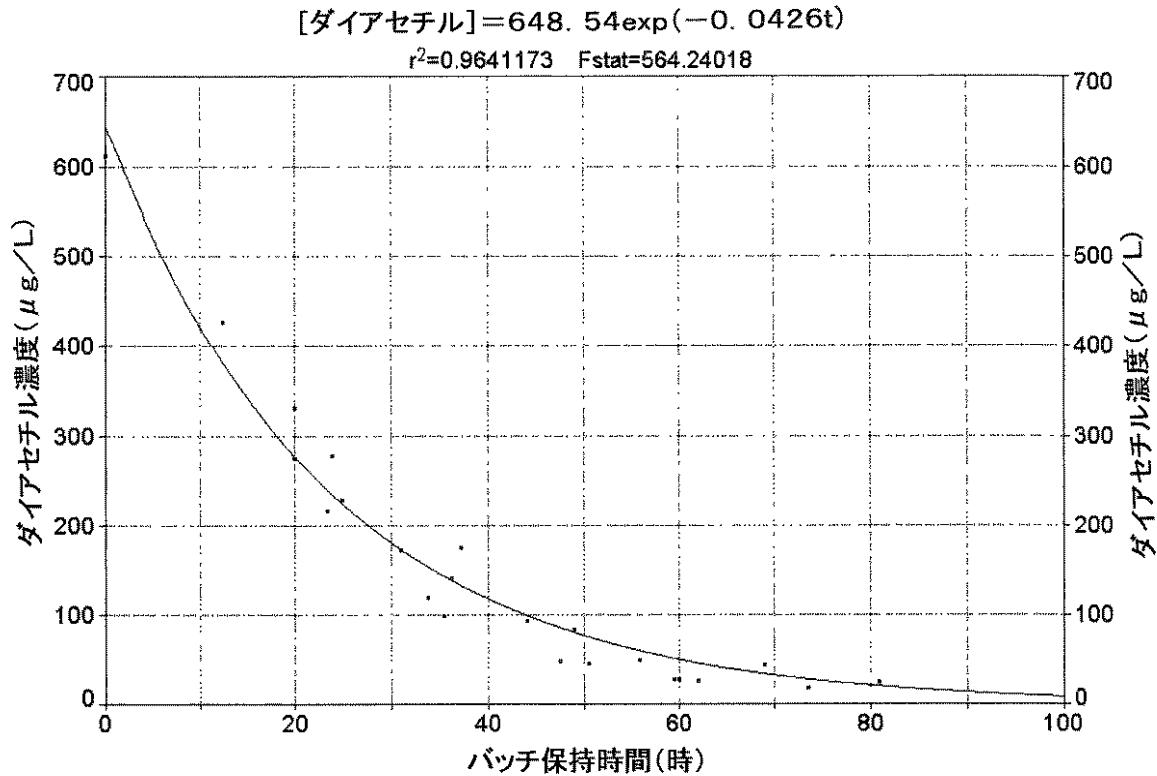
40

図6. 79 ガスリフト系におけるLCC290酵母、LCC3021酵母、およびカラギーナゲル固定化酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するダイアセチル濃度。LCC3021発酵およびカラギーナン発酵についての値を、LCC290発酵と同一の出発点となるまで調整した。

【0248】

【表82】

50



10

20

図6. 80 ガスリフト系におけるLCC290酵母、LCC3021酵母、およびカラギーナンゲル固定化酵母を使用した連続主発酵後の加温バッチ保持に対するダイアセチル濃度。LCC3021発酵およびカラギーナン発酵についての値を、LCC290発酵と同一の出発点となるまで調整した。

【0249】

連続発酵製品は元のエタノール濃度が高いために（バッチにおいて60 g/Lに対して70 g/L）所望のエタノール値に達するまでより大量の水での希釈が必要であるので、元のエタノール濃度から5.0% v/vの最終値への製品の希釈によって著しく影響を受けるいくつかの他のパラメータ（見かけ上の抽出物、実際の抽出物、計算上の元の抽出物、色、苦味）は対照と異なる。図6. 82は、上記と同一の液体のアルコール、ダイアセチル、pH、色、および苦味のレーダーグラフである。アルコールレベル、ダイアセチル、およびpHは十分に標的の範囲内であり、色および苦味は規定範囲外である。色が薄いのは、連続発酵液の希釈度が高いことに関連するが、これを麦汁栄養供給による色の増加によって調整することができる。苦味値もこの同一の希釈誤差にを被り、麦汁供給において調整する。

30

【0250】

表 6. 3 ガスリフト系を使用して製造したビールについての分析のまとめ

仕様	工業的パッ チ発酵液	L C C 2 9 0 連続発酵液	L C C 3 0 2 1 連続発酵液	カラギーナ ン連続発酵 液
空気 (m L)	< 1	0. 4 0	0. 3 5	0. 3 5
二酸化炭素 (%)	2. 7 5	2. 9 0	2. 8 1	2. 7 3
二酸化硫黄 (m g / L)	< 1 0	0	0	0
硫化ジメチル (μ g / L)	< 7 0	5 9	3 0	3 0
苦味 (B U)	1 2. 0 0	1 1. 3 0	1 3. 7 4	1 3. 1 8
色 (S R M)	3. 2 0	2. 2 0	2. 1 0	2. 3 0
p H	4. 1 0	4. 1 5	4. 1 0	4. 0 9
ダイアセチル (μ g / L)	< 2 0	1 2	1 2	9
アルコール (% v / v)	5. 0 0	4. 9 9	5. 0 3	5. 0 4
アルコール (% w / w)	3. 9 3	3. 9 3	3. 9 6	3. 9 6
見かけ上の抽出物 ($^{\circ}$ P)	1. 5 5	1. 0 2	1. 4 0	1. 4 4
実際の抽出物 ($^{\circ}$ P)	3. 3 6	2. 8 4	3. 2 4	3. 2 7
計算上の元の抽出物 ($^{\circ}$ P)	1 1. 0	1 0. 5	1 1. 0	1 1. 0
加温混濁 (F T U)	< 2 0 0	4 5	5 0	4 7
初期寒冷混濁 (F T U)	< 1 0 0	4 3	5 1	5 4
泡 (秒)	> 1 7 0	1 6 7	1 8 7	1 7 5
アセトアルデヒド (m g / L)	4. 4 $\pm$ 1. 3	1 0. 0	2 1. 9	1 1. 6
プロパノール (m g / L)	1 2. 8 $\pm$ 6. 8	5 7. 6	5 1. 7	8 4. 3
酢酸エチル (m g / L)	3 2. 4 $\pm$ 4. 3	1 1. 0	1 0. 6	8. 7
イソブタノール (m g / L)	2 1. 6 $\pm$ 3. 4	1 0. 6	8. 3	8. 9
第一級アミルアルコール (m g / L)	2 0. 0 $\pm$ 2. 3	1 5. 2	9. 4	6. 4
イソアミルアルコール (m g / L)	6 0. 9 $\pm$ 8. 6	4 8. 0	4 0. 9	4 6. 5
酢酸イソアミル (m g / L)	2. 5 $\pm$ 0. 7	0. 3 2	0. 2 5	0. 1 8

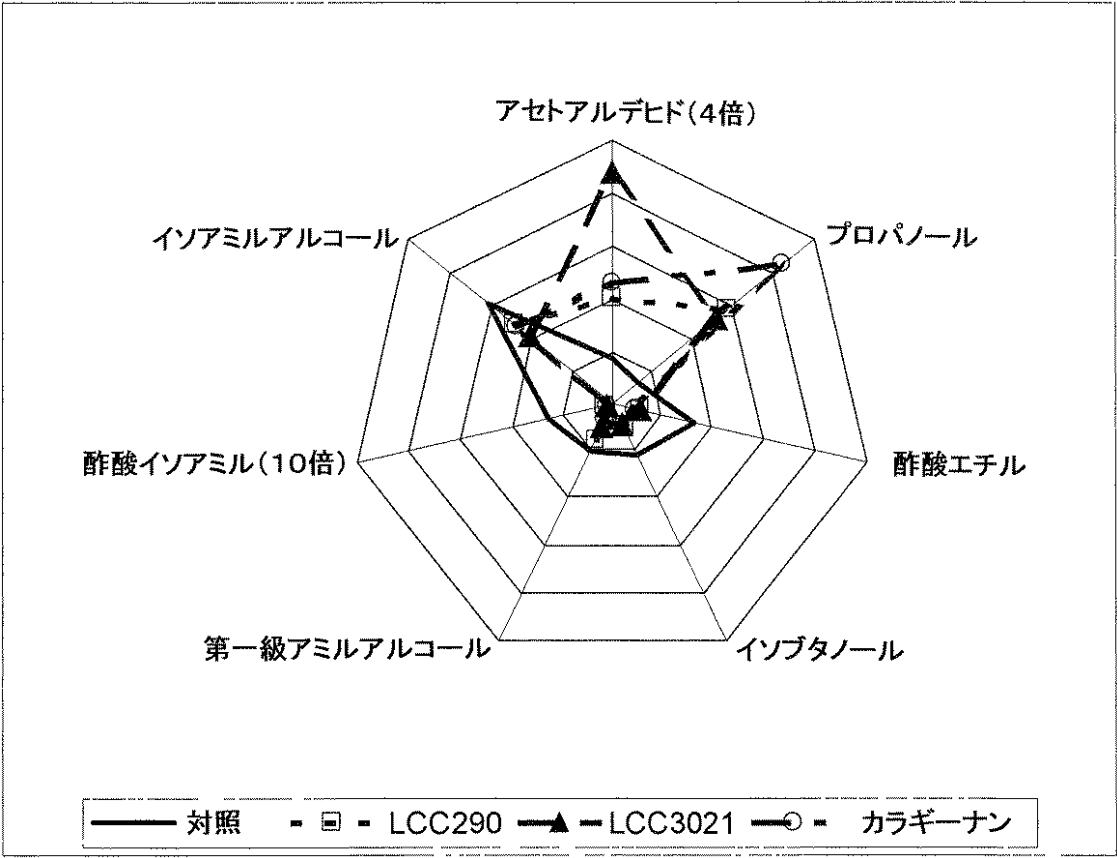
10

20

30

【 0 2 5 1 】

【 表 8 3 】



10

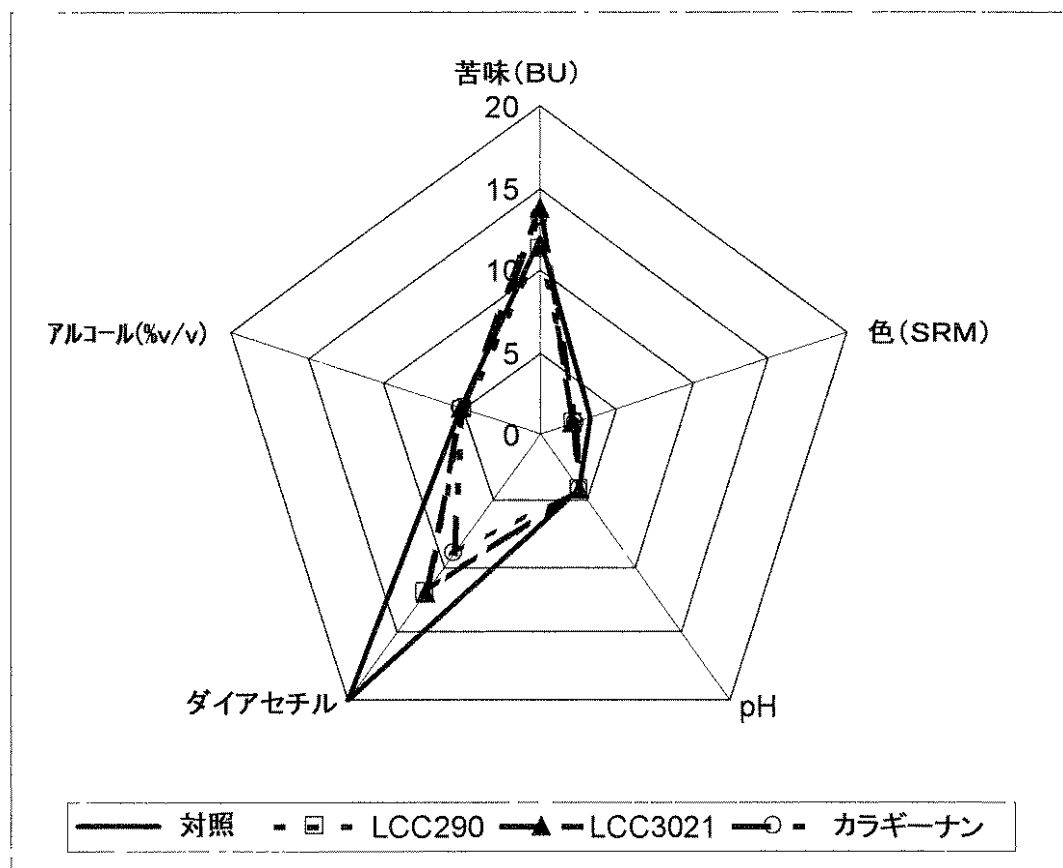
20

図 6 . 8 1 ガスリフト系における L C C 2 9 0 酵母、L C C 3 0 2 1 酵母、およびカラギーナンゲルビーズに固定した L C C 3 0 2 1 酵母いずれかを使用した連続発酵ビールのレーダーグラフ。完成したビールのエステルおよびフーゼルアルコールをこのグラフ中に示す。全製品を、主発酵段階後に加温バッチ保持に供した。

【 0 2 5 2 】

【 表 8 4 】

30



10

20

図 6. 8 2 ガスリフト系における L C C 2 9 0 酵母、L C C 3 0 2 1 酵母、およびカラギーナンゲルビーズに固定した L C C 3 0 2 1 酵母のいずれかを使用した連続発酵ビールのレーダーグラフ。完成したビールのエステルおよびフーゼルアルコールをこのグラフ中に示す。全製品を、主発酵段階後に加温バッチ保持に供した。

【 0 2 5 3 】

30

6. 6. 2 最良のスパージングガスの選択

酵母発酵の天然の副産物であるので、ほとんどの醸造所で二酸化炭素を容易に利用可能である。醸造所は、誘導した CO_2 を回収し、ガス流を洗浄して回収流に残存するわずかな不純物（典型的には、硫黄化合物）を除去した。次いで、この精製流を圧縮し、醸造所での今後の利用のために液体として保存する（純度 99.95%）。連続発酵におけるスパージングガスとしての二酸化炭素の使用は、操作の観点から論理的な選択と思われた。植物はその回収系を使用して連続発酵から排出される CO_2 を回収することができる。他のガスの使用は、既存の植物操作に対する別のレベルの複雑さのみを付与する。

【 0 2 5 4 】

40

しかし、既存のバッチ操作の代替法を実行可能にするための連続発酵のために、既存のブランドと非常に適合する製品を製造する必要がある。連続発酵中に酵母が曝露される生物学的／生化学的影響の最小化によってこのような製品に適合させることが可能であると考誤差れる。二酸化炭素は、主発酵中の酵母代謝に悪影響を及ぼすことが公知である。この効果は、系に固有の上部圧力により液体培地からの自由な CO_2 放出が抑制される背の高い円錐状容器で大きくなる。これらの条件は、エステルがより少なく、且つフーゼルアルコールがより多いビールを製造する傾向がある。補助ガス流の円錐状容器の底への定期的な注入によって発酵物から首尾よくこの CO_2 を幾分除去した。 CO_2 の阻害効果は、フーゼルアルコールレベルがより低く、且つエステルレベルがより高い製品が得られるにつれて減少するようであった。

【 0 2 5 5 】

50

この知識に基づいて、ガスリフト系内でのスパージングガスとして二酸化炭素の代わりに

窒素ガスの使用が調査された。50 Lのアップリフトリアクター中で発酵させたいくつかの液体を回収し、ラバット実験醸造所で以下の工程を使用して処理した。リアクターからの液体回収から14時間後（滞留時間は24時間）、「若ビール」を酵母からデキャントした。次いで、この液体を、室温（21℃）で48時間保持し、ダイアセチルおよびアセトアルデヒドをラバット規定（ダイアセチル＜30 μg/Lおよびアセトアルデヒド＜10 mg/L）に到達させた。次いで、この液体を7日間冷却熟成し、標準的な工業的手法を使用して処理した。

【0256】

表6. 4は、CO₂をスパージする系およびN₂をスパージする系でLCC290酵母を使用した連続発酵から得た完成品のビールと標準的に工業的に製造した液体（対照）との結果を比較する。窒素スパージ液体を、工業的に製造した液体と比較することが好ましい。分析は、液体中の1-プロパノールが2倍であり、硫化ジメチル濃度は約1/3であることを示した。NIBEM試験によって測定したところ、発砲の潜在性と同様に、色および苦味の値は工業的液体よりも高いようであった。CO₂スパージビールは、窒素スパージ液体よりもエステル（酢酸エチル、酢酸イソアミル）が少なく、1-プロパノールが多い。フーゼルアルコール（1-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール）に対するエステル（酢酸エチル、酢酸イソアミル、ヘキサン酸エチル、オクタン酸エチル、デカン酸エチル）の比を、対照液体、窒素スパージ液体、およびCO₂スパージ液体について計算し、それぞれ0.30、0.27、0.15であることが見出された。

【0257】

表6. 4 LCC290超フロック形成酵母をロードしたガスリフト系を使用して連続発酵させた

いくつかの製品についての化学分析のまとめ

【表85】

分析	工業的にバッチ発酵させた液体	窒素スパージした連続発酵液体	CO ₂ スパージした連続発酵液体
アセトアルデヒド (mg/L)	2.53	3.68	4.80
酢酸エチル (mg/L)	28.08	30.90	14.14
1-プロパノール (mg/L)	13.03	28.45	40.03
イソブタノール (mg/L)	17.15	17.89	7.01
酢酸イソアミル (mg/L)	2.57	2.06	0.69
イソアミルアルコール (mg/L)	74.54	78.45	51.35
ヘキサン酸エチル (mg/L)	0.140	0.180	0.074
オクタン酸エチル (mg/L)	0.110	0.280	0.059
デカン酸エチル (mg/L)	0.0079	0.0630	0.0081
ダイアセチル (μg/L)	6	9	10
2, 3-ペンタンジオン (μg/L)	4	5	14
二酸化硫黄 (mg/L)	1.3	1	0
硫化ジメチル (mg/L)	79	24	64
苦味 (BU)	11.5	20.6	15.5
色 (SRM)	3.1	4.1	3.7
泡 (秒)	176	210	195
FAN (mg/L)		92	84
pH	4.13	4.10	4.19
RE (°P)	3.38	4.08	3.601
COE (°P)	10.97	12.77	11.50
アルコール (%v/v)	4.93	5.74	5.17

【0258】

図6. 83は、3つの液体のエステル、フーゼルアルコール、およびアセトアルデヒド濃度を示すレーダーグラフである。窒素スパージ液体のプロファイルは、プロパノールレベルが高いこと以外は対照ビールのプロファイルに密接に従う。CO₂スパージ発酵物は、エステルレベルおよびフーゼルアルコールレベルが非常に低く、対照と適合しなかった。両方の連続発酵液体では、ダイアセチルおよびアセトアルデヒドレベルは、ラバット規定未満であった。

【0259】

この所見により、窒素スパージによりエステル生成が市販のビールと類似のレベルに増加し、二酸化炭素スパージにより比較的低い濃度の液体が製造されることが示唆さ

れた。これらの結果により、 CO_2 スパージ環境下での酵母代謝の変化が示唆される。スパージングガスとは無関係に、プロパノールレベルは、工業的に発酵させた対照ビールで測定したレベルよりも連続発酵ビールで非常に高かった。プロパノール濃度は 100 mg/L の味の閾値よりも十分に低いにもかかわらず、顕著な相違は、バッチ発酵と比較して連続発酵での代謝のわずかな変化の指標であり得る。より高いプロパノールレベルは、オキソ酸分解経路を介してプロパノールが生成するアミノ酸トレオニンの連続供給に起因する可能性もある。

【0260】

【表86】

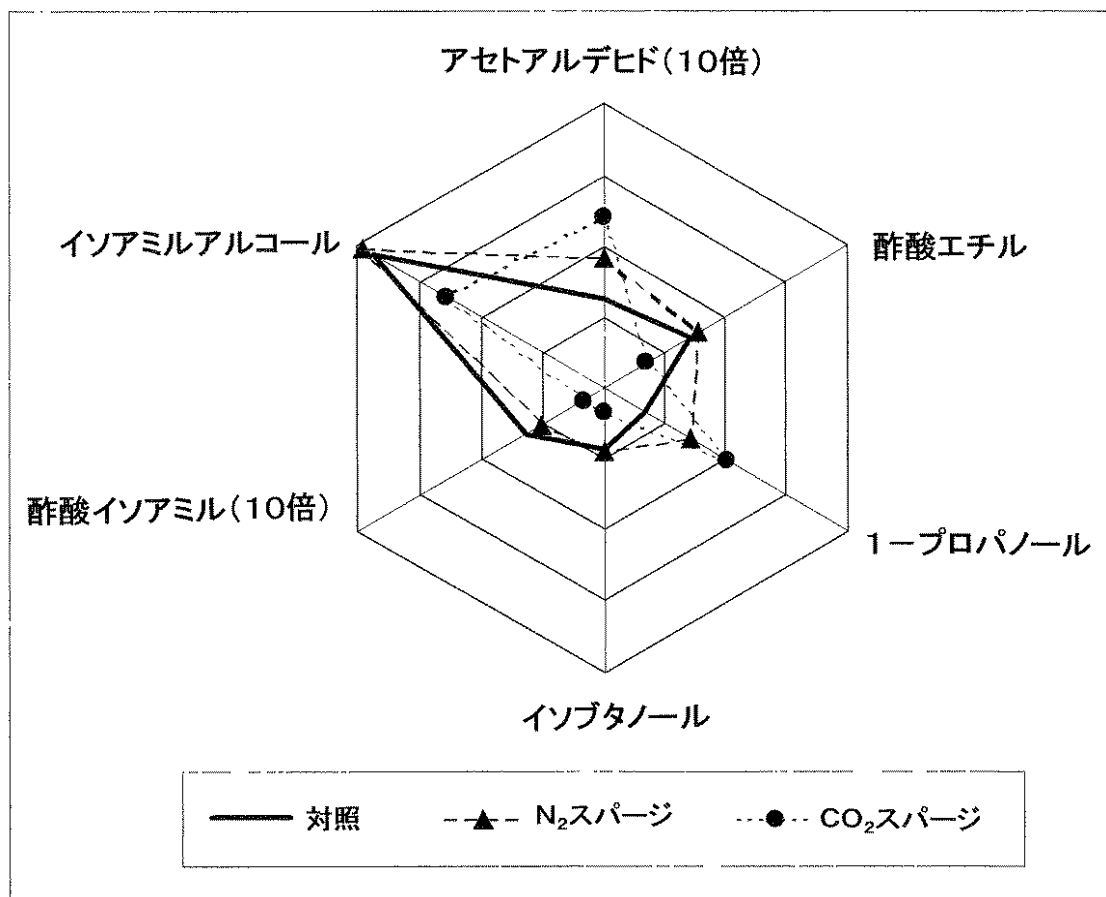


図6. 83 窒素スパージおよび CO_2 スパージした連続ガスリフト発酵液体のエステルおよびフーゼルアルコールと工業的に製造した液体とを比較したレーダーグラフ。

【0261】

第7章 結論

この主張を通して行った研究から以下の結論を導くことができる。主な風味の欠点を持たない許容可能なビールを、連続主発酵機としての 50 L のパイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクターを使用し、ダイアセチル制御のために2日間のバッチ保持して製造することができる。最短の滞留時間(24時間)または1日あたりの回転が1リアクター体積であることにより、比重の高い麦汁(17.5°P)の最終発酵ブロス(2.5°P)への発酵が可能である。超フロック形成酵母LCC290、中間フロック形成酵母LCC3021、および□-カラギーナン固定化酵母の使用は全てガスリフト系内の実行可能なキャリアである。Siran(登録商標)ガラスビーズおよびCelite(登録商標)珪藻土ビーズなどの予備形成キャリアの挙動の使用は、ガスリフトドラフト管系内での実用的な代替物ではない。□-カラギーナゲルビーズの場合は最低2ヶ月の連続操作ならびにLCC290およびLCC3021発酵の場合は最低3ヶ月の連続操作は、いかなる任意の微生物汚染物を含まないリアクターのパフォーマンスを不安定にする

ことなく達成可能である。さらに、連続系では、長期運転期間中の工業的麦汁供給における潜在性および想定上の変化を操作することができる。□

【0262】

スパージングガスとして窒素を使用した超フロック形成酵母 LCC290 を使用した連続発酵およびその後の 2 日間バッチ保持により、工業的対照ビールに最も密接に適合した風味が得られた。連続主発酵槽の排出液中の高濃度のダイアセチルを取り扱うように考案された 2 日間のバッチ保持は、有効な（しかし、最適ではない）制御機構であった。3 つの試験した連続発酵系のダイアセチル還元能力は事前に推測されたように非常に類似しており、この性質は株型に起因すると考誤差れる。バッチ保持期間は、保持段階におけるビールのエステルおよびフーゼルアルコール濃度に影響を与えなかった。

10

【0263】

3 % 酸素を含むスパージングガスの使用により、麦汁中の酸素栄養レベルが適切になり、発酵を通して酵母集団の生存が維持される（90 % を越える）一方で許容可能な風味プロファイルを有するビールが製造された。固定化マトリックスとして LCC290 酵母および LCC3021 酵母を使用した連続発酵により、□ーカラギーナンゲルベースの系よりも迅速に偽安定状態に達した。おそらく固定化酵母集団の増加に起因する□ーカラギーナン固定化発酵の不安定性により、製品の発酵は標的レベル未満であった。理想的な連続製造のために、セットアップの延長は反応および突発的故障後の再開に必要な時間が増加するので、この現象は極めて望ましくない。魅力的なビールにするためには、より長いセットアップ期間がより長い連続運転期間を必要とする。

20

【0264】

連続的なゲルビーズ製造プロセスにより、パイロットスケールユニット内部の試験のための必要量のビーズが製造された。しかし、サイズ分布がより小さなビーズが製造されるようにビーズ製造プロセスをさらに最適化する必要がある。このプロセスはまた、工業規模でのその適合性を決定するためにさらに調査する必要がある。この研究で調査したケニックス（Kenics）型よりも、静止型混合機の数よりもむしろ直径の増加によってスケールアップを行うことができる新規の型の静止型混合機を見出してこのオプションが実行可能かを試験しなければならない。

【0265】

この主張で使用した酸パルストレーサー技術により、LCC290 超フロック形成酵母、LCC3021 中間フロック形成酵母、および□ーカラギーナン固定化酵母を含む実際の発酵時の 50 L パイロットスケールのバイオリアクター内での混合時間および循環速度を評価することが可能である。混合データを崩壊シヌソイド関数に導入し、混合時間および循環速度を計算した。

30

【0266】

3 つ全ての固定化キャリア型について 200 秒未満と計算された混合時間を使用してガスリフトドラフト管内で急速に混合する。3 つ全ての試験シナリオにおいて見かけ上のガス速度が増加するにつれて、混合時間がわずかに減少した。試験したすべての見かけ上のガス速度（2 mm/秒から 6 mm/秒）で、LCC290 系は最も速い混合時間（100 秒間と 120 秒間との間）を示した。液体循環時間は、見かけ上のガス速度と無関係に 3 つ全てのキャリア型で非常に類似していた。液体循環時間はまた、対応するガス速度の増加とともに直線的に減少した。試験した全ての固定化キャリアについて、3 ～ 6 回のリアクター循環サイクル内で液体が完全に混合された（パルスに 98 % 応答）。これらの結果により、試験した連続発酵用の 50 L のパイロットスケール系は適切に混合されることが確認された。混合時間が不十分であると、ビール発酵に望ましくない死角となる可能性がある。

40

【0267】

この Ph. D 研究により、ラバット実験醸造所でデザイン、構築、および操作された製造系のさらなるスケールアップの実現可能性を明確に証明した。LCC290 超フロック形成酵母およびスパージングガスとして窒素を使用したガスリフトドラフト管の使用および

50

その後の21℃での2日間のバッチ保持が、系の選択肢として推奨される。

【0268】

詳細な説明—パート2

第4章 材料と方法

4.1 酵母の株および特徴

*Saccharomyces cerevisiae*のラガー醸造用株（ラバットカルチャーコレクション（LCC）3021）を、本研究を通して使用した。*Saccharomyces cerevisiae*は、*Saccharomyces uvarum*の*Beijerinck*変異株*carlsbergensis* *Kudryavtsev*、1960（*Kurtzman*, 1998）と同義である。37℃ではLCC3021は増殖しない。これは、37℃以上の温度で増殖するほとんどのエール酵母とLCC3021ラガー酵母との区別の手助けとなる。LCC3021は、ほとんどのラガー酵母と同様に下面発酵株であるが、例外も存在する。同様に、この株は、グルコース、ガラクトース、スクロース、マルトース、ラフィノース、およびメリビオースを発酵するが、デンプンは発酵しない。メリビオースを発酵する能力は、この酵母をエール酵母と区別するための分類要因として使用される1つのツールである。

【0269】

ほとんどの醸造株と同様に、LCC3021は倍数体であり、有糸分裂によって繁殖する。通常の醸造条件下で、ラガー酵母は減数分裂によって繁殖しない。これは、遺伝物質が交差する可能性が低いので遺伝的に安定な醸造株の作製に有利である（*Kreger-van Rij*, 1984）。

【0270】

4.2 酵母摂取物の調製

-80℃のフリーザーで細胞発生的に保存したバイアルから酵母を取り出し、十分に分離されたコロニーを得るために、ペプトン酵母抽出物栄養（PYN）寒天（ペプトン、3.5 g/L；酵母抽出物、3.0 g/L； KH_2PO_4 、2.0 g/L； $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g/L； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.0 g/L；グルコース、20.0 g/L；寒天、20.0 g/Lを含む dH_2O ）増殖培地に画線培養した。増殖酵母の3～4日後のプレートからいくつかのコロニーからなる滅菌ループを取り出し、これらのコロニーを体積10 mLの麦汁を含む試験管に接種した。これを21℃で一晩増殖させ（したがって、用語「一晩培養物」）、より大量（通常、200 mL）の麦汁に添加して酵母バイオマスを増加させた。翌日、所望の酵母バイオマス量に増殖するまでこの混合物を同様に別の大量の麦汁に添加した。一般に、1リットルの麦汁あたり約20 gのラガー酵母が産生されると予想される。酵母接種物を調製するために、培養物を 1.0×10^4 rpm（半径=0.06 m）、4℃で10分間遠心分離した。遠心分離後、液体をデキャントし、投入用にペレットから適切な湿重量の酵母を得た。

【0271】

4.3 麦汁発酵培地

カナダのラバット醸造所から、比重17.5°Pの醸造用麦汁が供給された。本研究の発酵で使用した醸造用麦汁中の発酵用炭水化物の濃度、比重、および遊離アミノ窒素を、付録A2.1に示す。麦汁組成についてのさらなる詳細は、*Dale*ら、1986；*Hokstra*、1975；*Hough*ら、1982；*Klopper*、1974；および*Taylor*、1989に記載されている。

【0272】

バッチ発酵：麦汁を、オートクレーブにて100℃で45分間加熱後、冷却し、固定化細胞ビーズまたは自由に懸濁する酵母を接種した。

【0273】

連続発酵：連続発酵に使用する麦汁を瞬間殺菌し（*Fisher*プレート熱交換器、コンビフロー型*Eurocal* 5FH）、その後にガスリフト式バイオリアクターに供給し、この麦汁を、第4.6節に記載のように細菌汚染について定期的にモニターした。麦汁

中に汚染物が検出された場合、これを直ちに破棄し、新規の麦汁をプラントから回収した。

【0274】

瞬間殺菌装置を容量流速 $0.8 \text{ m}^3/\text{時間}$ で操作した。ユニットは、麦汁が平均温度 85°C （最低温度 80°C ）に保持された管状保持部分を有していた。保持部分の体積は $1.13 \times 10^{-2} \text{ m}^3$ であり、保持部分の滞留時間は 51 秒であった。加熱工程後、麦汁をユニットへの排出時に 2°C に急速冷却した。

【0275】

4.4 固定化法

κ -カラギーナンゲル X-0909 は、Copenhagen Pectin A/S から好意的に譲り受けた。包括ラガー酵母細胞を含む κ -カラギーナンゲルビーズを、Neufeldら（1996）に詳述されているように、最初の細胞ローディングが各実験で特定した $10^7 \sim 10^8$ 個/mL のゲルでの静止型混合機プロセスを使用して製造した。図 15 に示すように、静止型混合機プロセスは、直列ポリアセタール静止型混合機（Cole-Parmer Instrument Co.、USA）を使用した酵母接種した非水性連続相と、植物油（Mazola Corn Oil）と、水性分散相と、 κ -カラギーナン（ $3\% \text{ w/v}$ ）を含む KCl（ $0.2\% \text{ w/v}$ ）溶液との間の乳濁液の形成に基づく。酵母がカラギーナン溶液と迅速に混合されて乳濁液が形成される概略図中の加熱部分の温度は 37°C であった。氷浴での急速冷却およびその後の塩化カリウム浴（ 22 g/L ）中での硬化を使用して、乳濁液中での κ -カラギーナン液滴のゲル化を誘導した。24 のエレメントからなる直径 6.4 mm の静止型混合機を使用して、酵母とカラギーナンの混合物を作製した。第 2 の 42 のエレメントからなる直径 12.7 mm の混合機を使用して乳濁液を作製した。本研究での実験に使用したビーズは、 $0.5 \text{ mm} < (\text{ビーズ直径}) < 2.0 \text{ mm}$ であった。

【0276】

4.5 固定化酵母細胞を含む κ -カラギーナンゲルビーズの累積粒子サイズ分布

κ -カラギーナンゲルビーズをゲルビーズの 30 L 製造物から無作為にサンプリングし、湿重量に基づいて粒子サイズ分布を計算した。各サンプルは、約 500 g の湿重量であった。ふるいを使用して、ビーズの粒子サイズ分布を決定した。ビーズを、一連のグリッドサイズ（ 2.0 、 1.7 、 1.4 、 1.18 、 1.0 、および 0.5 mm ）のふるいに通した。4.5 L の 22 g/L KCl 溶液を使用して、各ビーズサンプルのふるいを促進した。 κ -カラギーナンゲルビーズを、ふるい直径が粒子直径となるように完全に球形であると仮定した。粒子密度は均一であり、且つ粒子サイズと無関係であるとも仮定した。

【0277】

4.6 酵母細胞の計数および生存率

自由に懸濁した酵母の生存率および細胞濃度：米国醸造化学者学会のメチレンブルー染色技術（ASBC の技術委員会および編集委員会、1992）を使用して、酵母細胞の生存率を測定した。酵母集団が生きているか生きていないかどうかの染色の基準は、生きている細胞のその無色形態への色素の酸化能力に基づいた。非生存細胞は、色素の酸化能力を欠くので、青色に染色される。Fink-Kuhles 緩衝化メチレンブルーを、 500 mL の溶液 A（ 0.1 g メチレンブルー / 500 mL d H_2O ）と 500 mL の溶液 B（ 1.25 mL の 2.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ / 100 mL d H_2O と混合した 498.65 mL の 13.6 g の KH_2PO_4 / 500 mL d H_2O ）との混合によって調製して、 $\text{pH } 4.6$ の最終緩衝化メチレンブルー溶液を得た。

【0278】

希釈酵母溶液を、試験管中でのメチレンブルー溶液との混合によって約 100 個の顕微鏡視野の酵母細胞の懸濁液を得た。十分に混合した懸濁液の小滴を、顕微鏡用スライドにのせ、カバーガラスで覆った。染色液との接触から $1 \sim 5$ 分後、青色に染色された細胞および無色のままの細胞を計数した。生存可能な細胞の割合を、計数した全細胞数の百分率として報告した。細胞濃度を、光学顕微鏡および血球計（Hauser Scientific 50

ic Company) を使用して決定した。

【0279】

固定化細胞の生存率および細胞濃度：滅菌ふるい（メッシュ孔径500 μ m）での混合物の通過および10mLの蒸留水で濯ぐことによってゲルビーズを発酵液から分離した。包括酵母を含む1mLのゲルビーズを、19mLの蒸留水を含む50mLの滅菌試料容器に添加した。次いで、ビーズをPolytron（登録商標）（Brinkmann Instruments）装置を使用して破壊して、ゲルから細胞を放出させた。次いで、細胞の生存率および濃度を、自由に懸濁している細胞について記載のように測定した。

【0280】

4. 7 微生物学的分析

液相分析：サンプルを、微生物学的分析のために少なくとも1週間に1回連続発酵物から採取した。連続発酵に使用した麦汁も、バイオリアクターへの移行の前に汚染について試験した。好気性菌および嫌気性菌の両方の存在を試験するために、サンプルを、10mg/Lのシクロヘキシミドを添加したユニバーサルビール寒天（UBA、Difco Laboratories）にプレートし、28℃で10日間インキュベートした。嫌気性菌汚染について試験したプレートを、ジャー中に残存する任意の酸素を取り込んで嫌気性環境を作製するAnaeroGen（登録商標）（Oxoid）パッケージを具備する嫌気性ジャーに入れた。酸素の存在下で桃色に呈色する嫌気性指示薬（Oxoid）を使用して、ジャー内の嫌気性条件を評価した。野生型酵母の汚染を、25℃で7日間インキュベートした酵母培地（YM寒天、Difco Laboratories）+CuSO₄（0.4g/L）へのサンプルのプレーティングによって試験した。先に記載のペプトン酵母抽出物栄養培地（PYN）を使用して、37℃で7日間の非ラガー酵母汚染物についてサンプルをスクリーニングした。37℃でPYNでの酵母増殖が認められないことは、37℃で増殖するエール酵母または汚染物が存在しないことを示した。

【0281】

ゲル相分析：本発明者らの研究所で、発酵について使用されるべき固定化細胞ビーズがバイオリアクターに投入される前に確実に汚染細菌を含まないようなアッセイを開発した。Pediococcus属およびLactobacillus属または野生型酵母などのビール腐敗細菌の汚染を回避することを主に検討した。3mLのカラギーナンゲルビーズを、100mLの下記のいくつかの異なる選択液体培地に接種し、25℃の250mLフラスコに置き、インキュベーター振盪機にて100rpmで振盪した。NBBブロス（Nachweis von Bierschadlichen Bakterien）（BBLカタログ番号98139、NBBブロスベース、0.02g/Lシクロヘキシミド）は、Pediococcus属およびLactobacillus属などのビール腐敗細菌を試験するために使用される半選択培地である。硫酸銅ブロス（16g/L YMブロス、Difco；0.4g/L CuSO₄）は、野生型酵母汚染物を試験するための半選択培地である。最後に、標準的方法（STA）+シクロヘキシミドブロス（16g/L「標準的方法」ブロス、Difco；0.02g/Lシクロヘキシミド）を使用して、水、廃液、乳製品、および食品中で見出される細菌を試験する（Power and McCuen、1988）。3日以内に潜在的なビール腐敗微生物を検出および同定するために選択培地を選択した。汚染サンプルを、サンプル内の濁度によって示し、汚染物を仮に同定した。

【0282】

呼吸欠損（RD）酵母細胞検出法：塩化トリフェニルテトラゾリウム（TTC）被覆技術：本方法を使用して、残りの集団から呼吸欠損酵母を区別し、この方法は、TTCが無色の塩であり、還元時に赤色沈殿を形成するという原理に基づく。TTCを酵母-ペプトン-デキストロース（YPD）寒天（酵母抽出物、10g/L；ペプトン、20g/L；デキストロース、20g/L；寒天20g/Lを含むdH₂O）で増殖させた酵母コロニーに被覆した場合、十分に呼吸する酵母はTTCを還元し、これらのコロニーは暗桃色から赤色に呈色する。しかし、呼吸欠損酵母は、色素を還元せず、元の色のままである。

10

20

30

40

50

【0283】

培養物を、プレーティング用に適切な微生物濃度（約100細胞まで／0.2mL）に連続希釈した。次いで、YPDプレートで、酵母コロニーが好気性条件下で生存可能になるまで、21℃で約3日間インキュベートした。次いで、各プレートに50℃のTTC被覆寒天20mLを被覆した。50℃への各溶液の冷却後、溶液A（121℃で15分間オートクレーブした12.6g/L NaH_2PO_4 ；11.6g/L Na_2HPO_4 ；30.0g/L 寒天を含むdH₂O）と溶液B（121℃で15分間オートクレーブした2.0g/Lの2, 3, 5-塩化トリフェニルテトラゾリウムを含むdH₂O）との1：1混合によってTTC被覆寒天を作製した。周囲温度で3時間のインキュベーション後、プレートを読み取った。RD%を、観察した総数に対する非染色コロニーの百分率として示した 10

【0284】

4. 8 κ-カラギーナンゲルビーズ中に固定された酵母の走査電子顕微鏡法（SEM）固定化酵母を含むκ-カラギーナンゲルビーズを、サンプルポートによりバイオリアクターから取り出し、少量の発酵ブロス中に浸漬させたビーズと共に10mLのねじ蓋付きガラスバイアルに入れた。直ちにバイアルを氷で覆い、断熱コンテナからSEM設備に移した。固定化酵母を含むκ-カラギーナンゲルビーズを、2%（v/v）グルタルアルデヒドを含むSorensenリン酸緩衝液（0.07M、pH6.8（Hayat、1972））中で固定した。これを、1%（w/v）四酸化オスミウムを含む同一の緩衝液で後固定し、一連のアルコール溶液（50、70、80、90、95、100% v/v）で段階的にそれぞれ15分間脱水し、その後3回100%と交換する。二酸化炭素による臨界点乾燥（Ladd Research Industries、Burlington、VT）の前に、いくつかのビーズを液体窒素中で凍結させ、粉碎し、100%アルコール中に回収した。変形を最小に抑えて曝露すべきビーズの内部表面を凍結破断する。臨界点乾燥後、サンプルに30nmの金／白金をスパッタ被覆し（Polaron SC500スパッタ被覆機、Fison Instruments、England）、Hitachi S-4500電界放射走査電子顕微鏡（Nissei Sangyo、Tokyo、Japan）でスキニングした。 20

【0285】

4. 9 バイオリアクターサンプリングプロトコール 30
バイオリアクターのサンプルポート（Scandi-Brew T型メンブレンサンプル弁）のリザーバを、70%（v/v）のエタノール溶液で満たしてサンプリングの間の開口部周囲を無菌に保った。サンプルを採取するために、エタノールリザーバのベースからプラグを取り外し、排出し、エタノールで完全に濯ぎ、その後ポートを空けた。サンプルをクリンプバイアルまたはねじ蓋付きジャーに回収し、体積は必要とする分析によって5～60mLとした。細菌汚染を試験するために、10mLの発酵液を滅菌膜濾過ユニットに吸引濾過した。第4.6節に記載のように、孔径0.45μmの膜を適切な選択培地上に置いた。

【0286】

化学分析のために、60mLのサンプルを100mLのクリンプ密封したバイアルから隔壁を介して採取し、孔径5μmおよび0.45μmのSchleicher and Schull（FP-050）二重膜シリンジフィルターシステムによってシリンジ濾過した。必要量のサンプルを、20mLのヘッドスペースバイアルに分注し、テフロン隔壁およびアルミキャップで圧着した。必要なサンプル体積を、表4.1に列挙する。 40

【0287】

【表87】

表 4. 1 種々の化学分析に必要なサンプル体積

サンプル	体 積 (m L)
エタノール	5
短鎖ジオール	1 0
ビール揮発性成分	1 2
ピシナルジケトン	5
炭化水素／比重	1 2
有利アミノ窒素／蛋白	1 2

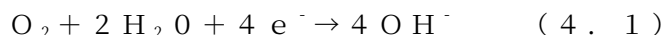
【0288】

10

4. 10 溶存酸素の測定

Thiedig 博士の Digox 5 溶存酸素分析器は、0.001～19.99 mg/L の麦汁、発酵麦汁、およびビールの範囲で溶存酸素を測定する (Anon, 1998)。Vilacha and Uhlig (1985) は、ビール中の溶存酸素測定について多数の装置を試験し、Digox 分析器が信頼できる正確な値が得られることを見出した。Digox 5 によって使用される電気化学的測定法は、電位差計を備えた電流測定用の 3 つの電極の配置に基づく。細胞の測定は、電極 (陰極) および対極 (陽極) の測定からなる。これらの電極を酸素濃度を測定すべき液体に曝露する。所定の測定電位の固定後に測定電極で反応が起こる。大型の銀の測定電極では、酸素原子は水酸基イオンに還元される。式 4. 1 で 2 つの水分子が 1 つの酸素分子と反応し、4 つの電子を吸収し、4 つの水酸基イオンが得られる。

20



【0289】

電流を確保するためにステンレススチール製の陽極は陰極から放出された 4 つの電子を吸収する。式 4. 2 では、測定電流 I は酸素濃度 ($C_{L,0}$) に正比例する。

$$C_{L,0} : I = K \times C_{L,0} \quad (4. 2)$$

(式中、定数 K は、ファラデー定数、分子あたりの電子交換数、陰極の表面積、および測定電極表面での境界層の幅に影響を受ける)。一定で特徴的な測定電位は、選択性 (酸素) および測定の精度にきわめて重要である。電圧の測定を、電流に左右されない基準電極によって安定化する。電子をフィードバックするポテンショスタットと共に、これにより一定の測定電位が得られる。測定電極表面を、ダイアフラムを介して基準電極に電解で接続する。

30

【0290】

最終溶存酸素濃度の測定範囲に基づく誤差は、±3% であった (Anon, 1998)。溶存酸素分析器を、Thiedig Active Calibration を使用して校正し、Digox 5 はファラデーの法則に基づいて規定の酸素量を生成し (0.500 mg/L)、これをマトリックス中で測定値と照合した。これにより、1 分以内に測定値に対応する圧力、温度、および流れの条件下で装置が校正された。センサー内の分子交換は拡散プロセスであるので、分子交換は温度に影響を受け、より速く反応し、測定される電流が増大する。したがって、Digox 5 はまた、温度を測定し、変動を自動的に補正するセンサーも具備している。

40

【0291】

Digox 5 は、膜ベースの酸素センサーを超えるいくつかの利点を有する。Digox は電解液を使用しないので、感度の損失が比較的遅く、測定電極上にほんの少しの沈殿物が生じるだけである。また、能動的校正によって感度をいつでも決定することができる。これは、電極を洗浄し、装置を再校正するための簡単な手順である。ほとんどの膜センサーでは、陰極上に塩化銀が析出し、電解液が変化して、段階的に読み取り値が小さくなる。この理由のために、膜および電解液は、2～3 週間ごとに交換して再校正することが推奨され、これは長期にわたる厄介な作業である。膜ベースのセンサーの校正は、実験室では通常酸素飽和レベルで行われるが、特に超低酸素レベルの麦汁およびビール基質で相当

50

な誤差を生じ得る。温度は、膜ベースの酸素センサーに3倍の影響を与える：膜透過性が変化し、酸素分圧が変化し、電解液中の酸素の溶解度が変化する。膜ベースのセンサーにおけるこれら3つの要因のための温度補正は困難である。

【0292】

保存時の麦汁中の溶存酸素測定：フレキシブルTygon（登録商標）食品用チューブ（内径1/4インチ）を、麦汁保存タンクT-1およびT-2の円錐状ベースの上部付近に存在するサンプルポートに無菌的に接続した（第4.2.1節を参照のこと）。変速ペリスタリックポンプにより、溶存酸素分析器ブロックを通る体積流速を11L/時間にした（Masterflex（登録商標）L/S（商標）Digital Standard Drive、Cole-Palmerカタログ番号P-075233-50）。4～5 10
分後に麦汁溶存酸素測定値を記録した。

【0293】

バイオリアクター中の溶存酸素測定：バイオリアクターにおける溶存酸素測定の実施前に、Diox5分析器ブロックを浄化した。センサー注入口を滅菌Tygon（登録商標）食品用配管（内径1/4インチ）に接続した。70%（v/v）エタノール溶液を、約10L/時間の体積流速で15分間分析器にポンピングした。溶存酸素分析器を実験室の給水栓に接続し、最低2時間熱水（70℃）をセンサーに通した。分析器ブロックの材料は70℃を超える温度に耐誤差れないので、流れの滅菌よりもむしろこの方法を使用した。2時間の浄化後、分析器内の滅菌を維持するためにユニットの注入口および排出口への配管を圧着した。層流フードでは、新たに滅菌した配管を分析器の注入口および排出口に 20
接続した。配管の自由端を、バイオリアクターのヘッドプレート上の内径1/4のステンレススチール製ポートに無菌的に圧着させ、測定した。バイオリアクター上のポートを使用しない場合、ポートを短い滅菌Tygon（登録商標）食品用配管を使用して密封した。バイオリアクターのヘッドプレート上に位置付けたポートを介した発酵物からの液体の採取によってガスリフトバイオリアクター中の溶存酸素をオンラインで測定した。バイオリアクターのヘッドプレートを貫通した1/4インチのステンレススチール製パイプに接続したステンレススチール製フィルター（第4.1.2節を参照のこと）によって発酵液をバイオリアクターから排出させた。次いで、溶存酸素分析器ブロックを通過する体積流速を11L/時にする変速ペリスタリックポンプ（Masterflex（登録商標）L/S（商標）Digital Standard Drive、Cole-Palmer 30
カタログ番号P-075233-50）に接続したフレキシブルTygon（登録商標）食品用チューブ（内径1/4インチ）を介して液体を流した。次いで、バイオリアクターのヘッドプレートを貫通する第2の1/4インチのステンレススチール製のポートを介して発酵液を再利用した。Tygon（登録商標）食品用配管（Cole-Palmer、1999）は供給者が低酸素透過性を $30\text{ cm}^3\text{ mm}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cmHg}) \times 10^{-1}$ と規定しているので、これを使用してセンサーをバイオリアクターに接続した。4～5分の循環後、測定を行った。

【0294】

4.11 化学分析

適切な標準試薬を使用して較正を行った。分析に使用した試薬は全て純度99%以上であった。必要に応じて、蒸留精製をその後に行った。 40

【0295】

4.11.1 エタノール

米国醸造化学者学会の技術委員会および編集委員会の内部標準ガスクロマトグラフ（GC）法（1992）を使用して、エタノール濃度を検出した。脱気サンプルを、イソプロパノール内部標準（5%（v/v））を使用して直接処理し、水素炎イオン化検出器（FID）およびDynatechオートサンプラーを具備したPerkin Elmer 8500ガスクロマトグラフに注入した。キャリアガスとしてヘリウムを使用したChromosorb 102（80～100メッシュカラム）を使用した。クロマトグラフ条件：流速20mL/分、インジェクター温度175℃、検出器温度250℃、およびカラム温度 50

185℃。

【0296】

4. 11. 2 炭水化物のまとめ

発酵サンプル中のグルコース、フルクトース、マルトース、DP3（マルトトリオース）、DP4（マルトテトラオース）、ポリ-1（多糖ピーク1）、およびグリセロールの濃度を、陽イオン交換カラム（Bio-Rad Aminex、HPX-87K）および屈折率検出器（Spectra-Physics、SP6040XR）を具備したSpectra-Physics（SP8100XR）高速液体クロマトグラフ（HPLC）を使用して定量した。移動相はリン酸カリウム（二塩基、0.01M）であり、この系にはSpectra-Physics（SP8110）オートサンプラーが備えられている。装置を800psiの背圧で操作した。カラムを通過するサンプルおよび溶離液の流速は0.6mL/分であり、カラム温度は85℃であり、検出器温度は40℃であった。注入体積は10μLであった。

【0297】

4. 11. 3 比重

本研究では、麦汁および発酵培地の比重を、醸造業で使用されている許容単位である真性エキス（プラトー値、⁰P）の用語で記載する。

【0298】

第4. 8節に記載のように発酵サンプルを濾過し、ボルテックスした後、デジタル表示の密度計（Anton Paar DMA-58濃度計）を使用した分析によって麦汁の比重（プラトー値）を測定した。発酵サンプルをガラス製のU管に入れ、電氣的に振動させて比重を同定し、直接プラトー値を得た。

【0299】

プラトー値は、目的の麦汁と比重が同一の20℃での水中のスクロース溶液の百分率の数値（w/v）をいう。プラトー値および溶質濃度に対する溶液の比重に関する表はスクロース水溶液に基づき、これは抽出物量の近似のみを示す。抽出物は、「現状のまま」および/または処理し得る（Hardwick、1995）醸造材料（炭水化物、蛋白、タンニンなど）中の全ての利用可能な可溶性部分に関する用語である。異なる原料の麦汁の組成物における変動性に関するより適切な基準を欠くので、現在、醸造業では抽出物を依然としてプラトー値での比重として示す。

【0300】

4. 11. 4 総ダイアセチル

ビールおよび発酵サンプル中の総ダイアセチル（2, 3-ブタンジオン）を、米国醸造化学者学会の技術委員会および編集委員会の方法（1992）に基づいたヘッドスペース被分析物サンプリング技術、キャピラリーGC分離（Hewlett-Packard 5890）、および電子捕獲検出（ECD）を使用して測定した。この方法は、ダイアセチルおよびその前駆体（α-アセトラクテート）の量を測定するので、「総ダイアセチル」という。キャリアガスは、1.0mL/分のアルゴン中に5%のメタンを含み、J&W DB-Waxカラムを使用した。分割比は2:1であり、補助ガスは60mL/分のヘリウムであった。注入温度は105℃であり、検出器温度は120℃であった。

【0301】

系は、Hewlett-Packard 7694Eヘッドスペースオートサンプラーを備え、内部標準として2, 3-ヘキサジオンを使用した。サンプルサイクル時間は40分であり、バイアル平衡時間は65℃で30分間であり、加圧時間は4.8psigで2分であり、ループ充填時間は0.2分であり、ループ平衡時間は0.1分であり、注入時間は0.27分であった。キャリア圧は18.8psigであり、移動ライン温度は95℃であり、ループ温度は65℃であった。

【0302】

4. 11. 5 ビール揮発性成分

アセトアルデヒド、酢酸エチル、イソブタノール、1-プロパノール、酢酸イソアミル、

イソアミルアルコール、ヘキサン酸エチル、およびオクタン酸エチルを含むビール揮発性成分を、内部標準（*n*-ブタノール）GC（Hewlett Packard 5890）ヘッドスペース法および水素炎イオン化検出器（FID）を使用して測定した。キャリアガスは6.0 mL/分のヘリウムであり、GCはHewlett Packard 7694ヘッドスペースオートサンプラーを備えていた。

【0303】

GCインジェクターの温度は200℃であり、検出器の温度は220℃であった。オーブン温度プロファイル：40℃（5分）、40～200℃（10℃/分）、200～220℃（50℃/分）、220℃（5分）。FIDガスは、6.0 mL/分のキャリアを含み、ヘリウムの構成は30 mL/分および28 psigであり、H₂の構成は50 mL/分および25 psigであり、空気の構成は300 mL/分および35 psigであった。

【0304】

隔壁を流速0.8 mL/分でパージした。上部圧力は、4.0 psigであった。オートサンプラーはニードルを介して注入ポートに接続されており、バイアル圧は15.9 psigであり、キャリア圧は7.1 psigであり、カラム上部圧力は4 psigであり、分流は18 mL/分であり、カラム流は6 mL/分であった。ゾーン温度：バイアルは70℃、ループは80℃、移動ラインは150℃。

【0305】

GCサイクル時間は40分であり、バイアル平衡時間は35分であり、加圧時間は0.25分であり、ループ充填時間は0.1分であり、ループ平衡時間は0.1分であり、注入時間は3分であり、サンプルループ体積は1 mLであった。

【0306】

4.11.6 遊離アミノ窒素（FAN）

米国醸造化学者学会の技術委員会および編集委員会の遊離アミノ窒素の国際法（1992）を使用し、Perkin Elmer LS50B分光光度計を使用して発酵サンプル中の遊離アミノ窒素を同定した。この分光学的方法は、ニンヒドリンとサンプル中に存在する窒素との呈色反応を示す。吸光度は、遊離アミノ窒素存在量と直接関連する。

a) 呈色試薬：19.83 gのリン酸一水素ナトリウム（Na₂HPO₄）

30.00 gのリン酸二水素カリウム（KH₂PO₄）

2.78 gのニンヒドリン一水和物

1.50 gのフルクトース

b) 希釈試薬：2.00 gのヨウ素酸カリウム（KIO₃）

596 mLの脱イオン蒸留水

404 mLの95%（v/v）エタノール

（冷蔵室で保存し、室温で使用する）

c) グリシンストック溶液：0.1072 g / 100 mLの脱イオン蒸留水

d) グリシン標準溶液：ストック溶液を脱イオン蒸留水で100倍希釈した（v/v）。この標準は、2 mg / LのFANを含む。

【0307】

サンプルを蒸留水で100倍に希釈し、2 mLの希釈サンプルを3つの試験管にそれぞれ入れた。3つの各試験管への2 mLの脱イオン蒸留水の導入によってブランクを調製した。それぞれ2 mLのグリシン標準溶液を含む3つの試験管もまた調製した。全てのサンプルについて、1 mLの呈色試薬を添加し、これらを100℃の水浴中に正確に16分間置いた。次いで、試験管を、20℃の水浴中で20分間冷却した。5 mLの希釈試薬を各試験管に添加し、完全に混合した。次いで、サンプルを、10～15分間静置した。570 nmでの吸光度を、分光光度計を使用して測定し、サンプル中のFANの量を式4.3を

使用して計算した。

$$FAN(mg/L) = (A_p - A_b - A_f) \cdot 2d / A_s \quad (4.3)$$

式中、FANは、 mg/L で示したサンプル中の遊離アミノ窒素の量であり、 A_p は、試験溶液の平均吸光度であり、 A_b はブランクの平均吸光度であり、 A_f は暗色の麦汁およびビールの較正のための平均吸光度であり、2はグリシン標準溶液中のFANの量であり、 d はサンプルの希釈因子であり、 A_s はグリシン標準溶液の平均吸光度である。

【0308】

第5章 ガスリフトバイオリアクター系を使用した連続発酵

公表された優れた物質移動（液体－固体）および混合特性のために、連続ビール発酵のためにガスリフトドラフト管バイオリアクター系を選択した。包括酵母の基質が得られる液相から固体固定化細胞生体触媒への栄養の移動に関与するので、液体－固体物質移動は特に重要である。これらのバイオリアクターはまた、通気が良好であり、電力消費量が少なく、構築が簡単である。これにより、大規模操作（廃水処理で経済的に使用されるものなど）に非常に魅力的なガスリフトバイオリアクター系が得られている（Driesenら、1997；Heijnen、1993）。 10

【0309】

5.1 ガスリフトドラフト管バイオリアクターの説明

この節では、本研究で使用したガスリフトバイオリアクターを詳述する。

【0310】

5.1.1 バイオリアクター本体 20

図16に記載のように、本研究のためにデザインした13L（有効体積8L）のガスリフトドラフト管バイオリアクターは、二酸化炭素ガス駆動内部液体循環（Heijnen、1996）によって固定化細胞が懸濁液中に保持される3相流動床（液体／固体／気体）であった。バイオリアクター容器の写真を図17に示し、詳細な寸法を含む詳細図を図18に示す。長さ0.11mで外径0.013mの焼結ステンレススチール製スパージャー（CO₂パージングノズル、部品番号9222、Hagedorn & Gannon、USA）によってバイオリアクターのボトムコーンに二酸化炭素および空気を流す。流動化ガスとして二酸化炭素を使用し、空気を使用して酵母細胞に酸素を供給した。

【0311】

円柱状のバイオリアクターの内部に同心円状に位置付けたドラフト管は、流動床系中でライザーとして機能する一方で、外部の環は降水管として使用した。内部ドラフト管は、円筒形粒子分離機から吊るされており、バイオリアクターの拡大したヘッド領域中の3つのステンレススチールタブ上に密封されていた。ドラフト管および粒子分離機のバイオリアクターの内側への適合の維持は、外部環境からの微生物汚染のリスクを最小にした。 30

【0312】

本来、バイオリアクターは、排出口で液体から固定化細胞を分離するためのメッシュスクリーンを有していた。しかし、スクリーンは、詰まる傾向があるので、ステンレススチール製のシリンダーを使用して、固定化細胞ビーズがドラフト管上部を移動して環に流れ落ちるように固定化細胞ビーズを液相と分離した。粒子がシリンダーに衝突し、オーバフローとしてバイオリアクターから出て行くよりもむしろ大量の液相に戻る。したがって、バイオリアクターの排出口付近に固定化細胞粒子を含まない小領域が存在した。ヘッド領域が拡大したバイオリアクターはまた、気泡離脱のための表面積を増大させた。 40

【0313】

5.1.2 バイオリアクターのヘッドプレート

図19にバイオリアクターのヘッドプレートを示す。ヘッドプレートポートを、汚染リスクを最小に減少させるように維持した。ポートは、ヘッドプレート上に直接溶接されているか、圧縮部品（Swagelok（登録商標））を使用した。ヘッドプレートに、接種ポート、サーモウェル、温度計、ガスサンプリング用隔壁、ならびに溶存酸素測定のための液体採取ポートおよび液体返却ポートを組み込んだ。温度センサーを温度制御系にフィードバックするサーモウェルに挿入した。温度制御装置は、開閉してバイオリアクターの 50

サーマルジャケットにグリコールを供給する電磁弁にフィードバックした。温度計 (Cole-Parmer 防水熱電対温度計、番号 90610-20) およびバイオリアクターのヘッドプレートに溶接された T 型プローブを使用して温度をモニターした。正確な酸素の読み取りのために分析器ブロックによって流速 9~11 L/時の液体ブロスが必要とする溶存酸素分析器 (Theidig 博士、Digox 5) を使用して、溶存酸素を測定した。酸素測定のためにヘッドプレートから発酵液につながる直径 1/4 インチのパイプを介してバイオリアクターから液体を採取した。図 20 に示すように、溶存酸素分析器を介して液体がポンピングされるように液体から大型の粒子を除去するために、パイプのチップをフィルターに取り付けた。次いで、液体を、ヘッドプレート中の別の 1/4 インチのポートを介してバイオリアクターに戻した。

10

【0314】

5. 1. 3 無菌サンプリングのためのサニタリー弁

バイオリアクターは、バイオリアクターウェルに溶接された膜サンプル弁 (Scandi-Brew (登録商標)) を備えていた。弁は、滅菌条件下でのサンプリング用にデザインした。膜を、弁を 2 つの排出口を介して蒸気およびアルコールで完全に滅菌されるように、発酵液を直接密封した (図 18)。サンプリング中に無菌に保つために膜をエタノールの小外部リザーバーで囲んだ。この弁を、全バイオリアクターのサンプリングに使用し、サンプリング点での液体組成はバイオリアクターの排出口から排出される液体の組成と有意に異ならないと予想された。本研究の「材料と方法」の章に記載のように、バイオリアクターの外壁に位置付けた弁から生体反応物をサンプリングした。バイオリアクターの排出口から排出された液体の組成がバイオリアクターの本体からサンプリングした液体の組成と同一であることを評価するために、混合時間を研究した。

20

【0315】

パルストレーサー法を使用して、ガスリフトバイオリアクター中での混合時間を同定した (Christie、1989)。バイオリアクターの開口部に 1 mL の 10 N HCl を迅速に注入し、pH の経時変化を長期間記録した ($t = 0$ 秒は注射時の時間)。10 N NaOH の注入によって pH がその元の値に戻った。pH 電極 (Cole-Parmer、カタログ番号 P-05990-90) の長さは 277 mm であり、直径は 3.5 mm であった。Ingold モデル 2300 プロセス pH トランスミッターを使用して、pH をモニターした。保証された標準緩衝液 (Beckman の pH 7.0 緑色緩衝液 (パート番号 566002) および Beckman の pH 4.0 赤色緩衝液 (パート番号 566000)) を使用して、2 点 pH 較正を行った。Cheryl Hudson and John Beltrano らによって 1994 年に設計され、Norm Mensour (University of Western Ontario、London、Ontario) によって 1999 年に修正されたソフトウェアプログラムを使用して、周波数 3750 Hz で 300 秒間データを記録した。

30

【0316】

次いで、TableCurve 2D (Jandel Scientific Software、Labtronics、Guelph、Ontario) の Savitzky-Golay アルゴリズムを使用して、pH データをスムージングした。Savitzky-Golay アルゴリズムは、pH データ内のウィンドウの移動による最小二乗四次多項式適合に基づいたタイムドメインスムージング法である (Anon、1996)。次いで、スムージングデータを標準化し、時間に対する Δ pH のプロットを作成した。pH が均衡値の約 95% に到達した時の最も近い瞬間に混合時間を取った。3 つの異なる二酸化炭素の体積流速 ($283 \text{ cm}^3/\text{分}$ 、 $472 \text{ cm}^3/\text{分}$ (本研究を通して体積流速を使用した)、 $661 \text{ cm}^3/\text{分}$) を使用して混合時間を測定した。付録 1 に記載のように、3 つ全ての場合、バイオリアクター中の pH を 2 分未満で平衡化した (カットオフ約 95%)。混合時間は、バイオリアクターが十分に混合されているという本発明者らの予測の立証には非常に短いと考誤差れた。これにより、バイオリアクター壁からサンプリングした液体の組成はバイオリアクター中での平均液体存在時間が 24 時間である排出口から流れた液

40

50

体の組成と有意に異ならないと予想された。添付の図面から、分散によって混合時に重ね合わされた確実な液体の再循環が認められ、これはガスリフトバイオリアクターで典型的である (Christi, 1989)。

【0317】

5. 2 連続ビール発酵系の流れ図

Labatt Brewing Company Limited (Ontario, London) の小規模醸造所パイロットプラントに格納されている連続ビール発酵系についての流れ図を図 21 に示し、表 5. 1 に部材を詳述する。まとめると、醸造所の麦汁を London Labatt Plant から回収し、瞬間殺菌装置 (Fisher Plate Heat Exchanger、コンビフロー型 Eurocal 5 FH) を使用して滅菌し、大型貯蔵タンク (T-1 および T-2) で保存した。連続発酵中に、麦汁を制御された流速で固定化酵母細胞を含むガスリフトバイオリアクター (BR-1) に移した。発酵液をオーバーフローとしてバイオリアクターから取り出し、受け入れ容器 (T-3) に回収した。以下の節では、図 21 に記載の連続ビール発酵系の操作を詳述する。

【0318】

5. 2. 1 麦汁回収および貯蔵

連続発酵の非酸化麦汁を、Labatt London プラントから麦汁に取り込まれる酸素を最小にするために二酸化炭素で予備パージした 1600 L の円錐形保存タンクへの配管によって回収した。麦汁貯蔵タンク (T-1 および T-2) を含むこの規模の全タンクを、ラバットの最良実施例のとおり使用前に洗浄および消毒した。次いで、麦汁を瞬間殺菌し、2℃の利用可能な麦汁貯蔵タンク (T-1 または T-2) (これらもまた二酸化炭素で予備パージする) に移した。これらのタンク中で麦汁を 2℃に 2 週間まで貯蔵し、連続発酵バイオリアクター (BR-1) に液体を供給した。2 週間後、新鮮な麦汁を含む第 2 の麦汁タンクから麦汁が供給されるように、供給されたバイオリアクターを交換した。2 つの同一の麦汁貯蔵タンク T-1 および T-2 を使用して、新鮮な麦汁への交換時の休止時間を最小にした。全ての場合、バイオリアクター (BR-1) への導入の少なくとも 2 日前に麦汁を汚染について試験した。麦汁が汚染している場合、これを破棄し、直ちに新鮮な麦汁を回収および滅菌した。

【0319】

保存時の麦汁溶存酸素濃度の最小化：目的は、麦汁を最小の酸素レベル (一定のレベル) および低温 (麦汁を冷凍しない) で保存することであった。これには、バイオリアクターへ麦汁を一貫して供給し、且つ保存時の微生物による麦汁汚染のリスクを最小にするために、酸素との化学反応由来の麦汁中の望ましくない不要な反応 (Narzis 等、1993) を防止することが必要であった。連続発酵のために麦汁を貯蔵するために使用される大型の 1,600 L (正味) の円錐状容器 (T-1 および T-2) は本来バッチ発酵用にデザインされており、麦汁貯蔵タンクとしてデザインされていなかった。このために、麦汁を 2℃に維持するためにこれらの容器を冷却することは適当ではなかった。3 日間の麦汁の貯蔵後、タンクの場所によって温度は 15℃も変化した (表 5. 2)。

【0320】

タンク中のこれらの温かい領域により、微生物増殖のリスクが増大した。したがって、全体を確実に均一に低温にするために、これらのタンクをいくらか混合する必要があった。

【0321】

これらの理由のために、各麦汁貯蔵タンク (T-1 および T-2) のベースコーンにパイプスパージャーを設置した。タンクに麦汁を充填し、溶存酸素を低レベルに一定に維持するための最良のプロトコルを決定するための実験を行った。第 1 の実験では、保存タンクに酸化させずに回収して新たに滅菌した麦汁を充填した。一旦貯蔵タンクに 1,600 L の麦汁が充填されると、タンクベースに $0.113 \text{ m}^3/\text{時}$ の二酸化炭素をスパージした。第 2 の実験中に、麦汁を酸化させずに回収し、瞬間殺菌した。このとき、充填前に貯蔵タンクを二酸化炭素 ($0.85 \text{ m}^3/\text{時}$) で 3 時間パージし、麦汁をタンクに移す間に

少量の二酸化炭素 ($0.113 \text{ m}^3/\text{時}$) を貯蔵容器に連続的にスパージした。この低流速二酸化炭素をタンク中で保存した麦汁に連続的に封入する一方で、麦汁を連続発酵させた。両方の実験のために、麦汁の溶存酸素濃度を、1 週間の貯蔵中に定期的にモニターした。

【0322】

図 5. 7 では、麦汁貯蔵時間に対する溶存酸素濃度を示す。貯蔵タンクを二酸化炭素で予備パージしない場合、タンクのヘッドスペース中の空気により、麦汁による酸素がいくらか増加した。したがって、タンクを予備パージしない場合、麦汁中の溶存酸素濃度を最小且つ一定レベルに到達させるには非常に長い時間がかかった。タンクを予備パージした場合、麦汁の溶存酸素濃度は、貯蔵期間を通して一定に低レベルに維持された。したがって、麦汁貯蔵タンク (T-1 および T-2) の予備パージおよびタンクにわずかな陽圧を維持するための貯蔵中の麦汁への少量の二酸化炭素の封入の維持を、全ての連続発酵のための麦汁貯蔵手順として導入した。 10

【0323】

$0.113 \text{ m}^3/\text{時}$ の二酸化炭素スパージの有無による貯蔵容器中の温度プロファイルも比較した。温度計 (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple Thermometer、カタログ番号 90610-20) に接続した T 型温度プローブを使用して、麦汁よりもむしろ水に対して比較を行った。麦汁貯蔵タンク中に水道水 (1,600 L) を回収し、3 日間平衡化し、貯蔵タンクの異なる領域の水の温度を記録した。タンク中の水に $0.113 \text{ m}^3/\text{時}$ の二酸化炭素を 24 時間スパージし、再度温度を記録した。それぞれの場合における周囲温度を記録し、貯蔵タンク内の温度設定値は 2.0°C であった。 20

【0324】

表 5. 2 で認められるように、二酸化炭素スパージを使用すると、貯蔵タンク内の温度はより均一になり、測定領域の温度は 0.1°C と 4.1°C との間の範囲であり、タンクの内容物は凍結しなかった。この低温により、貯蔵中の麦汁の望ましくない微生物の増殖の防止の一助となった。

【0325】

タンク上部に設置した滅菌ガスフィルターを介して、ガスを麦汁貯蔵タンクから放出させた。次いで、変速ペリスタリックポンプ (P-1) (Masterflex (登録商標) L/S (商標) Digital Standard Drive、Cole-Parmer カタログ番号 P-07523-50) を使用し、Norprene (登録商標) 食品用 L/S 16 撓管を使用して、8 L のバイオリアクター (BR-1) の注入口に麦汁を移した。 30

【0326】

5. 2. 2 ガスリフトドラフト管バイオリアクター系を使用した連続発酵
麦汁を、1/4 インチのポートを介してバイオリアクター (BR-1) のボトムコーン付近に導入した。濾過滅菌した (Millipore、Millex (登録商標) -FG₅₀、 $0.2 \mu\text{m}$ 濾過ユニット) 空気と二酸化炭素 (純度 99.99%) との混合物を、焼結ステンレススチールスパージャーを介してバイオリアクターに流した。浮子式流速計 (R-3) を使用して、STP での二酸化炭素の流速を制御し、予め校正した質量流速制御装置 (M-1) を使用して、STP での空気の流速を制御した。発酵液をオーバーフローとしてバイオリアクターから取り出し、直径 1 インチの強化 PVC 配管を介して外部グリコールコイルで冷却して温度を 4°C に保持した 30 L のステンレススチール製回収容器 (T-3) に流した。 40

【0327】

5. 2. 3 生成物の回収

生成物回収容器 (T-3) は、発泡を最小にするために回収容器の壁に発酵液が流れ落ちるようにデザインされた大きな注入ポート (直径 1 インチ) を有していた。この容器はまた、バイオリアクター (BR-1) からのガスの放出用の滅菌ガスフィルター (Mil 50

i p o r e、M i l l e x（登録商標）－F G₅₀、0.2 μmフィルターユニット）および回収容器（T－3）を有していた。タンクのベースより2インチ上部に設置した1／4インチの弁（V－12）を使用して、回収容器を定期的に空にした。

【0328】

5. 2. 4 グリコール冷却ループ

グリコールを温度－23℃および圧力45 p s i gでロンドン醸造所から小規模醸造所パイロットプラントに移し、麦汁保持タンク（T－1およびT－2）用の冷却ジャケット、ガスリフトバイオリアクター（B R－1）、および生成物回収容器（T－3）を循環させた。2つの麦汁貯蔵タンクおよびバイオリアクターは、温度制御装置にフィードバックして冷グリコール流を容器のジャケットに制御する液相温度プローブを備えていた。麦汁貯蔵タンクに2℃の麦汁を貯蔵する一方で、バイオリアクター内の温度を特定の実験に依存して12℃～22℃に制御した。生成物回収容器は、自動温度制御されていなかったが、むしろ、容器を約4℃に維持するためにグリコール流を手動で制御した。この容器内の液体は簡単に破棄されてさらに分析も処理も行わないので、生成物制御容器（T－3）の温度を正確に制御する必要はなかった。

【0329】

グリコールを使用して、麦汁タンク（T－1およびT－2）からバイオリアクター（B R－1）への麦汁移動ラインも被覆および冷却した。一旦グリコールが所定のジャケットを介して循環すると、グリコールは、一般に温度－15℃および圧力40 p s i gでパイロットプラント小規模醸造所内のメインラインに戻り、その後ロンドンのプラントに戻された。

【0330】

5. 3 バイオリアクターの滅菌プロトコール

バイオリアクター（B R－1）にD i v e r s o l（登録商標）C X／A（D i v e r s e y L e v e r、C a n a d a）（洗浄剤）の2%（v／v）溶液を充填し、ガスをスパージしながら一晩浸漬させた。次いで、バイオリアクターから排出させ、冷水でリンスした。洗浄液と水でのリンスのこのサイクルを2回繰り返した。蒸気の滅菌用のバイオリアクターを調製するために、麦汁およびガスのラインを分離した。蒸気のラインをバイオリアクターの注入口に接続し、以下の弁を開けた：バイオリアクターの注入口およびパーキング弁（V－7、V－6）、ガス注入口（V－17）、生成物の排出弁（V－9、V－11）、膜サンプリング弁（V－8、V－10）、ならびに回収容器の排出ポート（V12）。次いで、プラントの蒸気の弁を、ゆっくりと開け、蒸気の滴が各外部開口部の出口で認められるようにバイオリアクターの弁を調整した。蒸気の曝露から60分後、麦汁バイパス弁（V－6）以外のバイオリアクターの全ての外部弁（V－17、V－8、V－10、V－12）を閉じた。蒸気の弁を閉じた場合、麦汁バイパス弁を閉じ、滅菌フィルターを回収容器に接続して冷却するにつれて系に侵入する非滅菌空気による汚染を防止した。陽圧を維持しながら系を冷却するためにプラントの蒸気のラインを閉じるので、バイオリアクターのガスラインもV－17に再接続した。

【0331】

5. 4 発酵系の設定

醸造所の麦汁をプラントから20Lのステンレススチール製圧力容器に回収し、オートクレーブにて100℃で45分間加熱した。固定化細胞を、冷却した麦汁（40% v／v）に無菌的に移した。密封した容器を、バイオリアクター系が格納された小規模醸造所のパイロットプラントに輸送した。20Lの容器を、3／8インチの強化PVC配管（C o l e e－P a r m e r、U S A）に固定した急接続金具（C o r n e l i u s A n o k a、M N、U S A）に接続した。PVC配管の他の末端を、バイオリアクター壁中の膜サンプリング弁（V－8）に固定した。濾過滅菌した二酸化炭素を10 p s i gで20Lの容器に注ぎ、接種物が外側の大気環境に曝露されること無く固定化細胞混合物が容器からバイオリアクターに移されるように膜サンプルポートを開けた。20L容器の「急接続」金具の内部成分を取り除いて、移動時の固定化細胞によるバイオリアクターの見詰まりを防止

した。κ-カラギーナンゲルビーズの累積粒子サイズ分布（小型）を、図5.8に示す。相加平均粒子直径（ D_{pam} ）は1.252mmであり、ザウタ平均粒径（ D_{psm} ）は1.17mmと計算された。平均粒径は、1.255mmであった。実験データおよび平均粒径の計算を、付録1に示す。

【0332】

固定化細胞の接種後、糖およびダイアセチルの濃度が比重に関して3⁰プラトー未満であり、ダイアセチルが100μg/L未満の標的に達するまで、バイオリアクターをバッチモードで操作した。次いで、連続操作用の系を調製した。麦汁移動ラインを熱水で濯いで蒸気によって滅菌するために、弁V-2（またはT-2についてはV-4）、V-5、およびV-6を開き、V-1（T-2についてはV-3）およびV-7を閉じ、麦汁を単離した。麦汁移動ラインを、V-2（またはT-2についてはV-4）を介して供給した約80℃の熱水でリンスした。熱水リンスサイクル後、プラントの蒸気のラインを同一の位置に接続し、麦汁移動ラインを最低30分間蒸気で滅菌した。蒸気のラインを遮断すると同時に、バイパス弁（V-6）も閉じた。一旦系が冷却されると、V-2（またはT-2についてはV-4）を閉じ、蒸気のラインを遮断した。麦汁タンク弁V-1（またはT-2についてはV-3）およびバイパス弁（V-6）を開き、麦汁移動ポンプ（P-1）を始動させた。ライン中の濃縮物が新鮮な冷麦汁に置換されるまで、麦汁をバイパス弁（V-6）を介して排水管に送った。その時点で、バイパス弁を閉じ、リアクター上のバイオリアクター注入弁（V-6）を開け、連続発酵プロセスを開始した。

10

【0333】

2週間毎に麦汁を供給したタンクを、貯蔵タンク間（T-1およびT-2）で入れ替えた。T-1からの麦汁供給から2週間後、連続供給ポンプP-1を停止させ、バイオリアクターの注入口の弁（V-5）を閉じた。次いで、麦汁移動ラインを第2の貯蔵タンク（T-2）に接続し、前の段落に記載のようにラインを洗い流して滅菌した。次いで、1時間未満のほんの短期の停止時間後に連続発酵を再開した。

20

【0334】

【表88.1】

表5.1 図5. 6 に示す流れ図についての部材の詳細な説明 (PTFE、ポリテトラフルオロエチレン; SS、ステンレススチール)

項目	説明	サイズ	材料の構成
BR-1	バイオリアクター	正味8L	316 SS
T-1	麦汁用の保存タンク	正味1600L	316 SS
T-2	麦汁用の保存タンク	正味1600L	316 SS
T-3	ビール用の保存タンク	正味30L	316 SS
P-1	T-1からBR-1への麦汁移動用のポンプ (ペリスタリック、変速)	<0.08L/分	Norprene (登録商標) 食品用フレキシブル管上のSSローラー
F-1	T-1の排出口でのガス用フィルタ	<4 bar	0.2 μmPTFE膜; ポリプロピレン
F-2	T-1の注入口でのガス用フィルタ	<2 bar	0.2 μmPTFE膜; ポリプロピレン
F-3	T-2の排出口でのガス用フィルタ	<4 bar	0.2 μmPTFE膜; ポリプロピレン
F-4	T-2の注入口でのガス用フィルタ	<2 bar	0.2 μmPTFE膜; ポリプロピレン
F-5	BR-1の注入口でのガス用フィルタ	<2 bar	0.2 μmPTFE膜; ポリプロピレン
F-6	T-3の排出口でのガス用フィルタ	<2 bar	0.2 μmPTFE膜; ポリプロピレン
M-1	BR-1への空気用の質量流速制御装置	<500 sccm	ナイロン、Viton (登録商標) 「O」リング; 316SS
R-1	T-1に対する二酸化炭素の浮子流速計	<10 scfh	アクリル製ブロック; 316SS
R-2	T-2に対する二酸化炭素の浮子流速計	<10 scfh	アクリル製ブロック; 316SS
R-3	BR-1に対する二酸化炭素の浮子流速計	<2.5 scfh	アクリル製ブロック; 316SS
PR-1	T-1およびT-2に対する二酸化炭素の圧力制御装置	<100 psi	316 SS

項目	説明	サイズ	材料の構成
PR-2	BR-1に対する二酸化炭素の圧力制御装置	<100 psi	316 SS
PR-3	BR-1に対する空気の圧力制御装置	<100 psi	316 SS
V-1	T-1中の麦汁用の弁（バタフライ）	1”	316 SS、Viton（登録商標）シート
V-2	T-1中のCIPループ中の麦汁弁（バタフライ）	1”	316 SS、Viton（登録商標）シート
V-3	T-2中の麦汁用の弁（バタフライ）	1”	316 SS、Viton（登録商標）シート
V-4	T-2中のCIPループ中の麦汁弁（バタフライ）	1”	316 SS、Viton（登録商標）シート

【 0 3 3 6 】

【 表 9 0 】

10

20

30

40

50

表5.1 (続き) 図2-1に示す流れ図についての部材の詳細な説明

項目	説明	サイズ	材料の構成
V-5	ヘッダーの麦汁用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-6	BR-1麦汁注入口のバイパス用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-7	BR-1麦汁注入口用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-8	BR-1の壁上の弁 (膜サンプル)	12 mm	316 SS、シリコンシート
V-9	BR-1ビール排出口の弁 (バタフライ)	1"	316 SS、vitonシート
V-10	BR-1麦汁排出口用の弁 (膜サンプル)	12 mm	316 SS、シリコンシート
V-11	BR-1ビール排出口用の第2の弁 (バタフライ)	1"	316 SS、vitonシート
V-12	T-3由来の酵母液用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-13	T-1およびT-2に対する二酸化炭素用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-14	T-1二酸化炭素注入口用の弁 (バタフライ)	1/2"	316 SS、シリコンシート
V-15	T-2二酸化炭素注入口用の弁 (バタフライ)	1/2"	316 SS、シリコンシート
V-16	BR-1への二酸化炭素ライン用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-17	BR-1ガス注入口用の弁 (急放出)	1/4"	316 SS、シリコンシート
V-18	BR-1への空気のライン用の弁 (ボール)	1/4"	316 SS、シリコンシート

10

20

30

40

50

【表 9 1】

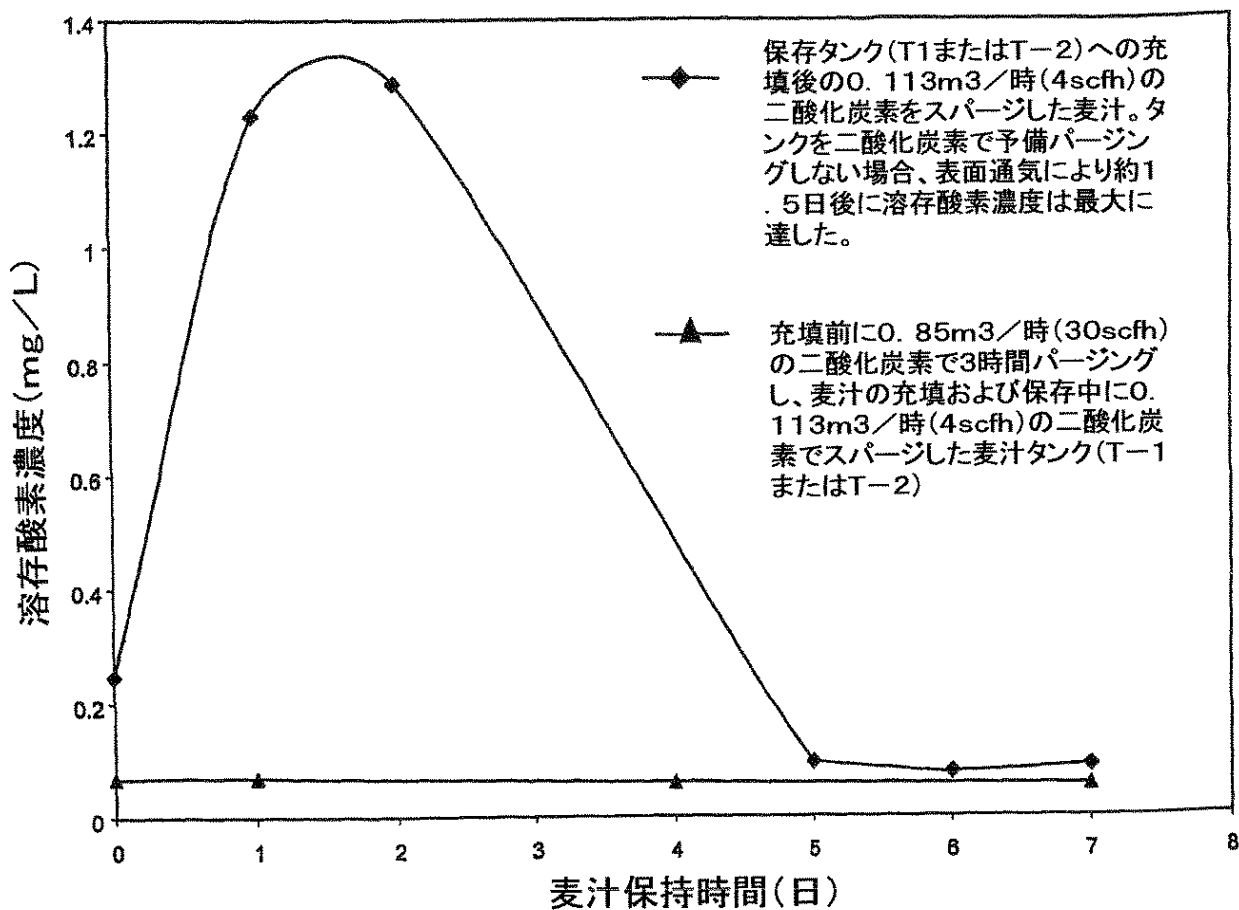
図 21 で使用した記号

	フレキシブルコネクタ および結合部
	ガスフィルター
	圧力制御装置
	ポンプ
	弁

10

【0 3 3 8】

【表 9 2】



20

30

40

図 5. 7 異なるタンク充填条件下での麦汁貯蔵容器 (T-1 または T-2) における保持時間に対する麦汁中の溶存酸素濃度

【0 3 3 9】

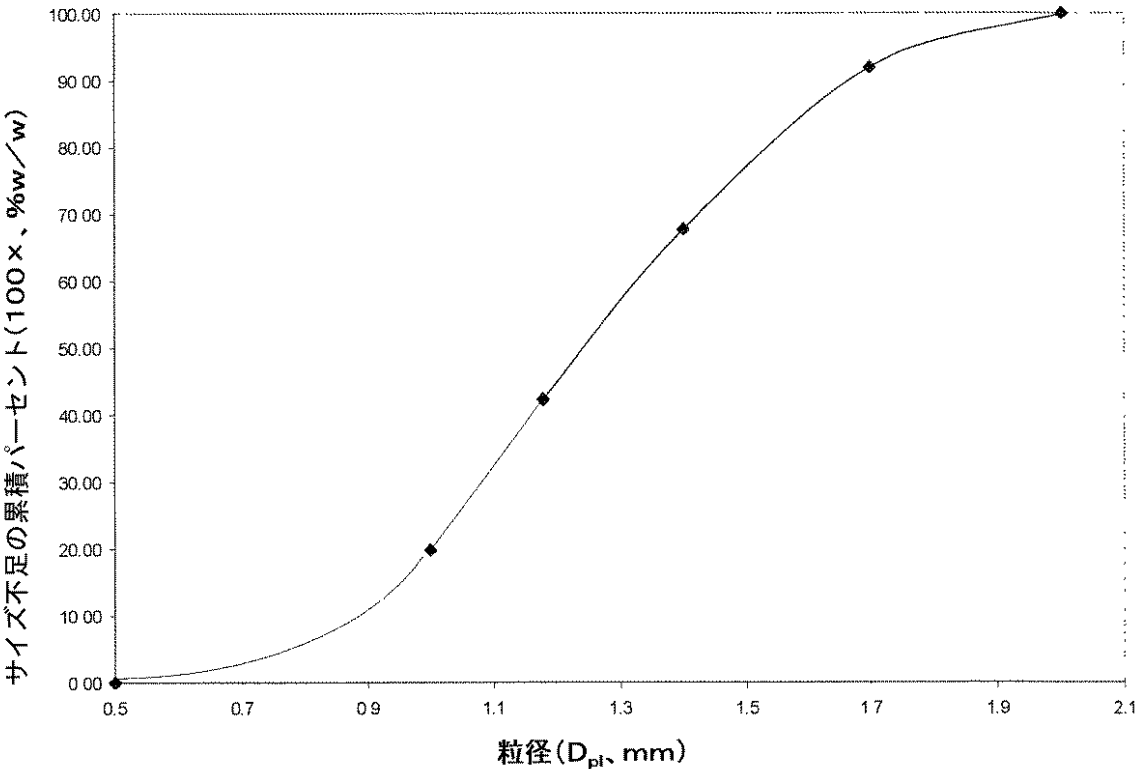
【表 9 3】

表5. 2 二酸化炭素パージングを行わずに3日間平衡化した後および24時間の0.113m³/時の二酸化炭素スパージ後の麦汁貯蔵容器（T-1またはT-2）中の水の温度プロフィール

円錐形容器内の測定位置	温度（℃）	
	（CO ₂ スパージなし）	（CO ₂ スパージ）
液体表面の10cm下および容器の壁から10cm	20.6	0.4
液体表面の10cm下および容器の中心	20.1	0.1
筒部分の底および容器の壁から10cm	3.8	3.7
筒部分の底および容器の中心	3.7	4.1
パイロットプラント周囲	21.4	19.8

10

【0340】
【表94】



20

30

図5. 8 固定化酵母細胞を含むκ-カラギーナンゲルビーズの累積粒子サイズ分布（n = 5）

【0341】

第6章 ラガー醸造酵母のκ-カラギーナンゲル固定化

科学者は、アルギン酸カルシウム（Bejarら、1992；Curinら、1987；Masschelein and Ramos-Jeunehomme、1985；Nedovicら、1996；Shindoら、1994；White and Portno、1978）、アガロース（Hooijmansら、1990；Lundberg and Kuchel、1997）、およびカラギーナンゲル（Nortonら、1995；Wangら、1982）を含む細胞全体の物理的包括のための種々のマトリックスを研究してきた。カラギーナンは食品用の材料であり、他のゲルと比較してその優れた機械的強度のために、細胞カプセル化に好ましい（Buyukgungor、1992）。

40

【0342】

この章の最初では、κ-カラギーナンゲルビーズ内での酵母細胞のコロニー形成を、3サイクルの反復バッチ発酵にわたってモニターした。固定化細胞および液相に放出された細胞の生存率を試験した。エタノール、マルトース、マルトトリオース、フルクトース、およびグルコースを含む発酵パラメータを反復バッチ発酵を通して追跡し、同一の栄養条件下で自由に懸濁している酵母細胞のみを使用した対照発酵と比較した。

50

【0343】

現在、長期固定化（Virkajarvi and Kronlof、1998）ならびに外部ストレスおよび発酵生成物への連続曝露後の細胞に対する物理的効果についての情報はほとんど公開されていない。この章の第2のパートでは、ガスリフトバイオリアクターにおける長期連続発酵にわたってカラギーナンゲルビーズ内に固定化した酵母細胞の生存率、細胞集団の分布、および外観を試験する。バイオリアクターの固定化および自由に懸濁した細胞集団における呼吸欠損酵母の相対的割合も長期にわたり試験した。

【0344】

カラギーナンは、3-6-無水ガラクトース単位の繰り返しから構成され、種々のカラギーナンは反復ガラクトース単位上の硫酸エステル基の数および位置が異なる。カラギーナンゲル化機構の図を、図22に認めることができる。カラギーナンがゾルの状態で存在する場合、この多糖類の鎖は、ランダムコイルの立体配置である。連続的網目構造のための架橋に十分なヘリックスを形成する場合、ゲル化が起こる。より多数のヘリックスが形成されるにつれて、またはヘリックスが凝集するにつれて、ゲルはより強く強固になる（Rees、1972）。

【0345】

3つの一般的なカラギーナン型は、ラムダ、イオタ、およびカッパである。図6.2に示すように、これらは硫酸エステル含有量が異なり、この硫酸エステルの量は多糖類の鎖の溶解性に影響を与える。ラムダーカラギーナンは高度に硫酸化しており、ゲル形成能力を欠く（Marrs、1998）。イオターカラギーナンはカルシウムイオンの存在下で弾性の高い弱いゲルを形成し、有意に離漿する。ゲルがヘリックスまたは凝集体をさらに形成する傾向が非常に高く、網目構造を収縮させる場合、液体が「滲出」し、離漿する（Rees、1972）。カッパーカラギーナンは穏やかに硫酸化されるので、カリウムイオンの存在下でより強力かつ強固なゲルを形成し、いくらか離漿する。カッパーカラギーナンによって付与されるゲル強度の増加により、酵母細胞全体の固定化に望ましくなる。

【0346】

【表95】

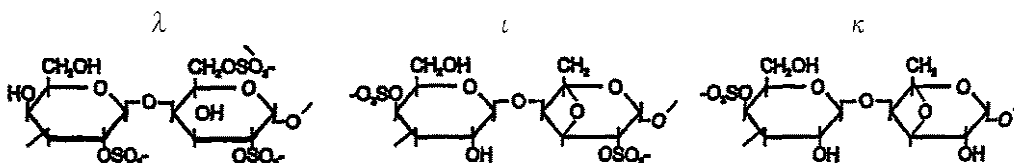


図6.2 ラムダ、イオタ、およびカッパーカラギーナンの化学構造

【0347】

カラギーナンの重要な特徴は、その可逆的熱ゲル化性である。カラギーナン溶液を冷却した場合、粘度が増加し、ゲル化が起こる。溶液を加熱した場合、粘度は低下し、カラギーナンがゾル状態に戻る。ゲル化陽イオン溶液の組成の制御により、カラギーナンがゾルからゲルに変換する温度を変化させることができる。κ-カラギーナンのゲル化温度は、溶液中の塩化カリウム濃度の増加と共に上昇する。激しい温度の変動を回避することができるので、この現象を使用して細胞の固定化プロセスを操作した（Neufeldら、1996）。発酵条件下でゲルであるのに十分に高いが、ビーズのゲル化前の生存率に悪影響を及ぼすことなく酵母細胞をゾル状態のカラギーナンと混合するのに十分に低くなるように、カラギーナンのゲル化温度を制御することができる。

【0348】

それにもかかわらず、酵母細胞の代謝および生理学に対するゲルマトリックス内での固定化の影響についてさらに研究する必要がある多数の要因が存在する。基質を細胞表面に輸送する前に克服すべきゲルマトリックスおよび他の包括酵母細胞由来のさらなる障壁が存在するので、固定化細胞を液相中の遊離細胞と同一の微環境に供さない（図23）。固定化細胞の栄養制限が発酵品質に及ぼす潜在的な負の影響についてのより深い理解を得るため

に、ゲルマトリックス内の物質移動速度についての研究が多数存在する（Estapeら、1992：Hannoun and Stephanopoulos、1986；Korgelら、1992；Kurosawaら、1989；Merchantら、1987；Oyaasら、1995；Venancio and Tiexiera、1997）。カラギーナンゲル内の小分子の有効拡散率は水中での同一分子の拡散率に匹敵し、ゲルがグルコースおよびエタノールなどの小分子を分散させる。しかし、典型的な固定化細胞発酵では、栄養素は分子核酸に加えて主に対流輸送によって固定化細胞ビーズに迅速に輸送される（Hannoun and Stephanopoulos、1986）。一旦栄養素がビーズに侵入すると、分子の拡散に支配されるので、輸送は比較的遅い。これは、ゲルビーズ周囲の酵母細胞がビーズの中心の酵母細胞よりも明らかに栄養的に有利であり得ることを意味する。

【0349】

10

固定化酵母のエイジも考慮しなければならない。連続発酵としての包括細胞のエイジは数ヶ月間にわたり進行し、これらは規定の一連の偽定常条件下で発酵する。しかし、バッチ発酵中に、酵母細胞は、経時的に変化する環境に曝され、細胞は限定数の発酵についてのみ破棄される前に再利用される。発酵品質に関する酵母細胞の生存率に対する連続発酵の長期的効果をより多く研究する必要がある。

【0350】

この章のパートAでは、3サイクルの反復バッチ発酵中のκ-カラギーナンゲルビーズ中での酵母のコロニー形成キネティクスを試験した。エタノール、プラトー値、および糖濃度と共に、固定化および自由に懸濁している酵母の生存率および細胞濃度をモニターした。

【0351】

20

パートBでは、ゲルビーズ内での細胞の位置および分布ならびに酵母細胞形態学に対する発酵時間の影響を試験した。走査電子顕微鏡（SEM）を使用して、以下の4つ異なる時間でのゲルビーズの異なる領域でのκ-カラギーナン固定化酵母細胞を試験した：1) ビーズ生成直後、2) バッチ発酵の2日後、3) パイロットスケールのガスリフトバイオリアクターでの2ヶ月の連続発酵後、4) パイロットスケールのガスリフトバイオリアクターでの6ヶ月の連続発酵後。固定化細胞および液相細胞の両方における酵母の生存率および濃度も測定した。ガスリフトバイオリアクターでの5ヶ月の連続発酵後に呼吸欠損酵母（液相中の固定化細胞および遊離細胞）の相対的割合も試験し、これを伝統的なバッチビール発酵で見出された割合と比較した。研究中ずっと製造用ラガー酵母菌株を使用した。

【0352】

30

6. 1 実験手順

κ-カラギーナンゲルビーズの生成：κ-カラギーナンゲルX-0909は、Copenhagen PectinA/Sから好意的に贈られた。最初の細胞ローディングが 2.6×10^7 個/mLゲル（特許出願番号2133789）（Neufeldら、1996）であり、ビーズ直径が0.5～2.0mmである静止型混合機プロセスを使用して、包括ラガー酵母細胞を含むκ-カラギーナンゲルビーズを生成した。

【0353】

発酵培地：材料と方法の節に詳述しているように、比重17.5⁰Pの醸造用麦汁がカナダのラバット醸造所から供給された。

【0354】

40

パートA：κ-カラギーナンゲルビーズ中に固定化された酵母の反復バッチキネティクス21℃の2Lエルレンマイヤーフラスコ中にて150rpmで震盪しながら発酵を行った。キャリアのローディングは40%（v/v）の固定化細胞ビーズであり、総発酵体積は1Lであった。各発酵を7日間継続した。R1では、新鮮な固定化細胞ビーズを麦汁に投入し、発酵終了時にこれらのビーズを混合物の滅菌ステンレススチール篩（メッシュサイズ500μm）の通過によって発酵液から分離した。次いで、第2（R2）および第3（R3）のバッチ発酵のために、ビーズを同一の比率で新鮮な滅菌麦汁に再投入した。各発酵の最初の3日間は1日に2回、4日目および5日目は1日に1回サンプリングを行った。2連または3連で発酵を行った。全ての発酵を自由に懸濁した細胞対照発酵を使用して行い、遊離の細胞のみを4g/Lの速度で発酵物に投入する以外は同一の条件下で行った。サンプルを、遊離細胞および固定化細胞

50

の生存率および濃度、ならびに液相炭水化物濃度およびエタノール濃度について分析した。

【0355】

3つの固定化細胞発酵サイクルおよび遊離の細胞対照について、基質である総発酵グルコース由来の生成物エタノールの収率因子 ($Y_{p/s}$) を、式3. 20を使用して計算した。全発酵について、発酵開始からマルトース消費が完了する時間までの収率因子を計算した。

【0356】

エタノール生成力 ($V_{ethanol}$) (単位発酵時間あたりの全バイオリアクター有効体積あたりのエタノール生成量) を、R1、R2、およびR3については式3. 25を使用して計算し、発酵開始からマルトース消費時間までの遊離細胞制御を完了した。収率因子およびエタノール生成力の場合、固定化および自由に懸濁した酵母細胞の寄与は互いに区別されなかった。

【0357】

平均遊離細胞対照についての極大比重 ($\square_{max}$) および細胞倍增時間を、式3. 3および3. 4を使用して計算した。

【0358】

パートB：長時間発酵した固定化酵母の生存率および形態学的特徴

バッチ発酵条件：21℃の2Lエルレンマイヤーフラスコにて150rpmで震盪しながらバッチ発酵を行った。キャリアローディングは40% (v/v) であり、全発酵体積は1Lであった。

【0359】

連続発酵条件：連続発酵のためにパイロットスケールのガスリフトドラフト管を使用した。収集した全データは、同一の発酵培地および固定化法を使用して50Lのバイオリアクターから回収した2ヶ月間の走査電子顕微鏡写真以外は8L有効体積バイオリアクターに由来していた。40% (v/v) の固定化細胞ビーズを、空気と二酸化炭素との混合物を使用してバイオリアクター内で流動化させた。発酵温度を12℃、17℃、および22℃に制御し、滞留時間を0.9日と1.8日との間に保持した種々の条件下で、バイオリアクターを操作した。ガスリフトリアクターの最大エタノール濃度は6ヶ月の実験中に73kg/m³に達し、平均濃度は58kg/m³であった。

【0360】

微生物学的分析：野生型酵母、非ラガー酵母、ならびに好気性および嫌気性ビール腐敗細菌を含む汚染物を試験するために、ガスリフトバイオリアクターの液相から少なくとも1週間に1回サンプルを採取した。5ヵ月後、液相の酵母細胞を、呼吸欠損変異について2連でアッセイした。

【0361】

走査型電子顕微鏡 (SEM)：SEM試験のために、以下の4つの異なる時間での固定化ラガー酵母細胞を含むκ-カラギーナンゲルビーズ (直径1.0~1.5mm) をサンプリングした：1) 固定化細胞ビーズ生成後且つ発酵培地へのビーズの接種前、2) バッチ発酵の2日後、3) パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター中での2ヶ月の連続発酵後、4) パイロットスケールのガスリフトドラフト管バイオリアクター中での6ヶ月の連続発酵後。SEMおよび関連サンプルの調製方法を、第4. 7節に記載する。

【0362】

第4. 6節に記載の方法を使用して、酵母細胞の濃度および生存率 (固定化および自由に懸濁したもの) を、SEMと同時にアッセイした。

【0363】

6. 2 結果と考察

パートA：κ-カラギーナンゲルビーズ中に固定された酵母の反復バッチキネティクス

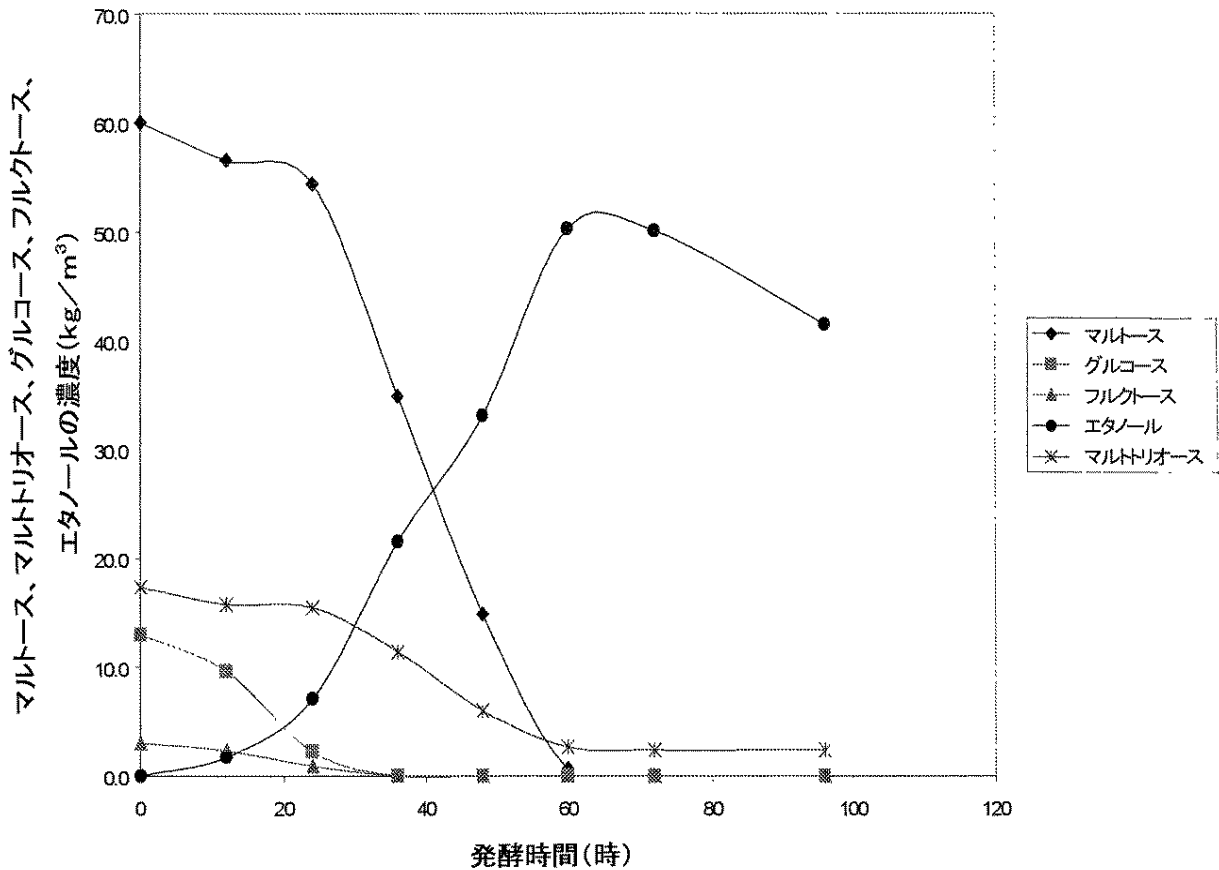
3回反復バッチ発酵サイクルの発酵時間に対して、マルトース、マルトリオース、グルコース、フルクトース、およびエタノールを示した図6. 4の (a)、(b)、および (c) で認められるように、新鮮な麦汁に固定化細胞を再投入するたびに発酵時間は非常に減少された。これらの図から、糖の完全な消費時間は、R1については64時間、R2については44

時間、R3については26時間であることが認められる。図6. 5に示す固定化細胞ビーズを含まない自由に懸濁した細胞の対照発酵では、完全な糖消費に82時間かった。図6. 4のグラフから、最終エタノール濃度は3つの反復バッチ固定化細胞発酵のうち3番目のもので最も高いことも認められる。 κ -カラギーナンがヒドロゲルであるので、新鮮な麦汁への再投入時にいくらかのエタノールがビーズ中に残存する。したがって、R2およびR3について、時間ゼロでは発酵液中にいくらかのエタノールが存在し、図6. 5に示すように、遊離細胞対照発酵と比較して、固定化細胞発酵（図6. 4）におけるグルコース、マルトース、マルトリオース、およびフルクトースの初期濃度は低かった。したがって、類似の基本に対する収率（消費糖（g）あたりのエタノール生成（g））を試験することができるように発酵について収率因子を計算した。

10

【0364】

【表96】



20

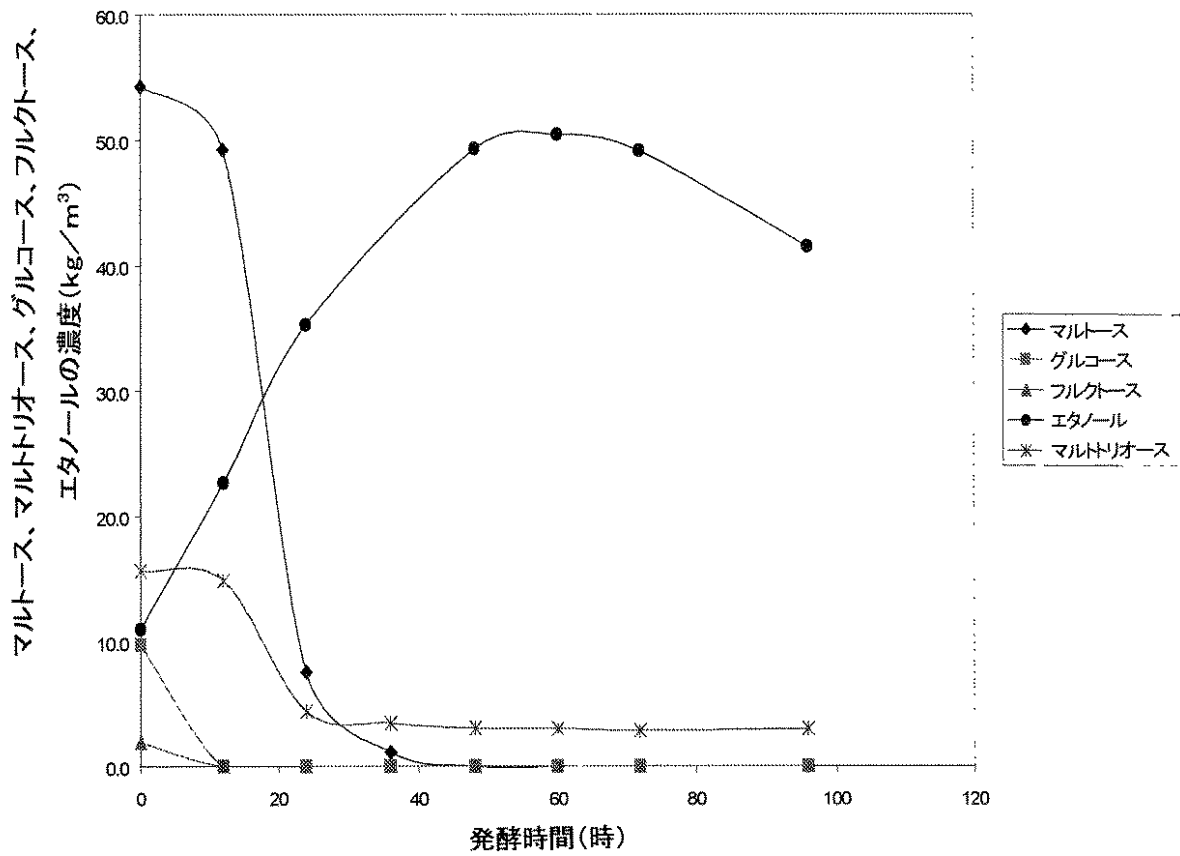
30

図6. 4. a) (R1) κ -カラギーナンゲルビーズ中に固定化したラガー酵母細胞を使用した、反復バッチ発酵の発酵時間に対するマルトース、マルトリオース、グルコース、フルクトース、およびエタノールの濃度。

【0365】

【表97】

40



10

20

図 6 . 4 . b) (R 2) κ-カラギーナンゲルビーズ中に固定化したラガー酵母細胞を使用した、反復バッチ発酵の発酵時間に対するマルトース、マルトリオース、グルコース、フルクトース、およびエタノールの濃度。

【 0 3 6 6 】

【 表 9 8 】

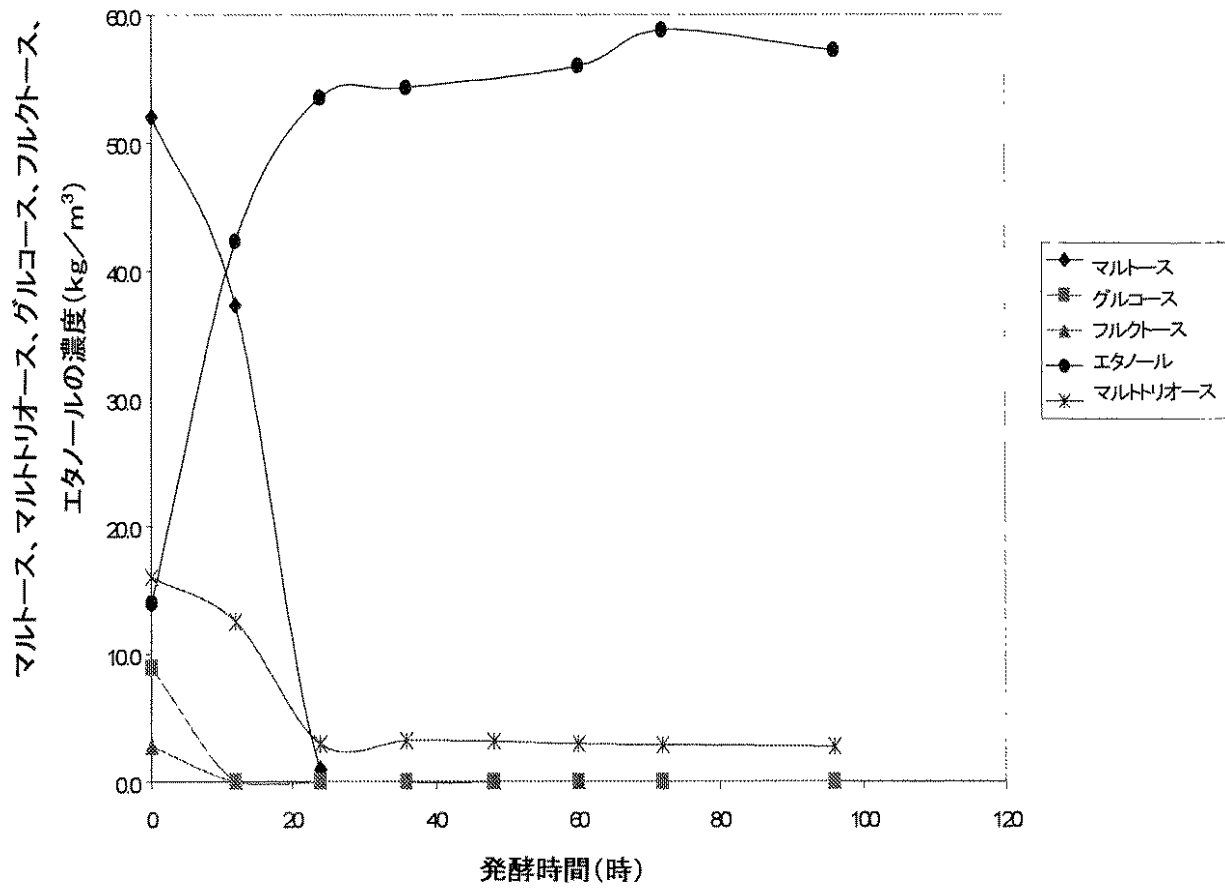


図 6. 4. c) (R 3) κ -カラギーナンゲルビーズ中に固定化したラガー酵母細胞を使用した、反復バッチ発酵の発酵時間に対するマルトース、マルトトリオース、グルコース、フルクトース、およびエタノールの濃度。

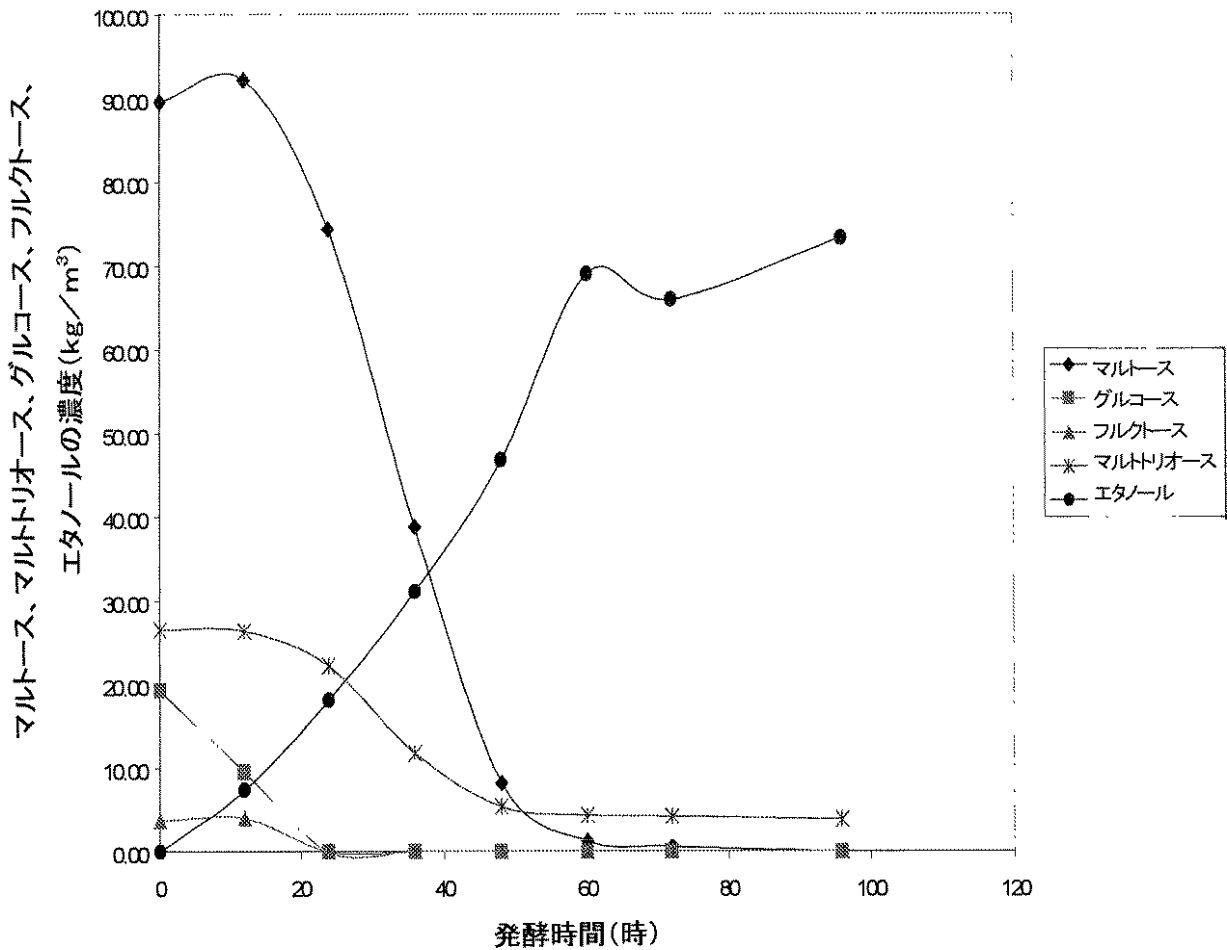
【 0 3 6 7 】

【 表 9 9 】

10

20

30



10

20

図6. 5 自由に懸濁したラガー酵母対照発酵（固定化されていない細胞）の発酵時間に対するマルトース、マルトリオース、グルコース、フルクトース、およびエタノールの濃度。

【0368】

30

図6. 6の (a) および (b) は、R1、R2、およびR3の発酵時間に対するマルトースおよびエタノールの濃度をそれぞれ比較する。反復R1の間、マルトースは新鮮な麦汁への投入のほぼ直後に酵母細胞によって取り込まれた。エタノール濃度は反復R1よりも早くそのピークに達し、また、最初の2つのバッチ発酵よりも高い濃度に到達した。図6. 6 (b) に示すように、これらの固定化細胞がR2に再投入された場合にR1でのエタノール生成における初期lagは劇的に減少し、R3への再投入後にさらに減少した。

【0369】

【表100】

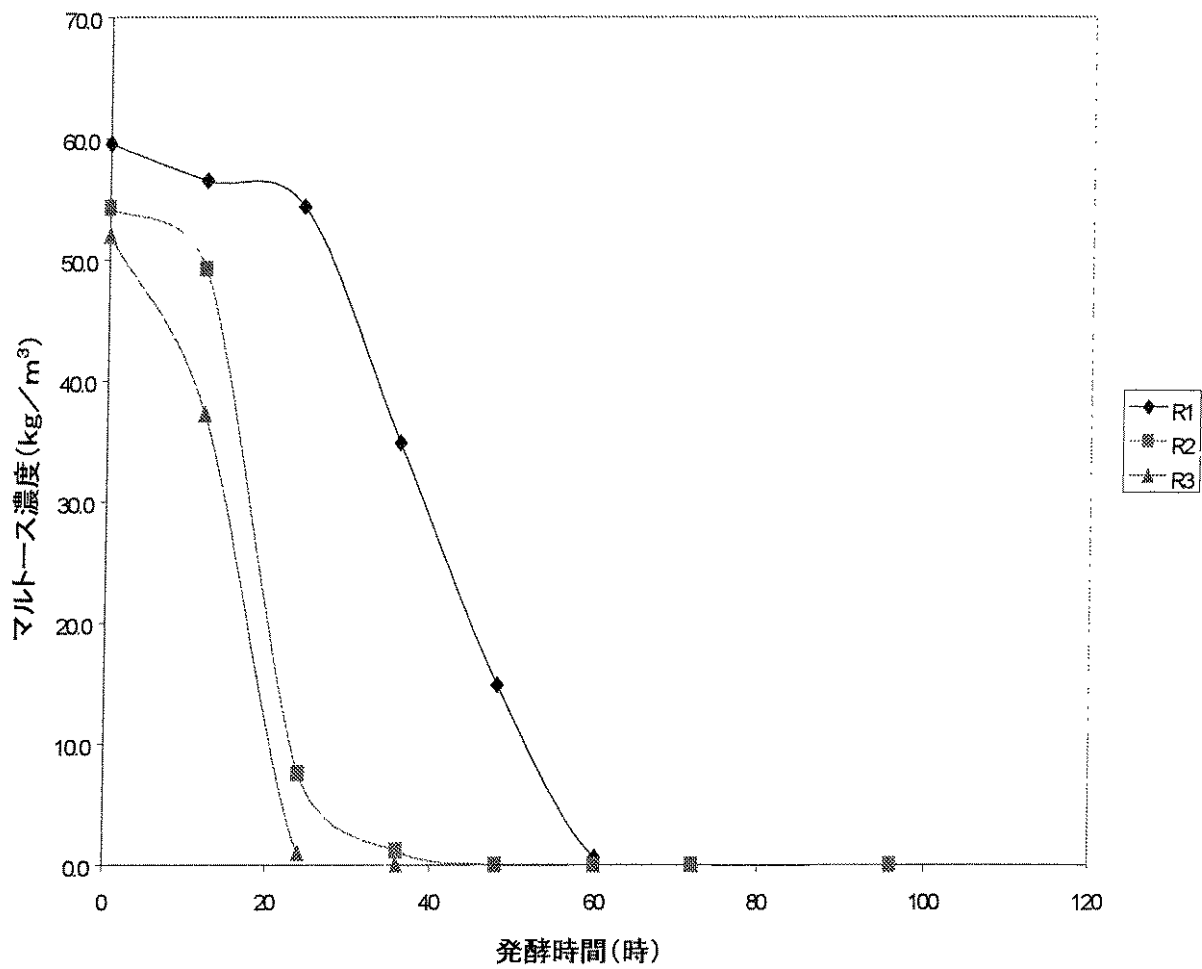


図 6 . 6 . a) κ -カラギーナンゲルビーズ中に固定化したラガー酵母細胞を使用した、反復バッチ発酵 (R 1、R 2、および R 3) の発酵時間に対するマルトース濃度。

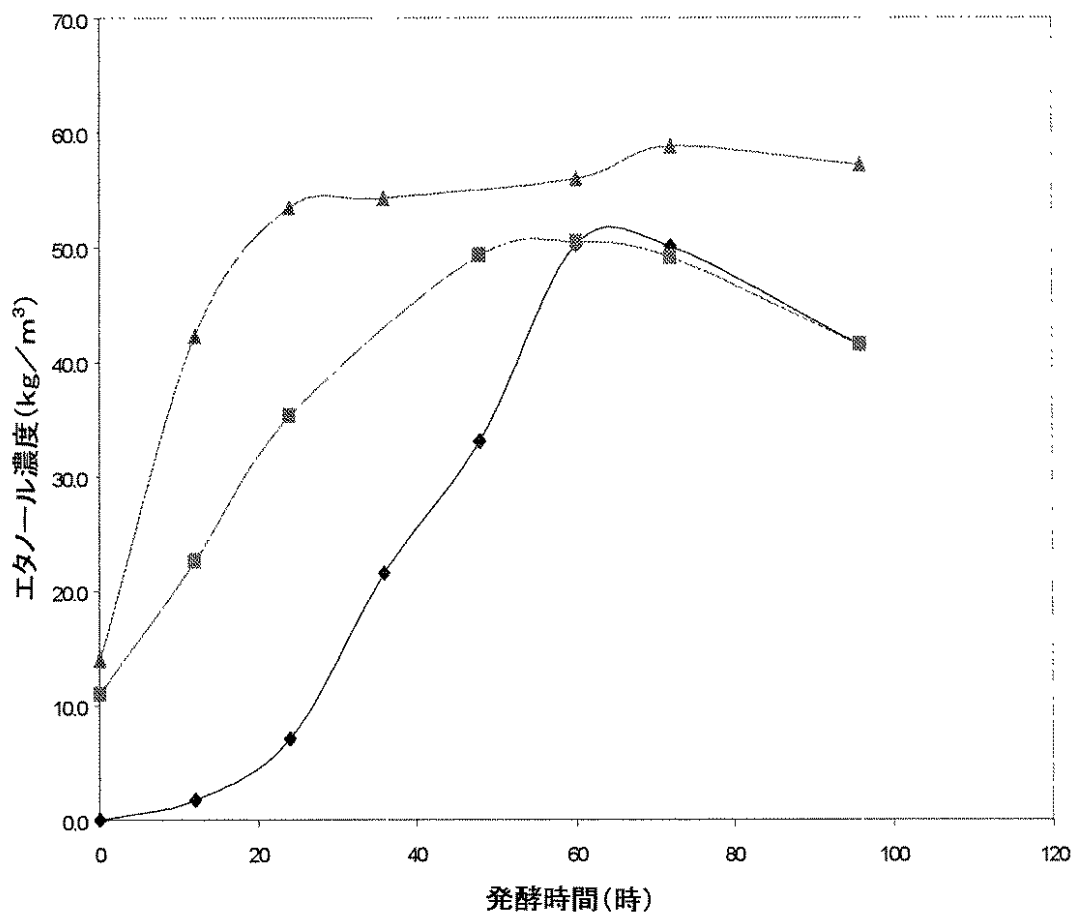
【 0 3 7 0 】

【 表 1 0 1 】

10

20

30



10

20

図6. 6. b) κ -カラギーナンゲルビーズ中に固定化したラガー酵母細胞を使用した、反復バッチ発酵 (R1、R2、およびR3) の発酵時間に対するエタノール濃度。

【0371】

図6. 7 (a) は、R1、R2、およびR3の発酵時間に対する総バイオリアクター体積あたりの固定化細胞濃度を示す。時間に対するこれらの発酵における固定化細胞マトリックスからバルク液相に放出される遊離細胞を図6. 7 (b) に示す。図6. 7 (c) では、3つのバッチ 30
 についての総リアクター体積あたりの固定化および遊離の酵母細胞の合計を示す。図6. 7 (a) は、 κ -カラギーナンゲル内の固定化細胞濃度はR1の麦汁へのその最初の接種後に増加しつづけることを示す。反復R2のためにビーズを新鮮な麦汁に再投入した場合、ゲルビーズ内で増殖しつづけた。3回目の包括細胞の新鮮な麦汁への再投入で、固定化細胞濃度の増加速度は減少した。 κ -カラギーナンゲルマトリックスからバルク液相に放出された遊離細胞、固定化細胞、およびR1の発酵における全細胞の濃度プロファイルを、図6. 8に示す。

【0372】

【表102】

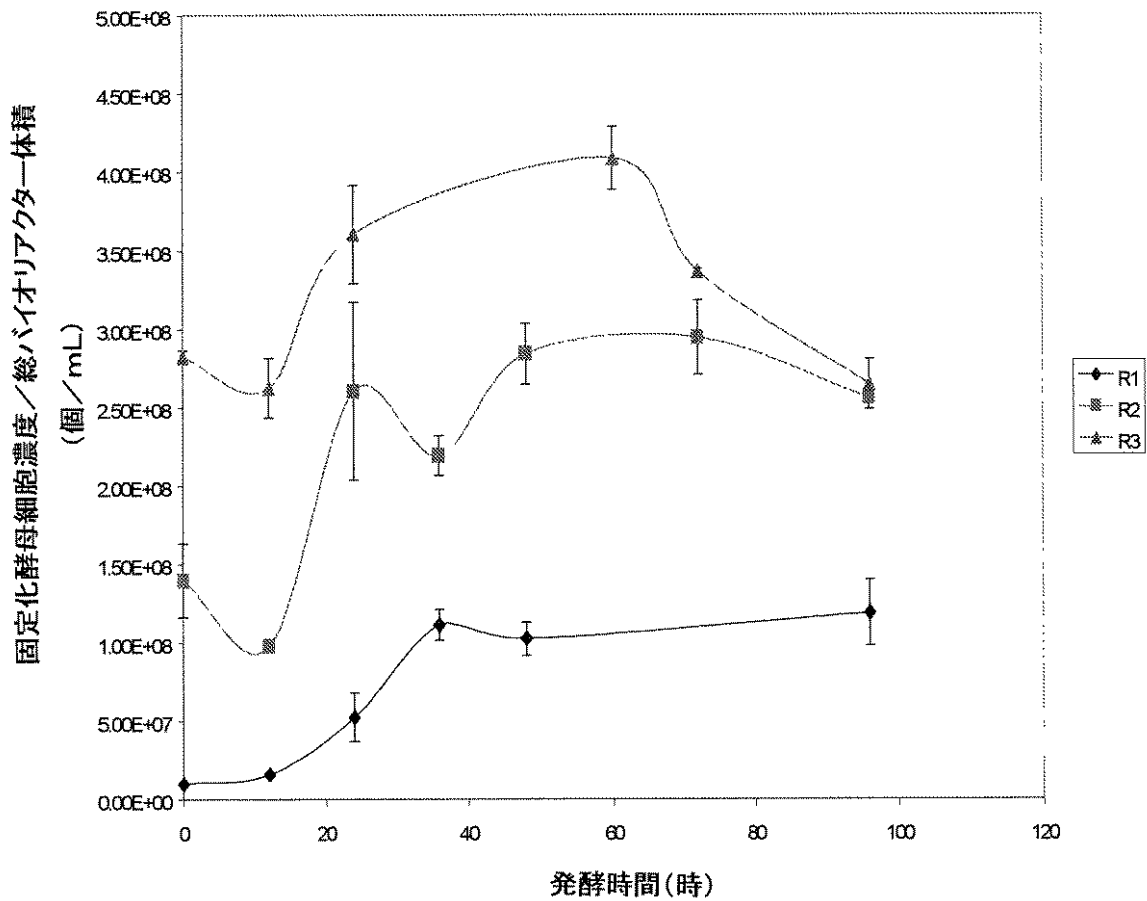


図 6. 7. a) R 1、R 2、および R 3 発酵の発酵時間に対する総バイオリアクター体積あたりの固定化ラガー酵母細胞の平均濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

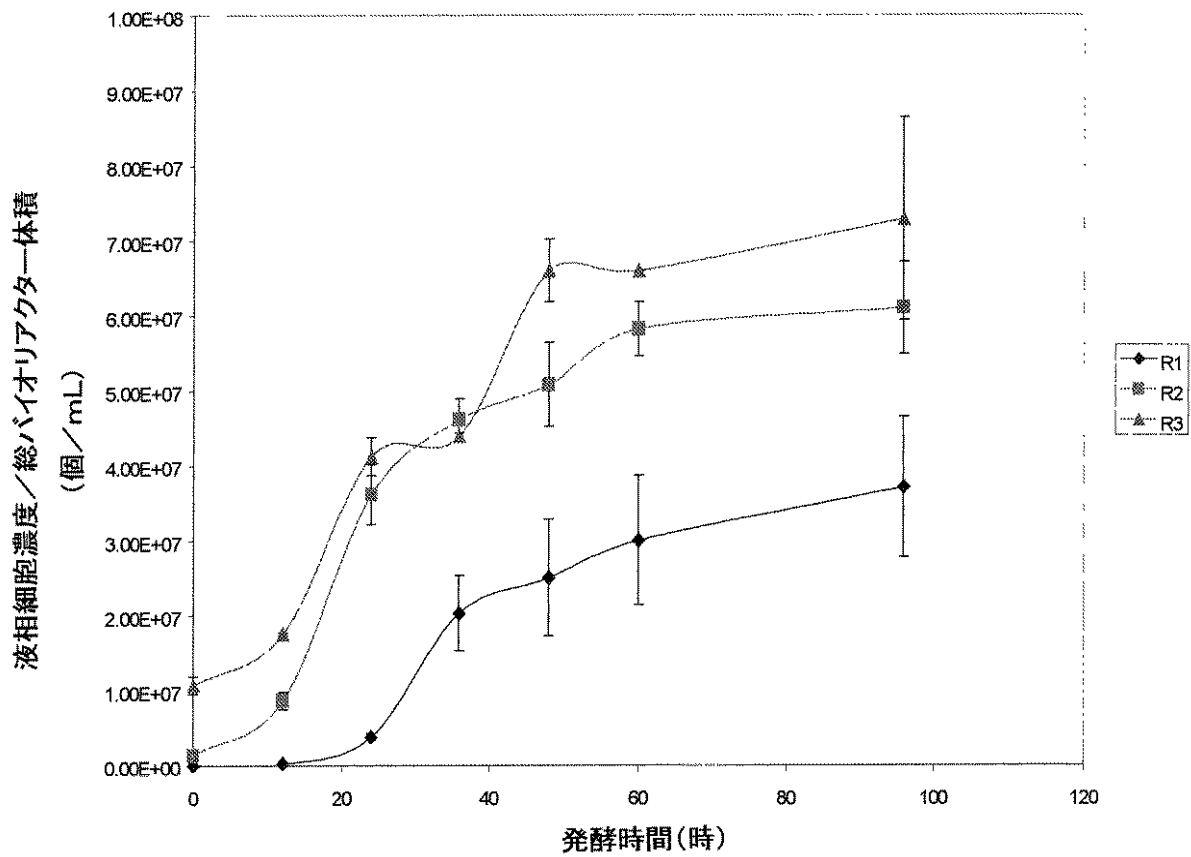
【 0 3 7 3 】

【 表 1 0 3 】

10

20

30



10

20

図 6. 7. b) R 1、R 2、および R 3 発酵の発酵時間に対するバルク液相に放出されたラガー酵母細胞の総バイオリクター体積あたりの濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

【 0 3 7 4 】

【 表 1 0 4 】

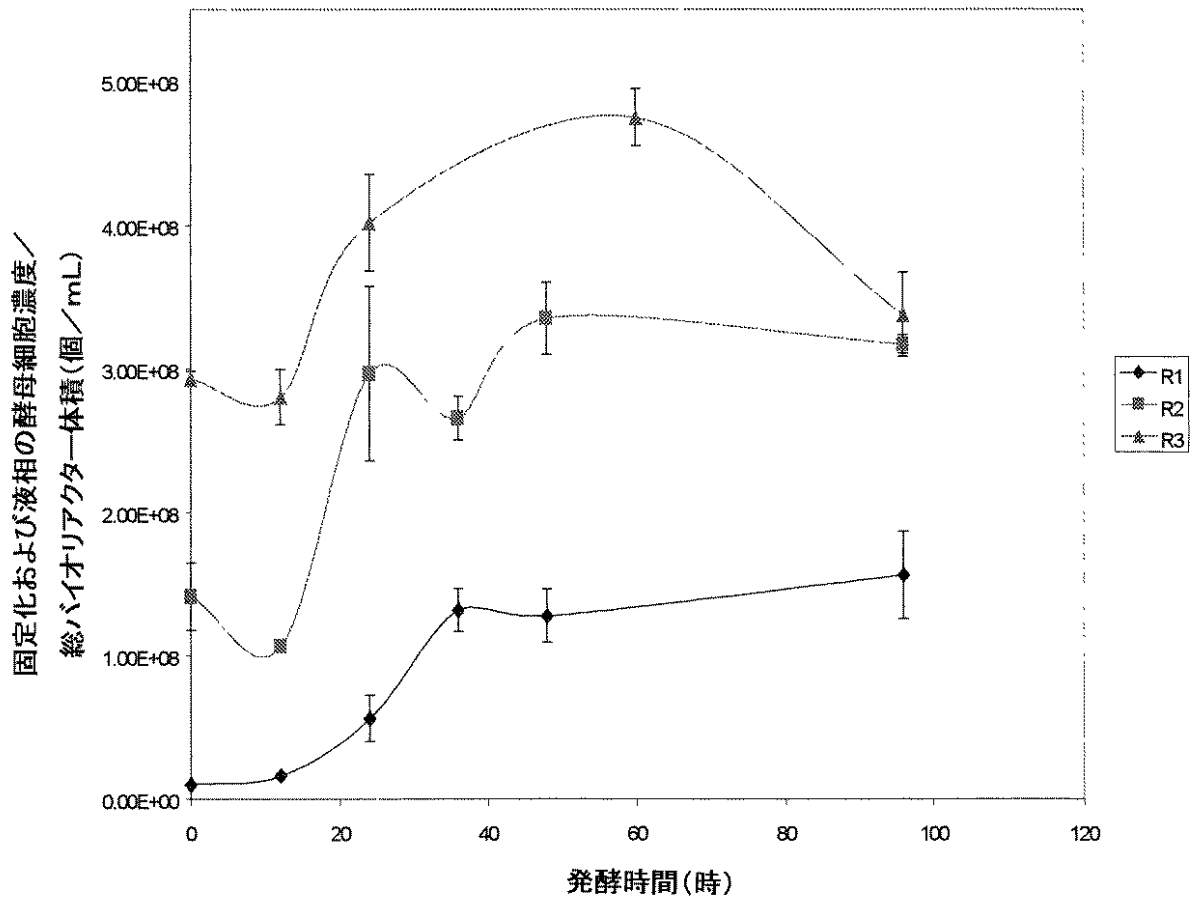


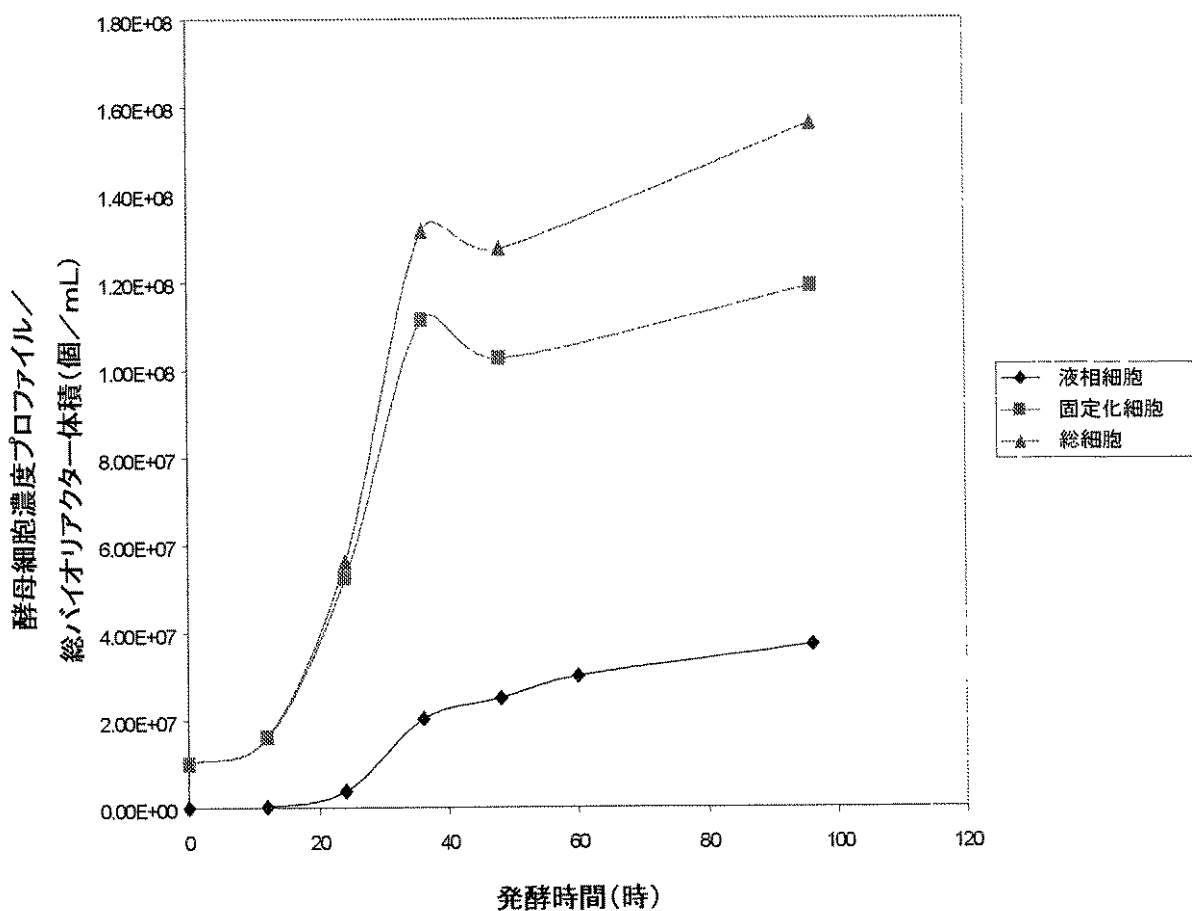
図6. 7. c) R1、R2、およびR3発酵の発酵時間に対する総バイオリアクター体積あたりの総（固定化および液相）ラガー酵母細胞の濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す（ $n = 2$ ）。

【0375】

【表105】

10

20



10

20

図6. 8 R1 (κ-カラギーナンゲルビーズ中に固定化したラガー酵母細胞を使用した3回の反復バッチ発酵の1回目)の発酵時間に対する固定化、液相、および総(固定化および液相)細胞濃度のプロファイル。

【0376】

R1では、κ-カラギーナンゲルビーズ内の固定化細胞濃度は、液相細胞のみを含む対照発酵と類似の速度で増加した。これを、図6. 9の遊離細胞対照発酵の平均増殖曲線と図6. 10のR1におけるカラギーナンに固定された細胞の類似の増殖曲線との比較によって確認した。R1の間、ゲルビーズは依然として完全にコロニー形成しておらず、ゲルマトリックスはビーズ内での酵母細胞増殖に阻害効果と示さないようであった。R2により、この発酵サイクル中の細胞数のより小さな増加によって示されるように、ゲルビーズ内の細胞増殖を制限するようであった。これは、ゲルの性質もしくはビーズ内での酵母細胞の密集または細胞への栄養供給の欠如に起因する可能性があった。

30

【0377】

【表106】

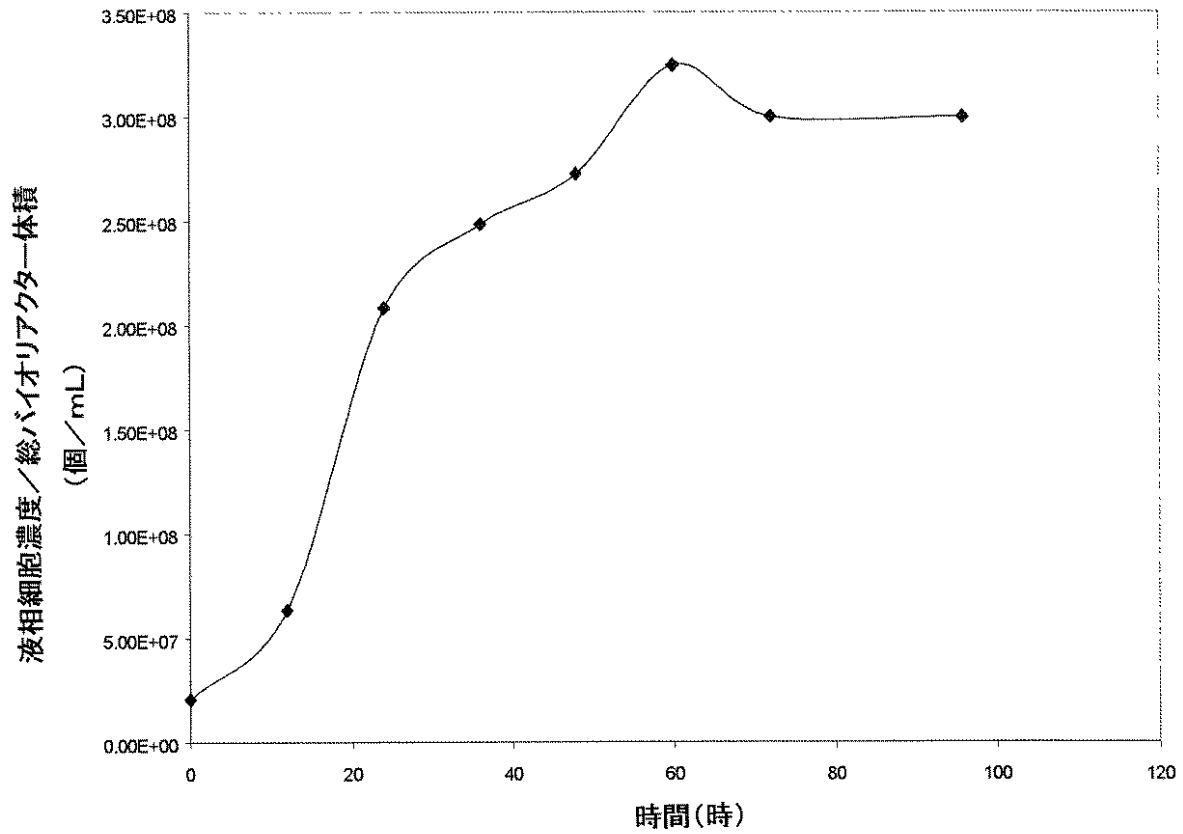


図 6. 9 発酵時間に対する総バイオリアクター体積あたりの対照発酵での自由に懸濁したラガー酵母細胞の平均濃度 (n = 3)。これらの発酵中に固定化細胞は存在しなかった。

【 0 3 7 8 】

【 表 1 0 7 】

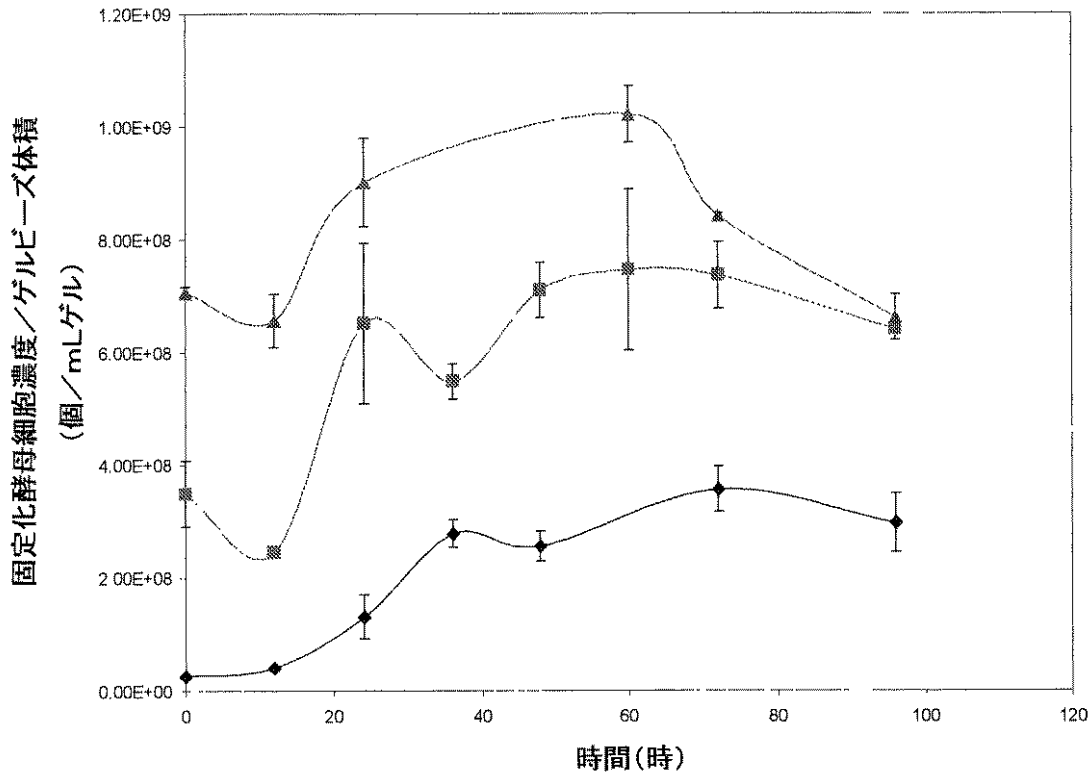


図 6. 10 R 1、R 2、および R 3 発酵の発酵時間に対する 1 m L のゲルビーズあたり

の固定化ラガー酵母濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す ($n = 2$)。

【0379】

表6. 1では、3つのバッチ世代および対照についての基質である発酵可能な糖由来のエタノール収率 ($Y_{p/s}$) を示す。表6. 2では、表6. 1に示すデータを使用して計算したエタノールのバイオリアクター容積生成力も示す。発酵用の糖由来のエタノールの収率は、相互にもあるいは対照とも有意に異ならなかった。収率は全てGuy-Lussac式から予測した理論的収率0.51の90%超であった。前に記載のように、酵母細胞によって形成されたバイオマス生成および他の副産物により、効率の理論値の95%以上に達することが阻止される (Hardwick、1995)。3回の反復バッチ発酵におけるエタノールのバイオリアクターの容積生成力は、バッチと反復バッチとで顕著に異なった。エタノール生成力は、反復バッチ発酵の各サイクルで増加し、R3によって、固定化細胞は対照発酵よりも生成力が高かった。R2で生成されたエタノールの総量は、R1で生成された量よりも有意に多くないが、発酵時間はR1および対照発酵の半分未満であった。発酵条件への酵母細胞の適用および漸増細胞濃度などの各バッチ反復を使用した固定化細胞の発酵速度増加に寄与し得る多数の要因が存在する。バイオリアクター体積あたりの総細胞数のみが、R3による対照の総数よりも有意に高くなる。図6. 7 (b) では、発酵時間に対するバルク液中の自由に懸濁した細胞 (ゲルマトリックスから放出される) の濃度のグラフは、ゲルビーズから放出される細胞数が各バッチ世代毎に増加することを示した。一旦ビーズに酵母細胞がより完全にロードされると、より多数の細胞がバルク液相に放出されるようであった。Huskenら (1996) は、細菌細胞コロニーの拡大および κ -カラギーナンゲルスラブからの発生/放出を試験する研究を行った。Vivesら (1993) は、 κ -カラギーナンゲルビーズ中で達成される酵母細胞の最大濃度は 10^9 個/gゲルであり、これはR2によってゲル粒子内に到達した濃度であることを報告している。パートBでの連続発酵中に類似の最大細胞濃度が認められた。しかし、ゲルマトリックス中の最大細胞ローディングは、最初の細胞ローディング、ゲルの組成、および他の要因に依存する。

10

20

【0380】

【表108. 1】

表6.1 R1、R2、R3、および自由に懸濁した細胞の対照発酵についての生成物 (P) (基質 (グルコース (Glc)、フルクトース (Fr c)、マルトース (Mal)、およびマルトリオース (DP3)) 由来のエタノール) の収率 (Y_{P/S})

バッチ 発酵	t _f [*] (時間)	t ₀	Glc _f (kg/m ³)	Frc _f	Mal _f	DP3 _f	P _f	Glc ₀	Frc ₀	Mal ₀	DP3 ₀	P ₀	Y _{P/S}
R1	64.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	50.1	13.0	3.0	60.0	17.4	0.0	0.5
R2	44.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	49.0	9.7	2.0	54.3	15.7	11.0	0.5
R3	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	54.0	8.9	2.8	52.0	16.0	14.0	0.5
遊離細胞対照	82.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	66.0	19.5	3.6	91.2	27.3	0.0	0.5

* 記号t_fは、完全なマルトース取り込み時間 (時間) であり、下付き文字のfは時間 (t=t_f) での所定の被分析物濃度をいう

表6.2 自由に懸濁した細胞のバッチ発酵と比較した固定化細胞のバッチ発酵 (R1、R2、およびR3) についてのエタノールのバイオリアクター生成力 (V_{Ethanol} = (kg生成エタノール) / (m³バイオリアクター体積×時間))

バッチ 発酵	V _{Ethanol} (kg/m ³ 時間) *
R1	0.470
R2	0.668
R3	1.246
遊離細胞対照	0.805

* マルトース取り込みの完了時に計算

10
20
30
40

【0381】

各反復バッチ発酵で認められたバイオリアクター容積生成力の増加に影響を与える別の要

因には、酵母細胞の適合が含まれる。第1の発酵の終了によって、酵母細胞は、その代謝機構を所定の発酵条件に適合させた。これにより、その後のバッチ発酵の開始時に遅滞期が減少し、発酵速度が増加し得る。この研究中、新たに調製したラガー酵母を使用して全ての対照発酵を行った。細胞濃度効果と比較したこの効果をさらに試験するために、再投入された固定化細胞と同時に自由に懸濁した対照酵母を再投入することは興味深い。

【0382】

図6. 11は、指示薬としてのメチレンブルー法を使用した固定化細胞の生存率は、固定化細胞がR1中の麦汁に最初に投入された時は低い（50%未満）、48時間の発酵後では固定化細胞の生存率は90%超であることを示す。酵母細胞はビーズを急速にコロニー化し、生存率はR3を通して高いままであった。しかし、反復R3によって、発酵終了に向かって生存率はわずかに漸減した。しかし、3回全ての反復バッチ発酵を通して、バルク液体培地に放出された遊離細胞の生存率は、固定化対応物よりも高かった。固定化マトリックスは、酵母細胞の生存率に悪影響を及ぼすか（物質移動制限および／または空間的制限）、生きている酵母細胞を、生きていない細胞よりも固定化マトリックスからバルク液体培地に好ましく放出することができる。

10

【0383】

付録1に含まれる3つの個別の自由に懸濁した酵母細胞の対照発酵由来の平均データを使用して、発酵時間に対する $\ln(X/X_0)$ のプロットを図6. 12に示す。勾配は、150rpmで震盪した醸造者の21°Cの麦汁中の細胞の極大比増殖速度と等しい。酵母の極大比増殖速度は、 0.096時^{-1} であることが見出され、細胞倍增時間は7.22時間であった。理論の節に記載するように、Monod式中で使用した真の $\square_{\text{max}}$ はSがMonod定数 K_s よりも有意に高い場合のみに達成可能であるので、本研究で見出された $\square_{\text{max}}$ を、極大 $\square_{\text{max}}$ と定義した。Monod式によって定義されるように、計算した極大 $\square_{\text{max}}$ が真の極大であることを確認するために、これらの発酵における基質制限のMonod定数（ K_s ）を評価するためのより多くの研究が必要である。

20

【0384】

【表109】

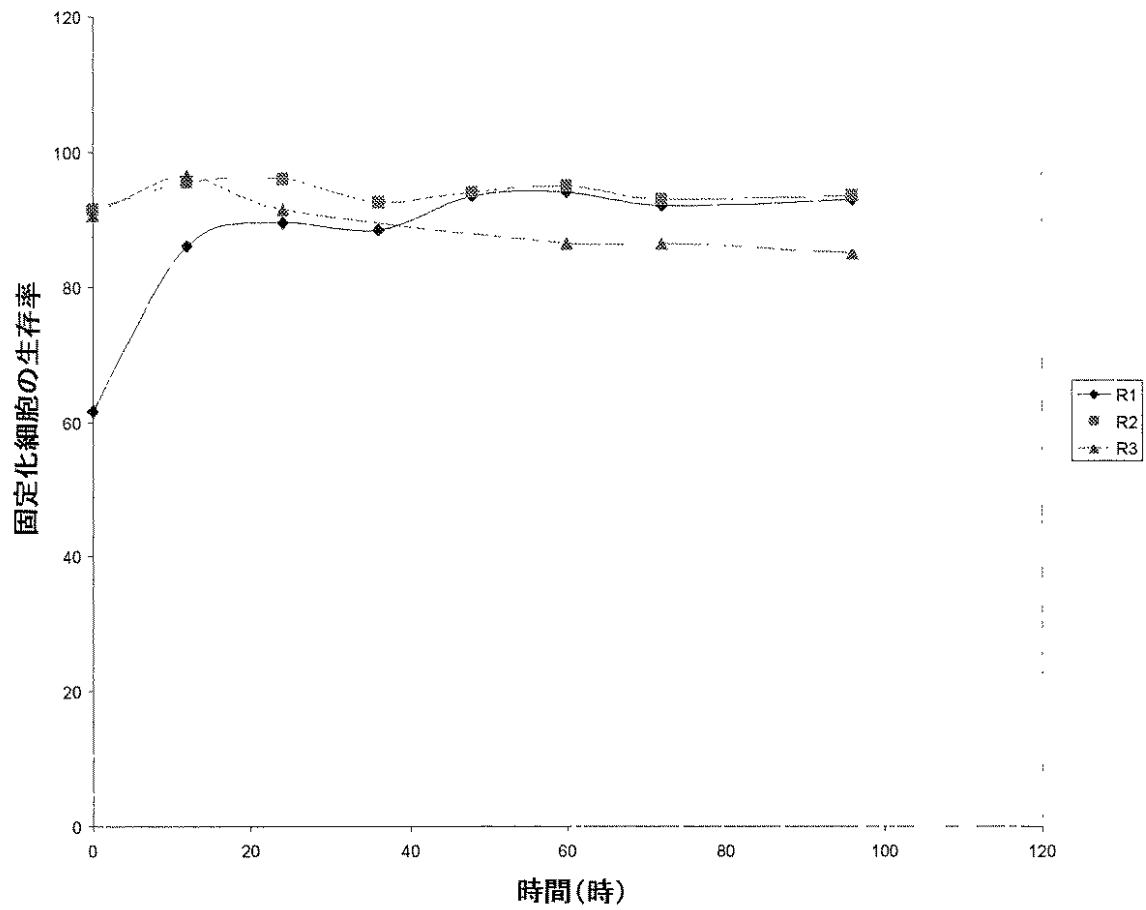


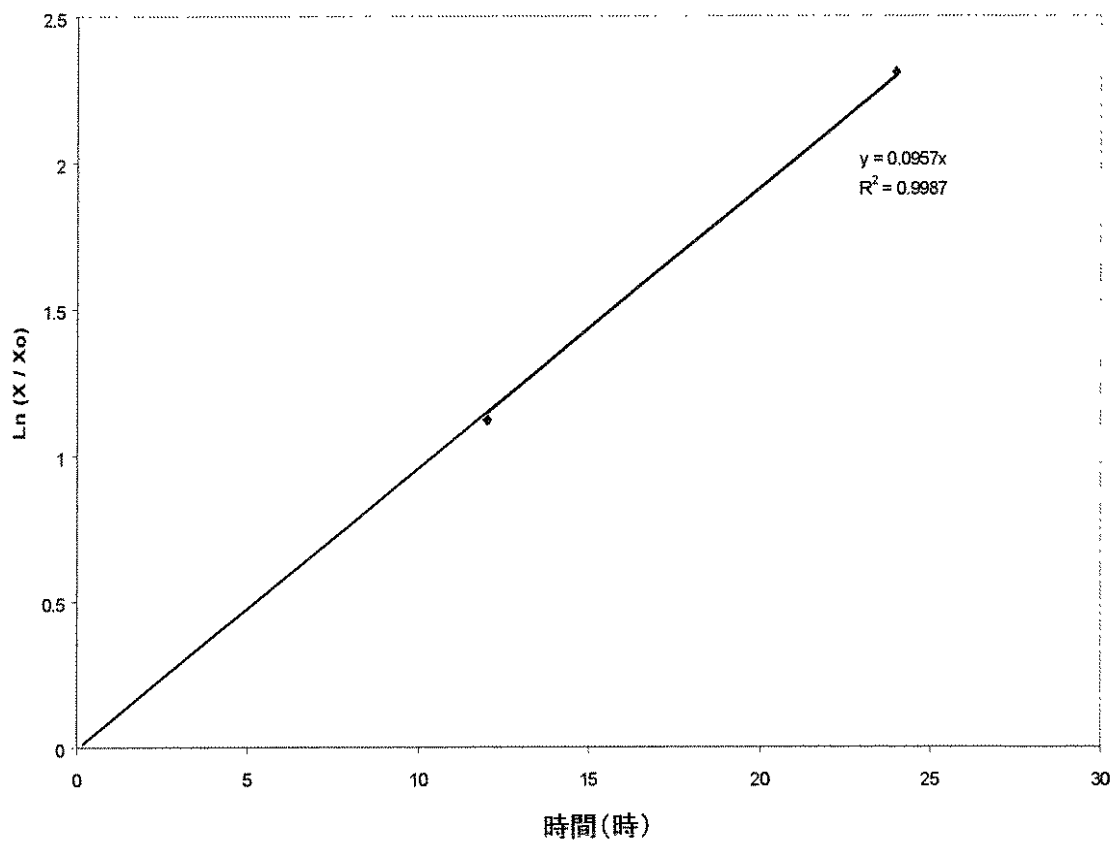
図 6. 1 1 R 1、R 2、および R 3 発酵についての発酵時間に対する固定化ラガー酵母細胞の生存率（メチレンブルー）。

【 0 3 8 5 】

【 表 1 1 0 】

10

20



10

20

図6. 12 平均した自由に懸濁した酵母対照発酵の指数増殖期のバッチ発酵に対する $\ln(X/X_0)$ (式中、 X は時間 t での細胞濃度であり、 X_0 は時間 $t = 0$ での細胞濃度 ($n = 3$))。

【0386】

パートB：長期間発酵における固定化酵母の生存率および形態学的特徴

ゲルビーズを発酵培地に曝露する前且つ静止型混合プロセスを使用した固定化細胞ビーズ生成の後に、細胞濃度は、 2.6×10^7 個/mLゲルビーズであった (表6. 3、値は2サンプルの平均である)。SEM画像は、ゲルビーズ全体に個別且つ均一に分布された細胞を示す (図24)。

【0387】

【表111】

表6.3 発酵時間にわたる自由に懸濁したラガー酵母細胞およびκ-カラギーナンゲルビーズ中に包括された固定化ラガー酵母細胞の生存率 (メチレンブルー) および濃度

時間	発酵様式	液相中に自由に懸濁した酵母		ゲル相に固定化された酵母	
		生存率 (%)	細胞濃度 (個/mL液体)	生存率 (%)	細胞濃度 (個/mLゲル)
0	n/a	n/a	n/a	n/a	$2.6E+07$
2日間	バッチ	98	$5.5E+07$	92	$2.35E+08$
2ヶ月間	連続	93	$2.35E+08$	76	$8.60E+08$
6ヶ月間	連続	92	$2.11E+08$	< 50*	$1.40E+09^*$

* 1サンプルを基本とする。

【0388】

バッチ発酵の2日後の生存率は90%超であり、ゲルビーズ内の細胞濃度は、10倍に増加した (表6. 3)。細胞 (生存率90%超) もまたゲルから発酵のバルク液相に放出され始めて

30

40

50

、 10^7 個/mL液体の濃度となった。ゲルビーズ内部に小さな酵母コロニーが形成され、図25に示すように各細胞上に多数の出芽痕が存在する。

【0389】

固定化酵母細胞の生存率は、ガスリフトバイオリアクターでの連続発酵の2ヵ月後に減少したが（表6. 3）、バルク液相中の細胞の生存率は高いままであり（90%超）、この所見はパイロットスケールガスリフトバイオリアクターでのいくつかの異なる連続発酵において支持された。図26でのSEMは、2ヶ月でビーズ周囲に大型の酵母のコロニーが形成され、他の研究者の結果が確認されたことを示した（Bancel and Hu、1996；Godiaら、1987；Wadaら、1979；Wangら、1982）。SEM画像化を使用したいくつかのサンプルにおいて、固体化細胞ビーズの外縁に向かって位置付けられた酵母の形態学とゲルビーズの中心に位置付けられた酵母のそれとの比較を行った。ビーズ周囲に向かって位置付けられた細胞は卵型で滑らかであり、酵母の増殖を示す多数の出芽痕を有する（図27）（Smart、1995）。ビーズの中心に画像化された細胞（図28）は奇形であり、出芽痕形成の証拠をほとんど示さなかった。出芽痕の欠如は、ビーズ中心での酸素などの栄養素の制限される可能性があることを示し得る。図28での酵母表面上に不規則に認められる表面はまた、細胞加齢の指標であり得る（Barker and Smart、1996；Smart、1999）。

10

【0390】

カラギーナンゲル内に固定化された酵母の生存率は、ガスリフトバイオリアクターでの連続発酵の6ヵ月後に50%未満に減少した（表6. 3）。固定化細胞の濃度および生存率についてのデータポイントは6ヶ月で1つしか収集されておらず、5ヶ月の時点でのデータは、固定化細胞濃度（ 1.14×10^9 個/mLゲル）および生存率（50%未満）と類似していることに留意すべきである。長期にわたり固定化細胞生存率の段階的現象が認められ、バルク液相での細胞の生存率は相対的に高いままであった。さらに、ビーズ中での固定化細胞生存率が全体として低い場合でさえ、バイオリアクターは6ヶ月の連続操作の間完全に発酵されたビールを製造した。この所見についての可能な理由には、生存率が高く自由に懸濁した酵母細胞の発酵への有意な寄与が含まれる。同様に、ビーズの中心に位置付けられた細胞と比較して、物質移動の障壁がより少ないゲルビーズ周囲に位置付けられた生きている固定化細胞の潜在的な寄与が存在する。固定化細胞自体がゲルマトリックス内に再分配される能力を有するか、またはこれらの細胞が最初に位置付けられた場所で静止したままであるのかどうかは不明である。6ヶ月の連続発酵期間でこれらのビーズ内で達成された最大の濃度は、 10^9 個/mLゲルビーズであった。

20

30

【0391】

図29では、全ビーズをSEMを使用して画像化した。このビーズは、試験した多数のビーズ（約半分がこの構造を示した）で中空構造である。中空の空洞は、カラギーナンゲル構造の破壊の結果であり、SEM調製によってさらに進行し得る。この中空の空洞は、新鮮なビーズ調製物では認められなかった。他の者（Bancelら、1996）による以前の研究では、増殖細胞によりゲル網目構造の脆弱化が誘導されることが示された。Audetら（1988）は、 κ -カラギーナンへのローカストビーン（locust bean）の添加により細菌固定化に対するゲルビーズの機械的強度が改変することを報告した。

【0392】

全6ヶ月にわたるビール発酵実験において、ガスリフトバイオリアクターを最低1週間に1回汚染について試験した。実験中のいかなる時にも細菌汚染は検出されなかった。試験の最後の2ヶ月間で、 1cfu/mL と 5cfu/mL との間で濃度が変動する酵母の汚染が検出された。この酵母は、 37°C のPYN培地で増殖することができるが、DUBA培地（細菌選択性）上では好気性でも嫌気性でも増殖せず、デキストリンを発酵せず、 CuSO_4 培地（野生型酵母選択性）で増殖しなかった。

40

【0393】

5ヵ月後、呼吸欠損酵母細胞の平均割合は7%であり、これは産業用バッチ発酵でこの株を使用して通常見出される平均割合（平均2%）よりも高かった。他の研究者も類似の所見を報告している（Norton and D'Amore、1995）。呼吸欠損酵母は、酵母が呼吸してグルコ

50

ースを二酸化炭素と水にすることができない変異に起因する。これらの酵母は、浸透活性が損なわれたミトコンドリアを有し、これは通常ミトコンドリアDNAの変異に起因して起こる (Hardwick, 1995)。

【0394】

SEMサンプル調製物由来の人工物は混乱をもたらし得る。核磁気共鳴 (NMR) 分光法 (Fernandez, 1996) および共焦点顕微鏡法 (Bancel and Hu, 1996) などの技術を使用して、固定化細胞が非侵襲性であるかを試験した。NMR画像技術により、研究者は、バイオフィルム中の細胞および生化学物質の輸送、流れ、および空間的分布を研究可能であった。研究者 (Bancel and Hu, 1996) はまた、共焦点レーザー操作顕微鏡法を使用して、一連の光学的セクション化によって多孔質ゼラチンマイクロキャリア中に固定化された細胞を観察

10

【0395】

醸造業で細胞生存率の標準的な指示薬としてメチレンブルーが使用されているにもかかわらず、この方法は多くの欠点を有する (Mochabaら, 1998)。これは、生存細胞の色素を無色の形態に酸化する能力に基づいて酵母集団が生存または非生存であるかどうかを測定する。非生存細胞は色素を酸化する能力を欠くので、青色のままである (O'Connor-Coxら, 1997)。プレート数およびスライド培養技術は、細胞が増殖して寒天プレート上に大型コロニーを産生するか顕微鏡スライドに被覆した培地上に微小コロニーを産生する能力に基づく (ABSCの技術委員会および編集委員会, 1992)。ラバットでの長期間にわたって固定化マトリックス中の酵母の生存率を試験する進行中の研究は、現在、メチレンブルーだけでなく、上記の方法および生体染色を使用して開発された共焦点顕微鏡技術も使用している。細胞の生存率の測定に加えて、固定化細胞の「生存率」の問題はまた、さらなる研究で取り組まなければならない。生存率を使用して細胞が増殖および繁殖する能力が説明される場合、生存率により酵母の発酵品質、活性、または酵母がストレスから回復する能力が測定される (Smartら, 1999)。

20

【0396】

第7章 ガスリフト連続ビール発酵系での風味の生成

7. 1 実験手順

ビールを製造するための連続発酵の使用は、得られた製品をエタノールなどの目的の1成分に関して測定されないので、固定化細胞を使用した他の適用と非常に異なる。むしろ、品質完成品を作製するためにバランスを取るべき多数の化合物のバランスである。連続主発酵および二次バッチ保持期間の間の酵母風味代謝産物に対する酸素の効果を試験した。風味代謝産物に対する滞留時間の効果も2つのレベルで試験した。最後に、 α -アセトラクテートデカルボキシラーゼの市販の酵素調製物を、連続発酵麦汁供給物に添加し、液相の総ダイアセチル濃度をモニターした。

30

【0397】

7. 1. 1 連続主発酵における酵母代謝産物に対するバイオリアクター流動化ガス中の相対空気量の影響

バイオリアクター流動化ガス中の空気 (つまり酸素) の量が変化する一方で、滞留時間、温度、および他の全ての制御可能なプロセスの変数は一定に保たれた。ガスの総体積流速はSTPで72mL/分で一定に保持され、温度は15°Cであり、固定化LCC3021酵母を含む κ -カラギーナンゲルビーズを、試験を通して 1×10^8 個/mLゲルの初期細胞ローディングで使用した。試験を通して4つの異なる空気の体積流速を系に与え (表7. 1)、平均バイオリアクターの滞留時間 (R_t) は1.18日であった。

40

【0398】

【表112】

表7.1 連続発酵中にスパージャーによってバイオリアクターに供給された空気の体積流速。バイオリアクターに供給された総体積流速はSTPで472mL/分であり、二酸化炭素は残りのガスを構成していた。

空気の体積流速 (mL/min)	流動化ガス中の空気 % (% v/v)	開始 (日)	終了 (日)	総時間 (日)
94	19.9	10	26	17
354	75.0	27	40	14
34	7.2	41	58	18
0	0	59	66	8

10

【0399】

実験を通して以下の分析を繰り返し行った：遊離アミノ窒素（FAN）、総発酵性炭化水素（グルコースとして）、エタノール、総ダイアセチル、ビール揮発性成分（選択されたエステルおよびアルコール）、ならびに液相酵母細胞濃度および生存率。最低1週間に1回バイオリアクターを汚染についても試験した。

【0400】

連続発酵が空気の各体積流速について偽定常状態と予想される場合、バイオリアクターのバルク液相中の溶存酸素濃度を測定した（最低3回のリアクター回転時間）。

【0401】

7. 1. 2 発酵バッチ保持期間後：酵母代謝産物に対する酸素曝露効果

20

バイオリアクターの流動化ガス中の酸素量が比較的少ない場合（STPで34mL/分）、第7. 1. 2節で行った実験で見出されたアセトアルデヒドおよび総ダイアセチル濃度は、北米ラガービール市場で許容されないほど高かった。したがって、これら2つの化合物の濃度を減少させるために温度を21°Cにわずかに上昇させた48時間のバッチで連続主発酵バイオリアクターから採取した液体を保持する新規のアプローチを採用した。同様に、前の第7. 1. 2節由来の結果は、流動化ガス中の空気の量は測定した風味化合物に対して有意な結果を有することを示した。したがって、第2のバッチ保持を行う場合、主発酵の下流の嫌気性条件に対する好気性条件の酵母風味代謝物に対する効果を試験した。

【0402】

研究のサンプル体積要件が8Lのバイオリアクター体積と比較して非常に大きいので、この試験のためのLCC3021酵母株の高度に綿状の変異体を使用した50Lのガスリフトバイオリアクターで連続主発酵を行った。開始条件は、流動化ガス中のSTPでの1180mL/分のCO₂および189mL/分の空気、1日の平均バイオリアクター滞留時間（R_t）、温度15°C、ならびに高比重（17.5⁰P）ラガー醸造麦汁であった。

30

【0403】

合計4サンプルを取り（100mLのクリンプバイアル）、そのうちの2つは嫌気性条件下で操作し、他の2つは好気性環境に曝露した。

【0404】

嫌気性サンプリング手順は以下のものであった：2つの100mLクリンプバイアルおよび6つの25mLクリンプバイアルをオートクレーブし、嫌気性ボックス（Labmaster100、mbram、USA）にパージングガスとしてアルゴンを封入した。100mLのバイアルを45分間平衡化し、これらをアルミニウムキャップおよびTeflon（登録商標）隔壁を使用して密封した。70%（v/v）エタノール溶液を使用して滅菌した3インチで16ゲージのニードルを取り付けた50mLのシリンジを使用して、サンプル弁の膜の隔壁の穿刺によってバイオリアクターからサンプルを採取し、サンプルを100mLの予備パージング嫌気性バイアルに注入した。さらなる滅菌シリンジニードルによって充填中のバイアル内の圧力を放出させるためにクリンプバイアルに通気口をあける必要があった。シリンジおよびニードルを使用しないで膜サンプルバイアルの完全な開口によってバイオリアクターから100mL非密封サンプルバイアルに排出された場合に、嫌気性サンプルは空気に曝露された。

40

【0405】

50

溶液中に酵母を沈殿させてバルク液中の細胞濃度を約 10^6 個/mLとするために、サンプル液を室温で2時間静置させた。一旦沈殿すると、各100mLバイアル由来の液体を、3つの25mLバイアルにデカントした。採取される酸素を最小にするために嫌気性ボックス中で嫌気性サンプルを操作する一方で、好気性サンプルを層流フード下で処理した。サンプル取り出しによる発酵の方向を変えことなくサンプル分析を行うことができるように、100mLバイアル中の各サンプルをより小さな3つの25mLバイアルに分注した。一旦好気性サンプルが小さなバイアルに移されると、21°Cでインキュベートして蓋を外した。嫌気性サンプルをより小さな3つのバイアルに移し、アルミニウムキャップおよびTeflon（登録商標）隔壁を使用して密封した。バイアル内の二酸化炭素の発生による圧力増加を回避する一方でサンプルの好気性の外部環境への曝露を回避するために、隔壁をニードルで穿刺した。外部環境に曝露されたニードルの末端をエタノール中に浸漬し（1cm未満の圧力ヘッド）、サンプルへのいかなる空気の逆流も防止した。2、24、および48時間後に分析のためにサンプルを回収した。また、サンプルをバイオリアクターから直接に採取し、その直後にプロトコール時のバイオリアクター内の発酵状態を評価するために分析した。発酵性炭水化物（グルコースとして）、エタノール、総ダイアセチル、およびビール揮発性成分（選択されたエステルおよびアルコール）についてサンプルを分析した。

【0406】

7. 1. 3 連続ビール主発酵における酵母代謝産物に対する液体滞留時間の効果
酵母代謝産物活性に対する液体滞留時間の効果を試験するために、 κ -カラギーナンゲルビーズ中に固定化したLCC3021酵母細胞を使用した連続ビール主発酵中にバイオリアクターに対する麦汁の体積流速を変化させる実験を行った。バイオリアクター温度を、試験を通して17°Cに一定に保持した。バイオリアクターに供給されたガス体積流速もまた、STPで472mL/分で一定であった。ガスは、空気（STPで11mL/分）と二酸化炭素（STPで461mL/分）との混合物であった。 κ -カラギーナンゲル中の酵母細胞の初期濃度は 2.6×10^7 個/mLゲルビーズであり、バイオリアクターは40%（v/v）のビーズを含んでいた。

【0407】

試験を通して以下の分析を繰り返し行った：炭水化物、遊離アミノ窒素（FAN）、総発酵性炭化水素（グルコースとして）、エタノール、総ダイアセチル、ビール揮発性成分（選択されたエステルおよびアルコール）、ならびに液相酵母細胞濃度および生存率。最低1週間に1回バイオリアクターを汚染についても試験した。

【0408】

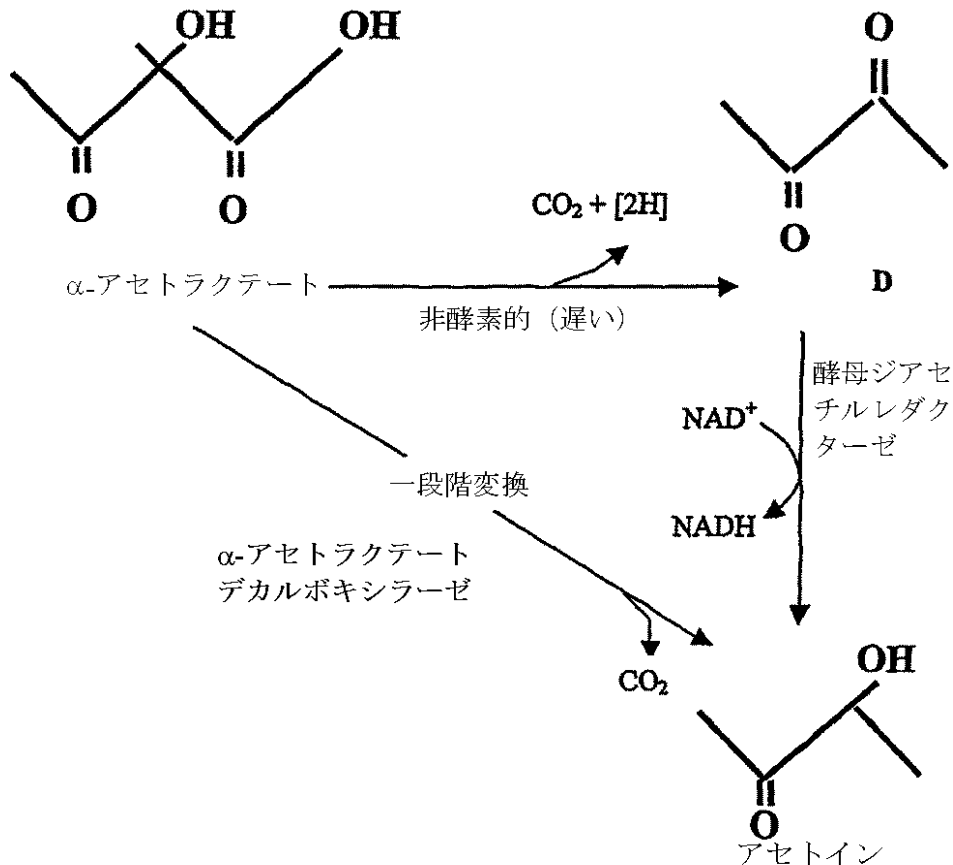
7. 1. 4 連続ビール主発酵における総ダイアセチルを還元するための α -アセトラクテートデカルボキシラーゼの市販の調製物の使用
高ダイアセチル濃度は、ほとんどの北米醸造者でビールにおいて望ましくない風味の欠点と考誤差れている。現在行われている連続主発酵では、総ダイアセチル濃度は、北米ラガーでの伝統的なバッチ発酵の閾値レベル（70~150 $\mu\text{g/L}$ ）を一貫して上回っている。バッチ発酵中では、酸素がもはや存在せず、且つさらなる糖が導入されない場合、ダイアセチルは発酵後期中に還元される。連続発酵系では、スパージャーによって一定の低レベルの酸素をバイオリアクターに供給し、新鮮な麦汁をバイオリアクターに連続的に供給する。したがって、連続バイオリアクター中でのダイアセチル濃度を制御するための市販の酵素調製物を使用した新規のストラテジーを調査した。

【0409】

麦汁発酵では、 α -アセトラクテート（バリン合成における中間体）が酵母細胞の外側で酸化的に脱炭酸された場合に、ダイアセチルが形成される。次いで、酵母細胞がダイアセチルを再吸収し、これを風味の少ない活性アセトインに変換する。 α -アセトラクテートのダイアセチルへのこの酸化的脱炭酸反応は、バッチ麦汁発酵における律速段階である。連続発酵中に、許容不可能な高濃度（300~400 $\mu\text{g/L}$ ）の総ダイアセチルがバイオリアクターから排出された。Novo-Nordisk A/Sの市販の α -アセトラクテートデカルボキシラーゼ（ALDC）は、 α -アセトラクテートをアセトインに直接変換することができるので、望ましくないダイアセチル中間体を回避することができる（図7. 1）（Jepsen、1993）。

【0410】

【表113】



10

20

図7.1 α-アセトラクテートデカルボキシラーゼ (ALDC) の作用

【0411】

α-アセトラクテートデカルボキシラーゼを、総ダイアセチル濃度に対するその正味の効果を試験するために、バイオリアクターに供給した麦汁に添加した。発酵から48時間後のバッチ加温保持期間および固定化した二次発酵系を含む他のダイアセチル還元ストラテジー (Alpha-Lavalのテクノロジー) (Anon、1997) もまた調査した。これらの他のストラテジーの両方は、発酵後のダイアセチルレベルの減少において成功しているが、供給源 (すなわち、バイオリアクターの排出口) でのダイアセチルレベルについて取り組んでいない。バイオリアクターから得られたダイアセチル濃度を減少させるための麦汁中のALDCの使用によって、発酵処理期間後を最小にするか消滅させることができる。

30

【0412】

10℃のラガー麦汁中でのALDC活性はpH6.0が最適である。pH5.0 (工業用麦汁の典型) では、ALDC活性は、35℃で最大である (Anon、1994)。したがって、温度およびpHの低い典型的なビール発酵条件下では、ALDC活性は最適未満である。

【0413】

カナダ保健省は、1997年にカナダ食品医薬品規則 (SOR/97-81) を、アルコール飲料中でのALDCの使用を認める改正を行い、これはカナダ醸造所でのその使用に門戸を開いた。Bacillus brevis由来のALDC (E.C.4.1.1.5) をコードする遺伝子を保有するBacillus subtilisは、酵素ALDCを産生する。ALDCが遺伝子改変生物 (GMO) によって産生される酵素であるので、このような酵素を市販用製品で使用する前に取り組む必要がある公的認識問題が存在する。

40

【0414】

ラガー酵母 (LCC3021) をこれらの実験で使用した。高比重 (17.5⁰P) のラガー醸造者の麦汁がラバットロンドン醸造所から提供された。エタノール、総発酵性炭水化物 (グルコースとして)、総ダイアセチル、および液相細胞濃度をモニターした。第4章に記載のよ

50

うに、酵母細胞を κ -カラギーナンゲルビーズで固定した。バイオリアクターを、偽定常状態に達したと予想される前に3回回転させた。前述のように、本研究で使用したダイアセチル法はダイアセチルおよびその前駆体 (α -アセトラクテート) の量を測定するので、これを「総ダイアセチル」という。したがって、この実験中で認められた総ダイアセチルの還元は、 α -アセトラクテートのアセトインへの直接変換とその後のその誘導体 (ダイアセチル) 濃度の低下との組み合わせ効果に起因する。

【0415】

α -アセトラクテートデカルボキシラーゼ (ALDC) は、Maturex (登録商標) LとしてNovo Nordisk A/Sからの研究目的で寛大に贈与された。酵素活性は、1500ADU/g (Novo Nordisk法AF27 (Anon, 1994) に記載のように、ADUは標準的条件下で α -アセトラクテートの脱炭酸反応によって1分あたり1 μ モルのアセトインを産生する酵素量である) であった。

10

【0416】

連続発酵条件：固定化ラガー酵母細胞を含む κ -カラギーナンゲルビーズを40% (v/v) で投入した8Lのガスリフトドラフト管バイオリアクターで連続発酵を行った。バイオリアクターを、二酸化炭素 (STPで438mL/分) と空気 (STPで34mL/分) との混合物でスパージした。試験を通して発酵温度を15°Cに制御し、バイオリアクター滞留時間 (R_t) は1.5日間であった。これらの条件下で総ダイアセチル濃度をモニターし、平均偽定常状態の対照ダイアセチル濃度に達した。次いで、ALDCを72 μ g/L (108ADU/L) の濃度で麦汁に添加し、反応についてバイオリアクター中の総ダイアセチル濃度をモニターした。

【0417】

20

実験1：麦汁を醸造所から20Lのステンレススチール製容器に採取し、オートクレーブにて100°Cに45分間加熱した。麦汁を温度制御水浴中で2°Cに保持しながらバイオリアクターに供給した。一旦バイオリアクター内で総ダイアセチル濃度が偽定常状態に達すると、72 μ g/L (108ADU/L) のALDCを20Lの容器内の麦汁に添加した。 κ -カラギーナンゲルビーズ中の初期バイオマスローディングは、 3×10^7 個/mLゲルであった。

【0418】

実験2：汚染リスクを最小化するために、系は排出口で閉じたループであり、第4章に記載のように系の他の性能も向上させた。実験1と同様に、麦汁を醸造所から20Lのステンレススチール製容器に採取し、100°Cで45分間オートクレーブした。バイオリアクターに供給しながら、麦汁を温度制御水浴中で2°Cに保持した。 κ -カラギーナンゲルビーズ中の初期バイオマスローディングは、 3×10^7 個/mLゲルであった。一旦バイオリアクター内で総ダイアセチル濃度が偽定常状態に達すると、72 μ g/L (108ADU/L) のALDCを20Lの容器内の麦汁に添加した。

30

【0419】

実験3：酸素を生成しない17.5⁰Pの醸造所麦汁 (14hL) を、パイロットプラント中の大型麦汁保存容器 (T-1) に採取した。次いで、第5章に記載のように、これを瞬間殺菌し、溶存酸素濃度を0.10mg/L未満に維持するために二酸化炭素スパージを使用して保存した。総ダイアセチル濃度が偽定常状態に達するまで、麦汁をこのタンクからバイオリアクターに供給した。次いで、ALDC (72 μ g/L) を、残りの試験用の麦汁に無菌的に添加した。保存容器に残存する麦汁の量の測定および酵素を標的濃度 (72 μ g/L (108ADU/L)) にするために必要なALDC量の計算によってALDCを添加した。次いで、適量の酵素を10Lの滅菌麦汁に溶解した。この溶液を、滅菌配管を介して麦汁保持容器 (T-1) 上のサンプルポートに接続した20Lのステンレススチール製の容器に移した。次いで、ALDC溶液を、滅菌二酸化炭素圧を使用して麦汁保持容器に押し込んだ。ALDC溶液が保持容器中の麦汁と適切に混合されたことを確認するために、タンクにスパージされた二酸化炭素の流速を、STPで4720mL/分を1時間に増加させて、その正常な流速に戻した。次いで、保存タンクを、ALDCを添加した麦汁が試験を完了するために十分に保持した。 κ -カラギーナンゲルビーズ中の初期バイオマスローディングは、 10^8 個/mLゲルであった。

40

【0420】

7. 2 結果と考察

50

7. 2. 1 連続主発酵における酵母代謝産物に対するバイオリアクターの流動化ガス中の空気の相対量の効果

図7. 2～7. 11では、液相酵母の生存率および細胞濃度、遊離アミノ窒素（FAN）、総発酵性炭水化物（グルコースとして）、エタノール、総ダイアセチル、アセトアルデヒド、酢酸エチル、1-プロパノール、イソブタノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、ヘキサン酸エチル、およびオクタン酸エチルの濃度を、連続発酵時間に対してプロットする。バイオリアクターのスパーキングガスの割合を図に直接記すこと以外は、プロトコールを通して全てのバイオリアクターの操作条件を一定に保持した。表7. 2では、偽定常状態（少なくとも3回分のリアクターターンオーバー時間後）での各分析についての平均をまとめる。

10

【0421】

表7.2 液層酵母および重要な酵母代謝産物濃度に対するバイオリアクターの滞留時間（ R_t ）1.18日のスパージャーによるバイオリアクターへの空気の体積流速効果ならびに偽定常状態の平均の総括表

平均*被分析物濃度	空気の体積流速（mL／分）		
	94	354	34
細胞濃度（個／mL）	3.87E+08	2.98E+08	4.73E+08
総発酵グルコース（g/100mL）	1.36	1.25	2.07
FAN（mg/L）	196.9	171.7	162.8
エタノール（g/100mL）	6.14	5.46	5.74
総ダイアセチル（μg/L）	346	1417	389
アセトアルデヒド（mg/L）	75.62	329.48	28.63
酢酸エチル（mg/L）	22.38	21.13	18.01
1-プロパノール（mg/L）	44.74	50.89	53.04
イソブタノール（mg/L）	8.73	16.09	8.05
酢酸イソアミル（mg/L）	0.38	0.21	0.30
イソアミルアルコール（mg/L）	58.62	61.64	59.16
ヘキサン酸エチル（mg/L）	0.060	0.030	0.053
オクタン酸エチル（mg/L）	0.031	0.013	0.025

20

* 各操作条件の最終4日間の平均

30

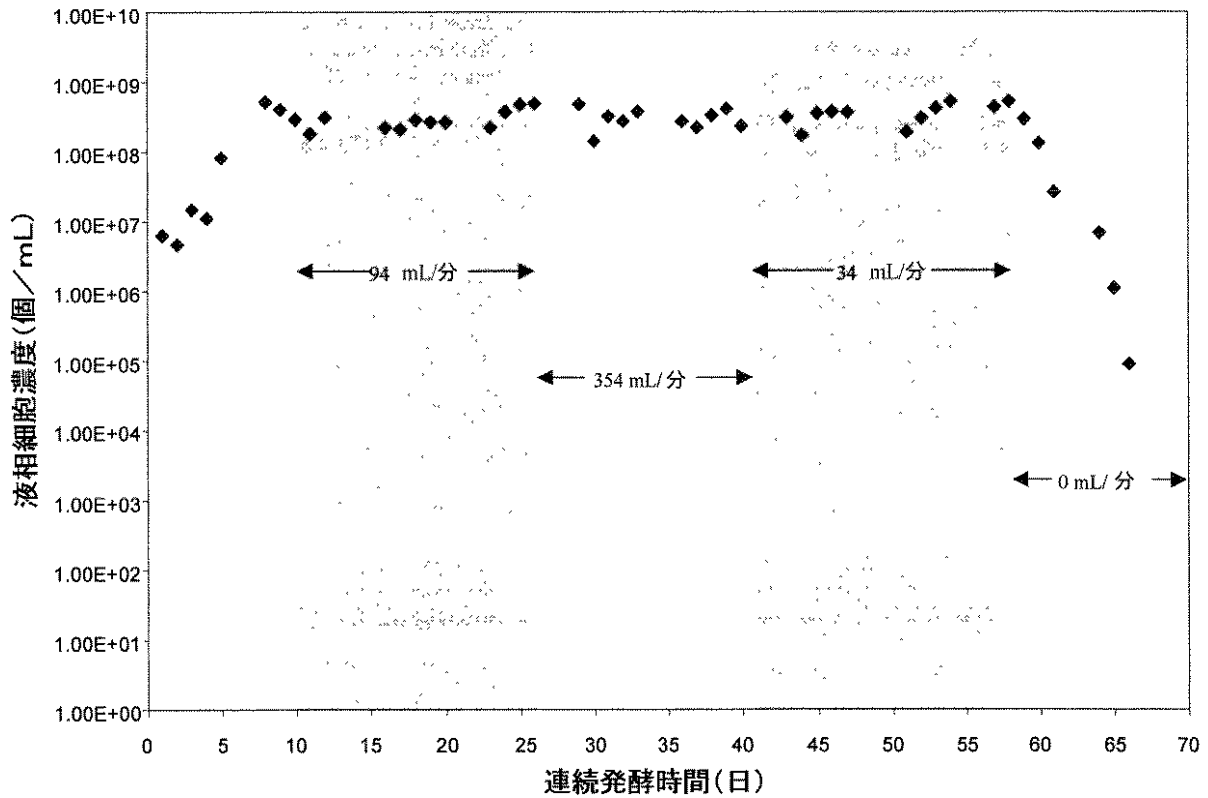
【0422】

図7. 2および7. 3は、液相酵母集団が本実験でゼロに達しなかったことを示す。本研究で研究した風味化合物を遊離および固定化酵母細胞との組み合わせによって生成し、各供給源由来の相対的寄与は決定されなかった。本研究では以下の1つを超える遊離懸濁酵母細胞の供給源が存在する：バイオマスの増殖およびゲルビーズから液相培地に放出された細胞。細胞の放出および増殖の化合物モデル使用した研究により、細胞がバイオフィームから放出される場合、バイオリアクターが高希釈率で操作された場合でさえも依然として排出液中に細胞集団が存在することが示された（Karamanev、1991）。

40

【0423】

【表114】



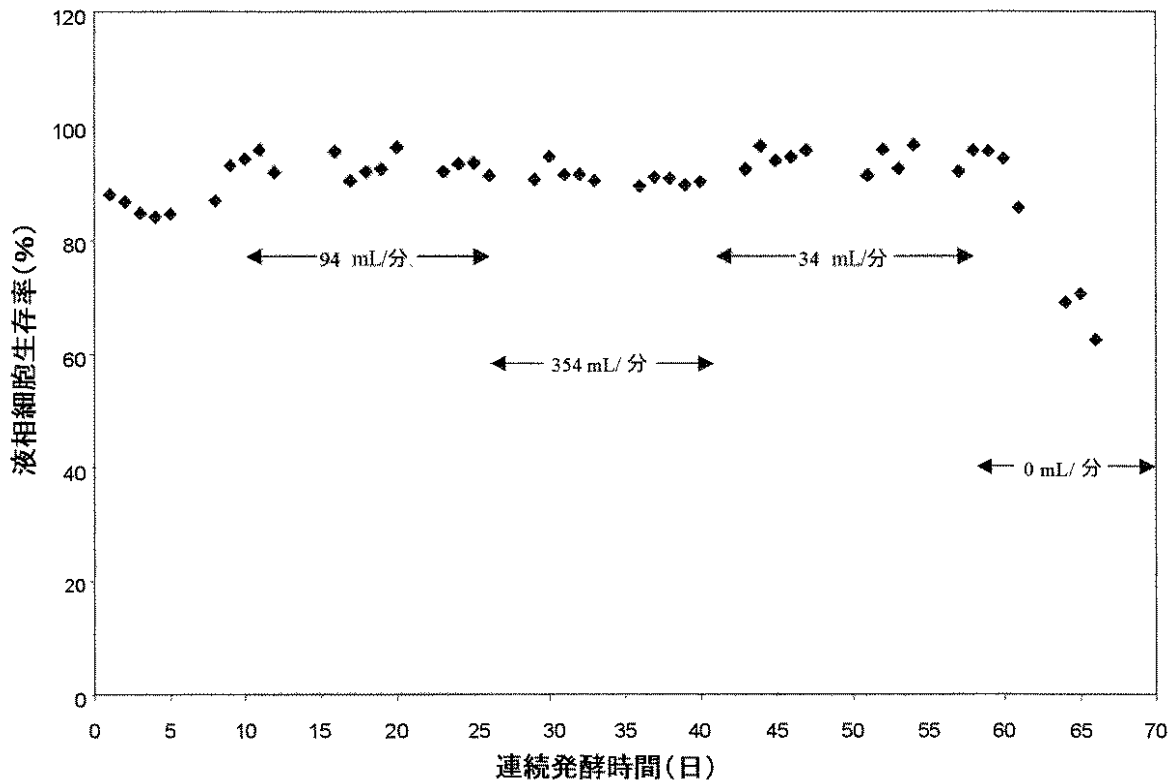
10

20

図 7. 2 相対連続発酵時間に対する液相酵母細胞濃度。スパージャーによってバイオリアクターに供給された S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分で一定であった。

【 0 4 2 4 】

【 表 1 1 5 】



30

40

図 7. 3 相対連続発酵時間に対する液相酵母の生存率。スパージャーによってバイオリアクターに供給された S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化

50

炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分で一定であった。

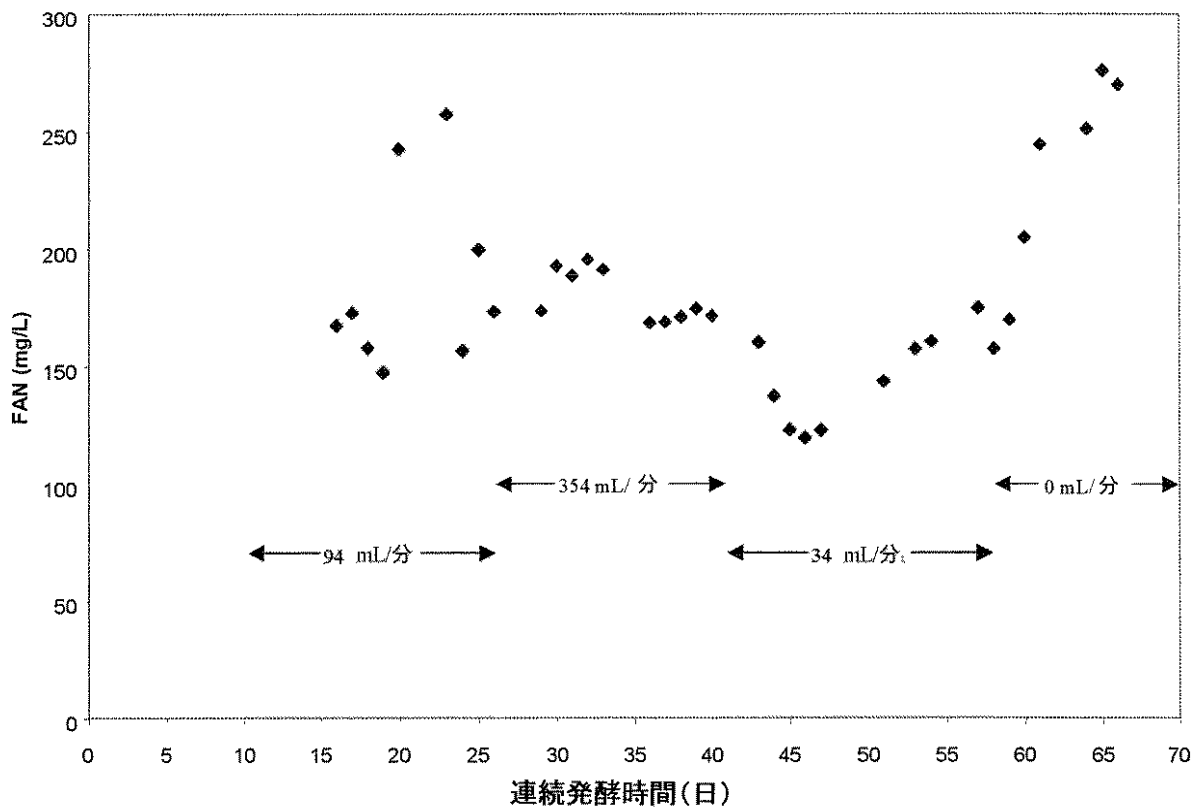
【0 4 2 5】

図7. 4では、遊離アミノ窒素 (FAN) の液相濃度を追跡した。最小FAN濃度が空気のSTPで34mL/分であることを留意することが興味深かった。これは、最大エタノール濃度または最小総発酵性炭水化物 (グルコースとして) 濃度と一致しなかった。図7. 5で認められるように、スパーキングガス中の空気の体積流速が94mL/分から354mL/分に増加した場合、バイオリアクターの液相内のエタノールが減少する一方で、総発酵性炭水化物 (グルコースとして) は増加した。これは、発酵と対照的に、酸素の利用可能性の増加によってより多数の細胞が呼吸することを示し得る。体積流速が再びSTPで354mL/分から34mL/分に減少した場合、エタノール濃度は再度増加するが、流速がSTPで94mL/分である場合に認められる濃度に達しなかった。細胞の加齢、STPで354mL/分の比較的高い酸素量への一定時間の連続曝露の影響、および固定化細胞集団の変化に起因する、系に影響を与える他の要因が存在するので、正確な期間でSTPで34mL/分のエタノール濃度と94mL/分のエタノール濃度とを比較することは困難である。図2. 4では、White and Portno (1978) は、タワー発酵槽における連続発酵を使用した酵母風味代謝産物濃度の変化に留意していた。

10

【0 4 2 6】

【表 1 1 6】



20

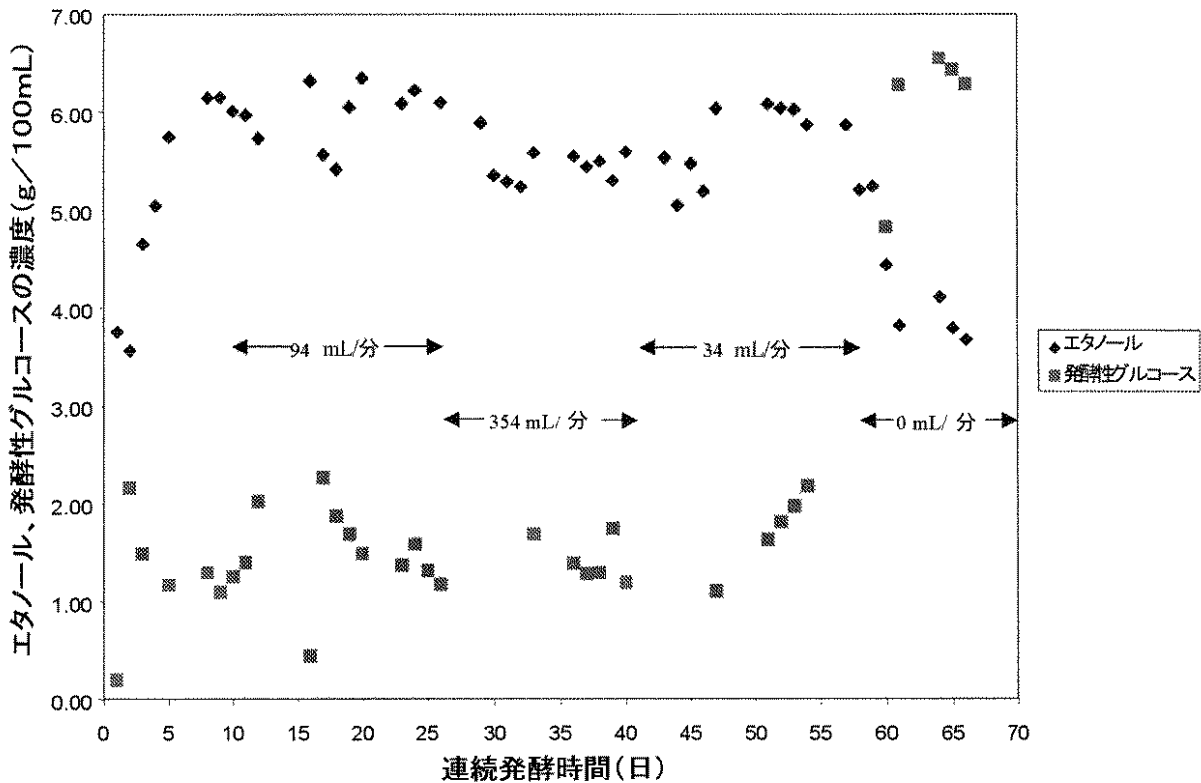
30

図7. 4 相対連続発酵時間に対する麦汁中に残存する遊離アミノ窒素濃度。スパージャーによる S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分で一定であった。

40

【0 4 2 7】

【表 1 1 7】



10

20

図7. 5 相対連続発酵時間に対する液相のエタノールおよび総発酵性炭水化物（グルコースとして）の濃度。スパージャーによってバイオリアクターに供給されたSTPでの空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通してSTPで472 mL/分で一定であった。

【0428】

図7. 6では、総ダイアセチル生成に対する酸素の明白な効果が認められる。ダイアセチルは一般にビールにおいて望ましくない風味化合物であると思われているので、バイオリアクター中の酸素量を最適化するための主な理由の1つは、この風味化合物レベルを制御することである。354 mL/分液相の後、流速がSTPで34 mL/分まで減少し、総ダイアセチルも減少した。バッチ発酵では、酸素の増加により α -アセトラクテート（ダイアセチルの前駆体）の発酵が増加することが公知である（Kunze, 1996）。

30

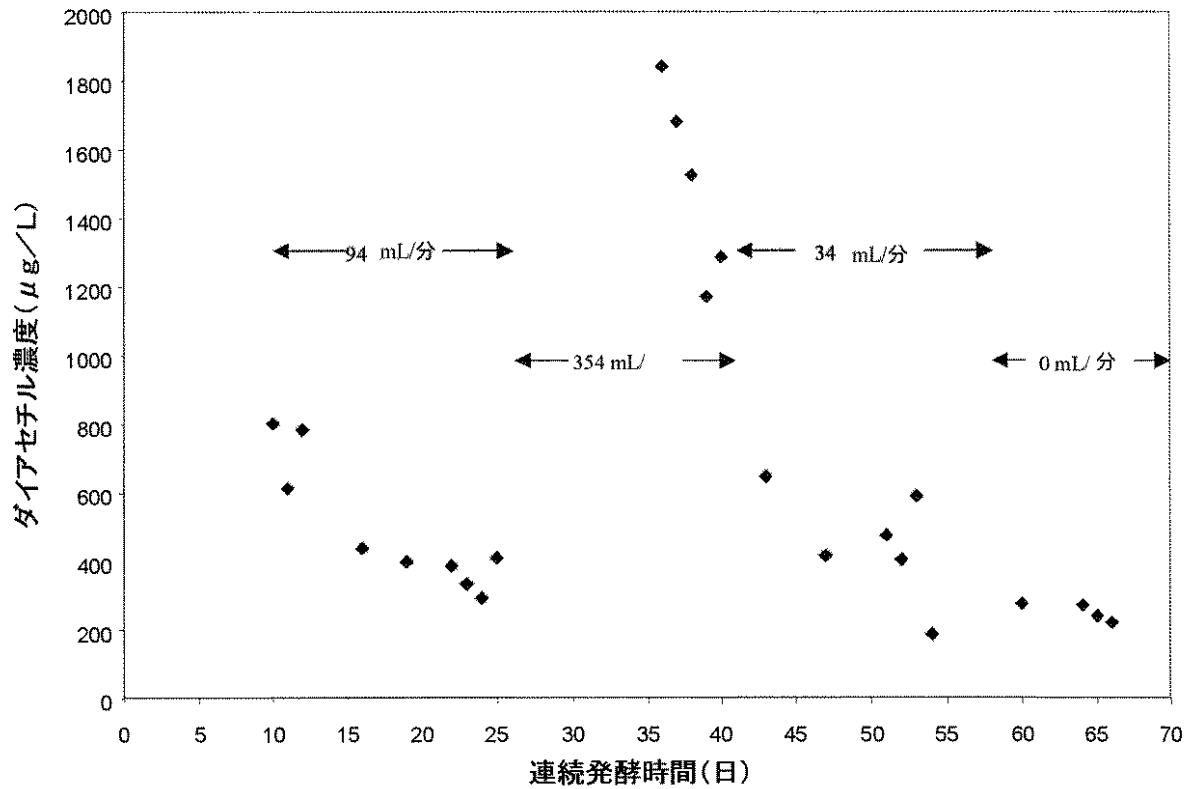
【0429】

図7. 7では、スパージ中の空気の量とアセトアルデヒド濃度との間に明白な関係が生じた。スパージングガス中の空気の割合が増加するにつれて、アセトアルデヒドの量も増加した。アセトアルデヒドはビールに青リンゴ的特徴を付与し、通常、20 mg/L未満のレベルで市販のビール中に存在する。

【0430】

【表118】

40



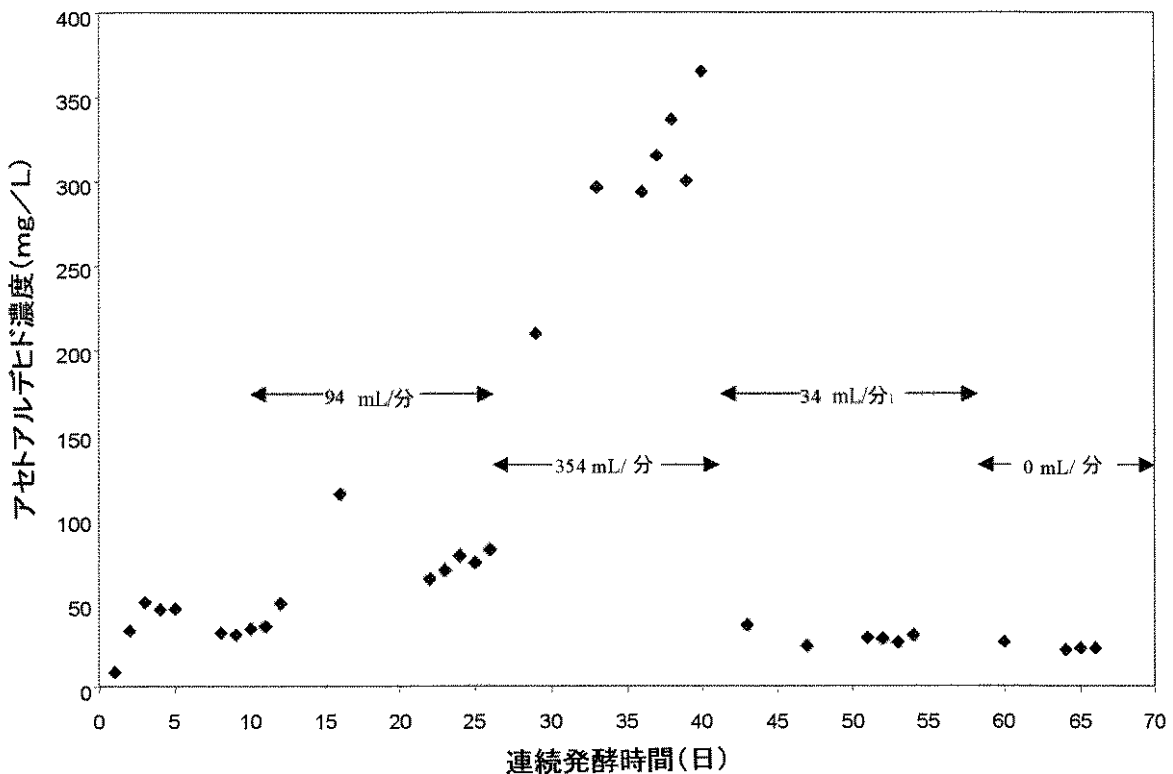
10

20

図 7. 6 相対連続発酵時間に対する液相の総ダイアセチル濃度。スパージャーによってバイオリアクターに供給された S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分で一定であった。

【 0 4 3 1 】

【 表 1 1 9 】



30

40

図 7. 7 相対連続発酵時間に対する液相のアセトアルデヒド濃度。スパージャーによっ

50

てバイオリアクターに供給された S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分で一定であった。

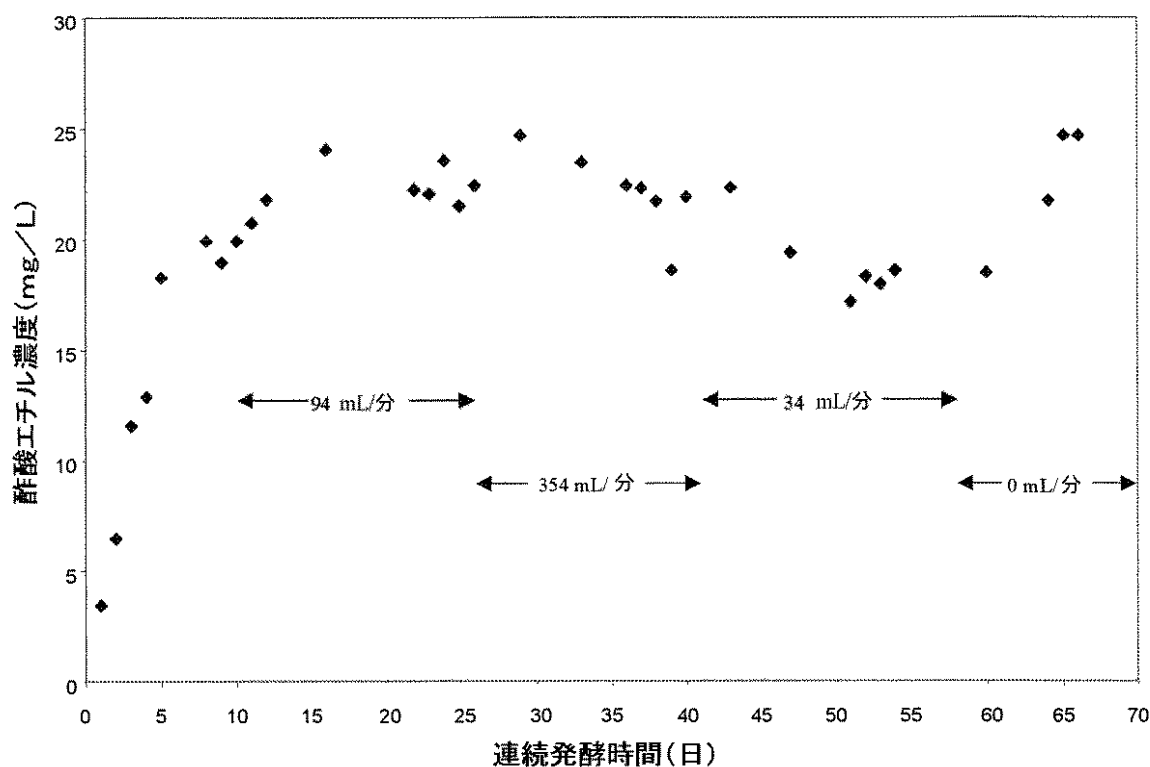
【 0 4 3 2 】

表 7. 2 および 図 7. 8 ~ 7. 9 では、連続発酵時間に対する酢酸エチル、酢酸イソアミル、ヘキサン酸エチル、およびオクタン酸エチルの偽定常状態濃度を示す。測定した全てのエステルでは、STP で 94 から 354 m L / 分への通気速度の段階的変化によって濃度が減少した。通気速度を STP で 354 m L / 分から 34 m L に減少させた場合、酢酸イソアミル、ヘキサン酸エチル、およびオクタン酸エチルの濃度が増加した。しかし、これらの濃度は 94 m L / 分の通気速度で認められた値には増加しなかった。これらの化合物の反応パターンは互いに密接に適合し、ヘキサン酸エチルおよびオクタン酸エチルは酢酸イソアミルよりも相対的変動が大きかった。空気の流速が STP で 34 m L / 分まで減少した場合、酢酸エチル濃度は実際に減少した。本研究で測定した全てのエステルでは、流動化ガスから空気が完全に消滅した場合、濃度が増加した。各エステルの濃度は増加し、バイオリアクター中の液相細胞濃度が急速に減少するにつれてその後漸減した。

10

【 0 4 3 3 】

【 表 1 2 0 】



20

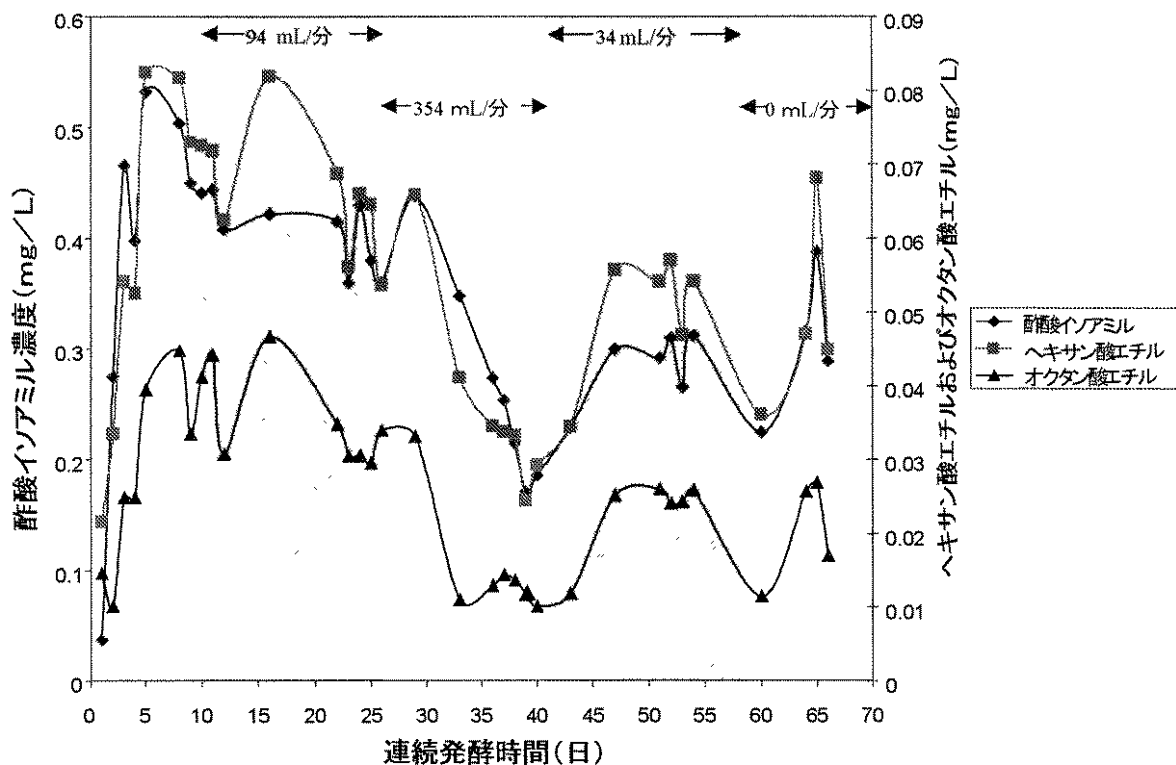
30

図 7. 8 相対連続発酵時間に対する酢酸エチル濃度。スパージャーによってバイオリアクターに供給された S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分で一定であった。

40

【 0 4 3 4 】

【 表 1 2 1 】



10

20

図7. 9 相対連続発酵時間に対する液相酢酸イソアミル、ヘキサン酸エチル、およびオクタン酸エチルの濃度。スパージャーによってバイオリアクターに供給されたS T Pでの空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通してS T Pで4 7 2 m L / 分で一定であった。

【0 4 3 5】

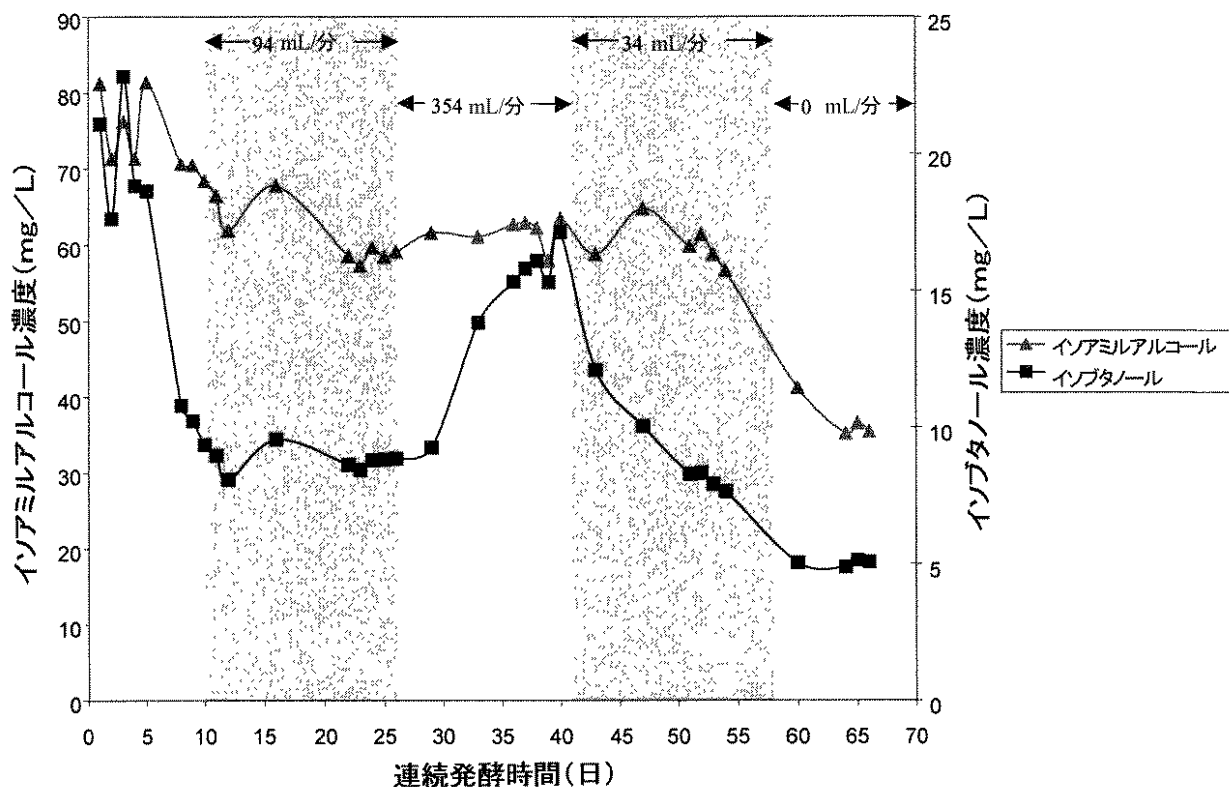
連続発酵時間に対する高級アルコールであるイソアミルアルコール、イソブタノール、および1-プロパノールを、図7. 10および7. 11に示す。測定したアルコールでは、段階的な変化の結果としての濃度の増加により、通気がSTPで94から354mL / 分に増加する。イソブタノールは、通気速度が変化した場合に最も大きな相対的変動を示した。1-プロパノール濃度は600~800mg / Lの十分に風味閾値未満であったが、連続発酵実験を通して、濃度が通常16mg / L未満である典型的な市販のバッチ製造ビールで認められる濃度よりも十分に高かった。これは、正常範囲内であるイソアミルアルコールまたはイソブタノールの場合と異なった。化合物1-プロパノールは、酸であるプロピオン酸の還元から起こると考

30

【0 4 3 6】

【表 1 2 2】

40



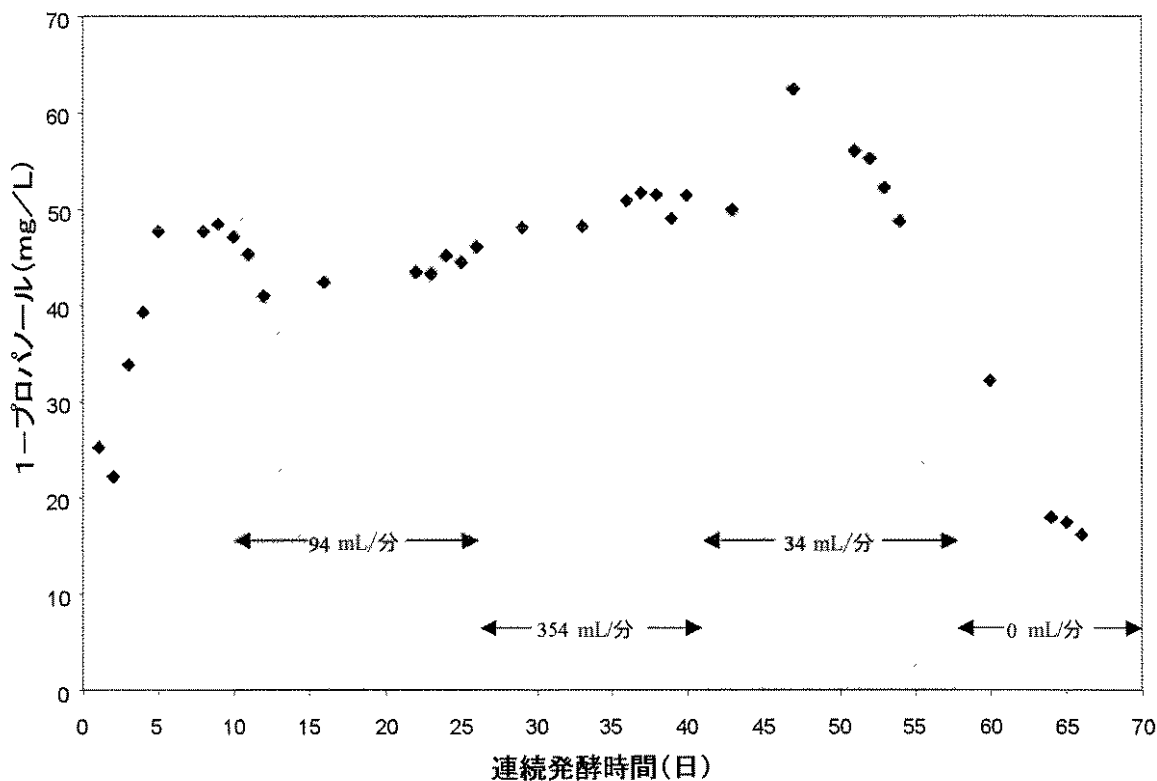
10

20

図 7. 10 相対連続発酵時間に対する液相イソアミルアルコールおよびイソブタノール濃度。スパージャーによってバイオリアクターに供給された S T P での空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通して S T P で 4 7 2 m L / 分 で一定であった。

【 0 4 3 7 】

【 表 1 2 3 】



30

40

図 7. 11 相対連続発酵時間に対する液相 1-プロパノール濃度。スパージャーによっ

50

てバイオリアクターに供給されたSTPでの空気の体積流速をグラフ上に示す。残りのガスは二酸化炭素であり、総ガス体積流速は、実験を通してSTPで472mL/分で一定であった。

【0438】

過剰なダイアセチル、アセトアルデヒド、およびフーゼルアルコールはビールでは望ましくないなので、その生成を制限する酸素制御が重要である。論文の概説で考察されるように、酵母細胞への酸素供給が増加した場合、アミノ酸前駆体の同化による形成が増大し、それにより大量のアルコール、オキソ酸、およびダイアセチルが流出する。エステル形成はアセチルトランスフェラーゼによって触媒されるので、酸素の利用可能性が増大するにつれてエステル濃度が減少することが公知である。アセチルトランスフェラーゼは不飽和脂肪酸およびエルゴステロールによって阻害され、その後酸素が増大する(Norton and D'Amore、1994)。

10

【0439】

本実験で使用したバイオリアクター条件のために、バイオリアクターの液相中で測定された偽定常状態(少なくとも3回分のリアクターターンオーバー時間後)の溶存酸素濃度は、ゼロに近かった(.03mg/L未満)。

【0440】

最も高い空気の流速(354mL/分)によって分けられているので、この実験では流動化ガス中のSTPでの94mL/分および34mL/分由来のデータを直接比較できなかった。これは、前のバイオリアクター条件への曝露に起因する酵母の生理学的状態、固定化マトリックス、および連続培養時間もまた風味生成における他の変化に起因し得るためである。

20

【0441】

本実験のいかなる測定点でもバイオリアクター中に汚染は検出されなかった。酵母の生存率を維持するためのいくつかの酸素についての酵母の要求とビールが望ましい風味プロファイルを得るための酸素の最小化の必要性とのバランスを取るために、亜鉛、マンガンなどの栄養素または生存率を維持するために酵母細胞が必要とする他の酸素生成化合物の獲得などの他のストラテジーを調査することができる。このような添加により、酵母の酸素要求がさらに減少される。別の可能性は、細胞生存率を維持するために定期的に酵母に供給される酸素の周期的パルスを使用して、ほとんどの時間を超低酸素濃度で操作することである。

30

【0442】

7. 2. 2 発酵バッチ保持期間(holding period)後: 酵母代謝産物に対する酸素曝露の効果

総ダイアセチルが主発酵後に市販のビールの通常の範囲内ではなかったなので、この化合物の濃度を許容可能レベルに減少させるためのいくつかのアプローチを採用した。1つのこのようなアプローチは、連続主発酵の直後に加温保持期間を使用することであった。図7. 12~7. 21では、発酵保持時間後に対する液相の総発酵性炭水化物(グルコースとして)、エタノール、総ダイアセチル、アセトアルデヒド、酢酸エチル、1-プロパノール、イソブタノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、およびヘキサン酸エチル濃度をプロットした。各図の説明に示すように、偽定常状態で連続主発酵から回収したサンプルを、好気性条件または嫌気性条件下に保持した。

40

【0443】

図7. 12では、好気的および嫌気的サンプルの両方で総発酵性炭水化物(グルコースとして)濃度は最初の2時間で急速に減少し、その後残りの保持期間でより遅い速度で減少した。この所見についての可能な理由は、最初の2時間でより多数の酵母がデカンテーション前に存在し、保持期間の開始時に糖濃度がより高いことであった。好気的サンプルと嫌気的サンプルとの間に発酵性グルコースの取り込みについて有意差は認められなかったが、いくつかの相違が最初に示された。

【0444】

図7. 13におけるエタノール濃度は、保持期間の開始時に急速に増加し、その後ほとんど

50

平行な様式で長期間嫌氣的サンプルおよび好氣的サンプルのエタノール濃度が増加した。嫌氣的サンプルについてのエタノールの初期増加はほとんどの糖が取り込まれた期間と一致した。保持期間の終了時に、嫌氣的に処理したサンプルにおいてエタノール濃度はより高かった。

【0445】

【表124】

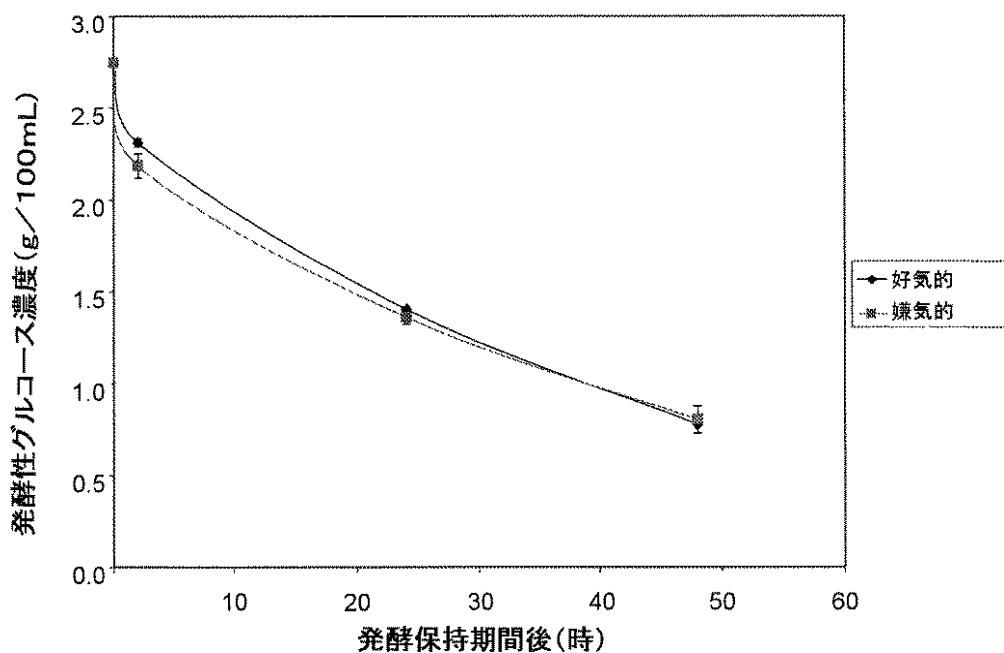


図7. 12 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好氣的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均発酵性グルコース濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

【0446】

【表125】

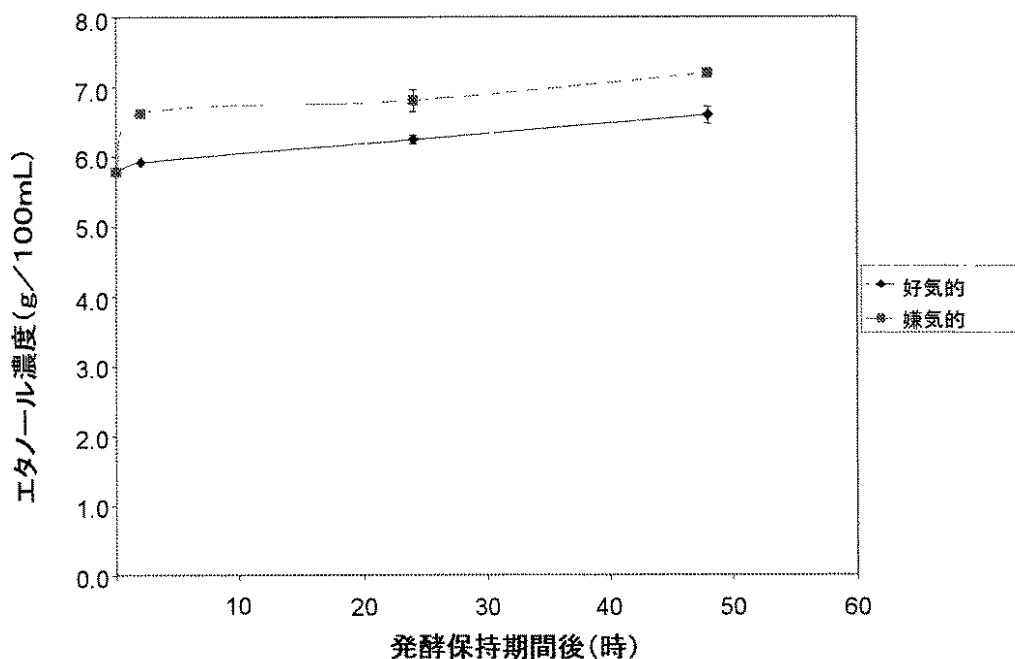


図7. 13 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好氣的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均エタノール濃度。誤差バーは、実

10

20

30

40

50

験データの上限および下限を示す（ $n = 2$ ）。

【0447】

図7. 14では、好氣的サンプルは、バイオリアクターの外側の好氣的条件への曝露時にアセトアルデヒドの初期増加を示した。糖消費とエタノール生成とを使用した嫌氣的条件の組み合わせにより、この結果を説明することができる。48時間の保持期間により、アセトアルデヒド濃度は嫌氣的サンプル中で 17mg/L から 9mg/L まで減少し、液体濃度が高品質の北米ラガーの規定内となった（ 10mg/L 未満）。

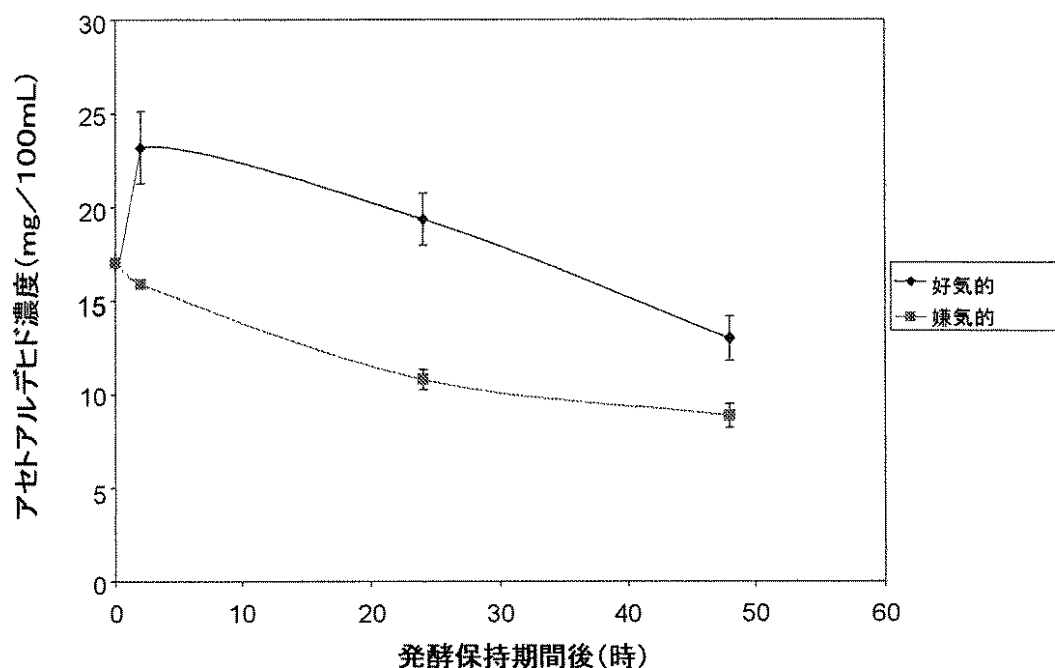
【0448】

保持時間に対する総ダイアセチル濃度を、図7. 15に示す。結果は、この保持期間中の系由来の酸素の消滅によりダイアセチル還元のためのより好ましい条件が得られることを示す。総ダイアセチル曲線の形状は、遊離アミノ窒素の減少およびその後のバリン（ダイアセチルは副産物である）の細胞内生成に関連し得る（Nakataniら、1984a；Nakataniら、1984b）。連続主発酵終了時の総ダイアセチル濃度は $326\mu\text{g/L}$ であり、嫌氣的保持期間終了時では $33\mu\text{g/L}$ であり、これは市販のビールの味の閾値より十分に低い。

10

【0449】

【表126】



20

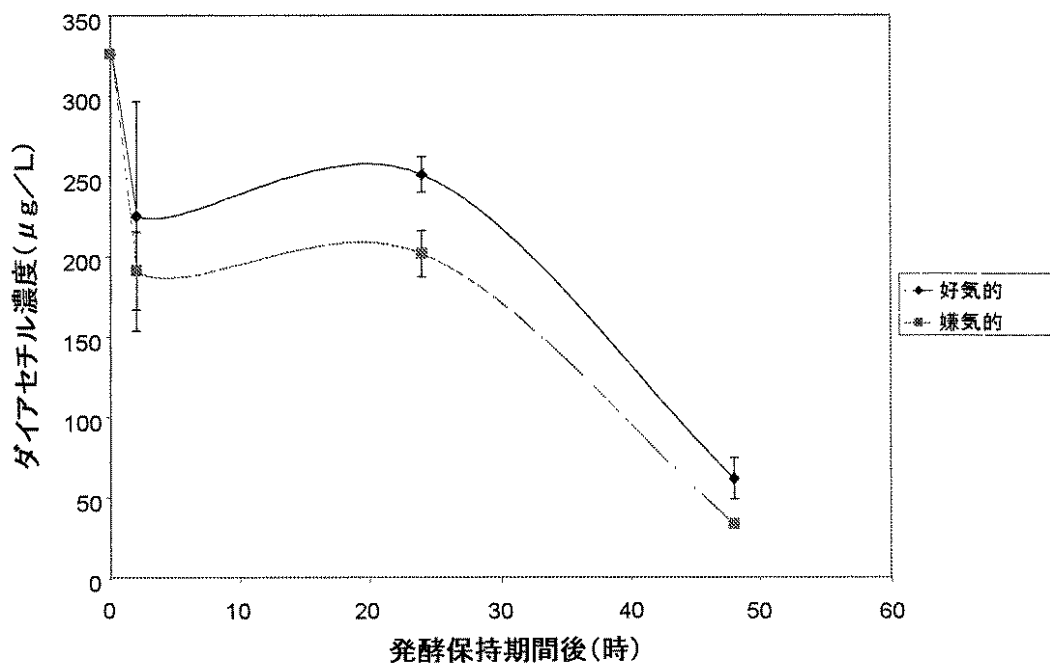
30

図7. 14 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好氣的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均アセトアルデヒド濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す（ $n = 2$ ）。

【0450】

【表127】

40



10

20

図7. 15 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均総ダイアセチル濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

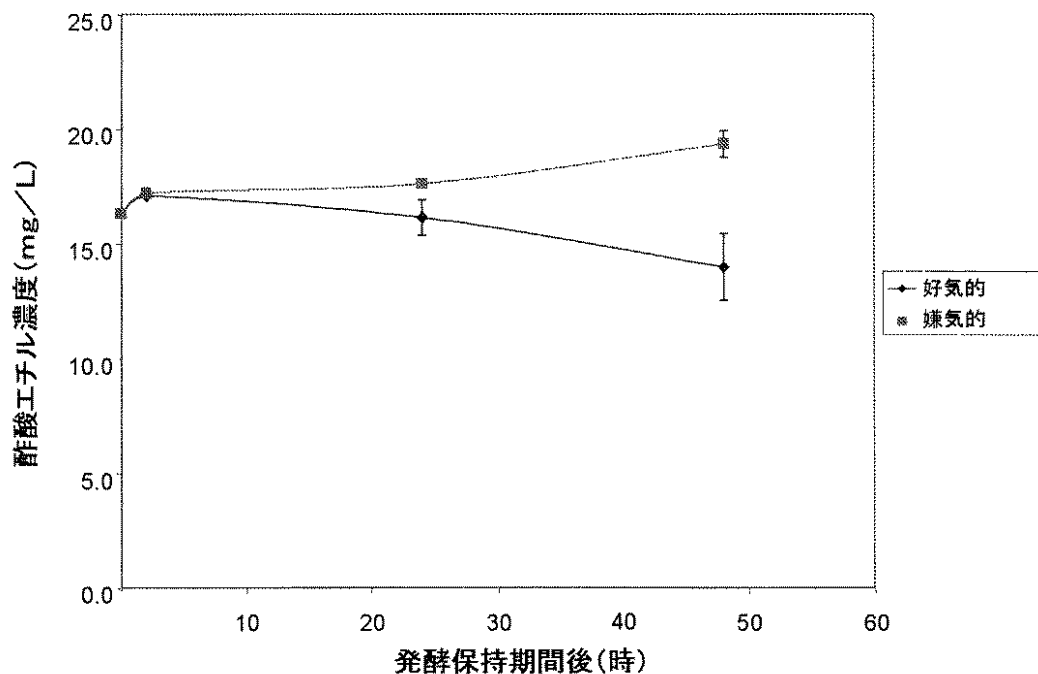
【0451】

図7. 16～7. 18では、発酵保持時間後に対するエステル（酢酸エチル、酢酸イソアミル、およびヘキサン酸エチル）の濃度をプロットしている。全てのエステルで好気的および嫌氣的のサンプルについて同一のパターンが認められた。保持期間後までのエステル濃度は嫌氣的のサンプルと好氣的のサンプルとの間で異ならなかったが、好氣的のサンプル中のエステル濃度は減少し、嫌氣的のサンプル中のエステル濃度は増加した。市販のビール中に見出されるエステル濃度と比較して連続発酵物中のエステル濃度がいくらか低いので、エステル生

30

【0452】

【表128】



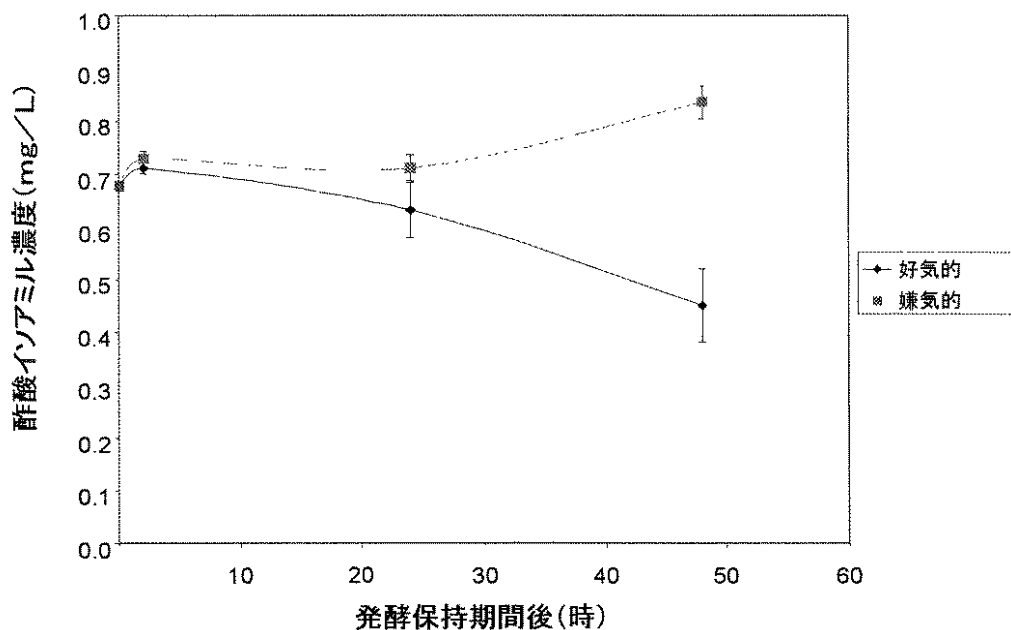
10

図 7. 16 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均酢酸エチル濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

20

【0 4 5 3】

【表 1 2 9】



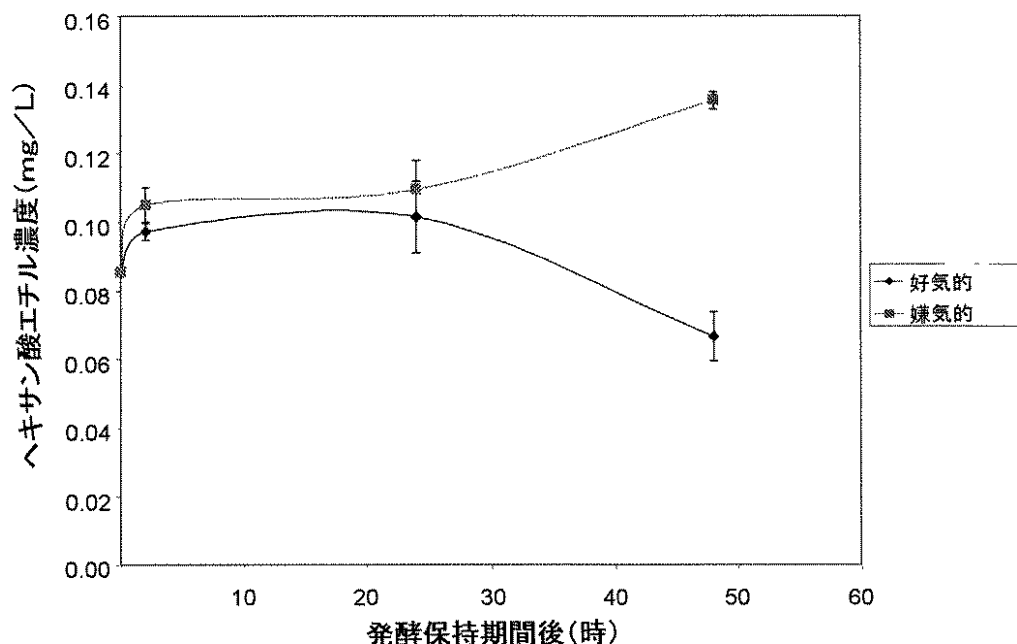
30

40

図 7. 17 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均酢酸イソアミル濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

【0 4 5 4】

【表 1 3 0】



10

図7. 18 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均ヘキサ酸エチル濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

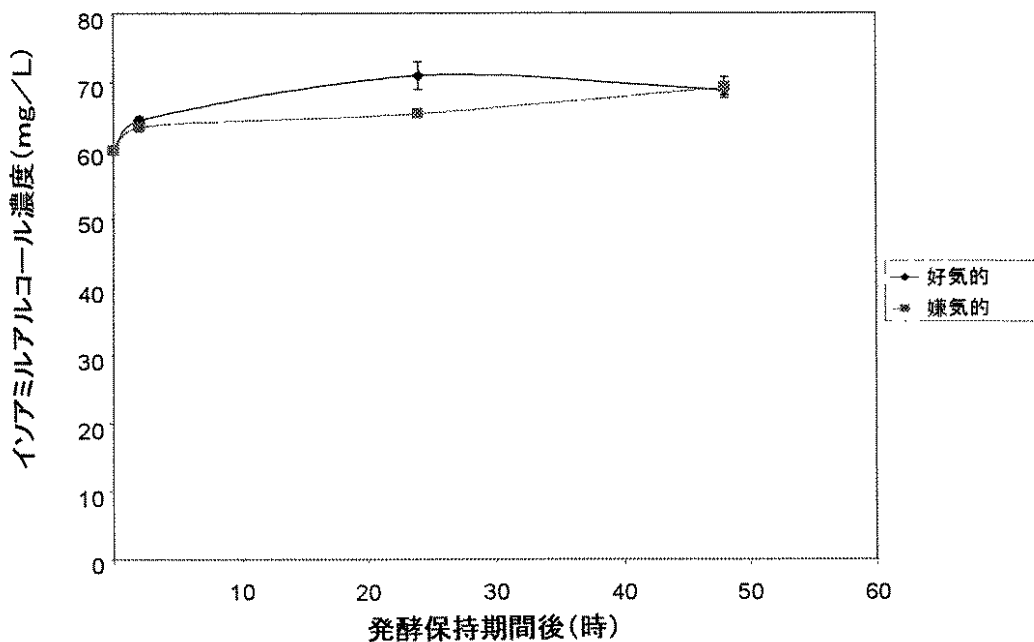
20

【0455】

図7. 19～7. 21は、発酵保持時間後に対するイソアミルアルコール、1-プロパノール、およびイソブタノールの濃度を示す。48時間の保持期間後、これらのアルコールにおいて好气的処理と嫌氣的処理との間に有意差は認められなかった。しかし、24時間サンプルは、全ての好气的処理においてより高い濃度を示した。

【0456】

【表131】



30

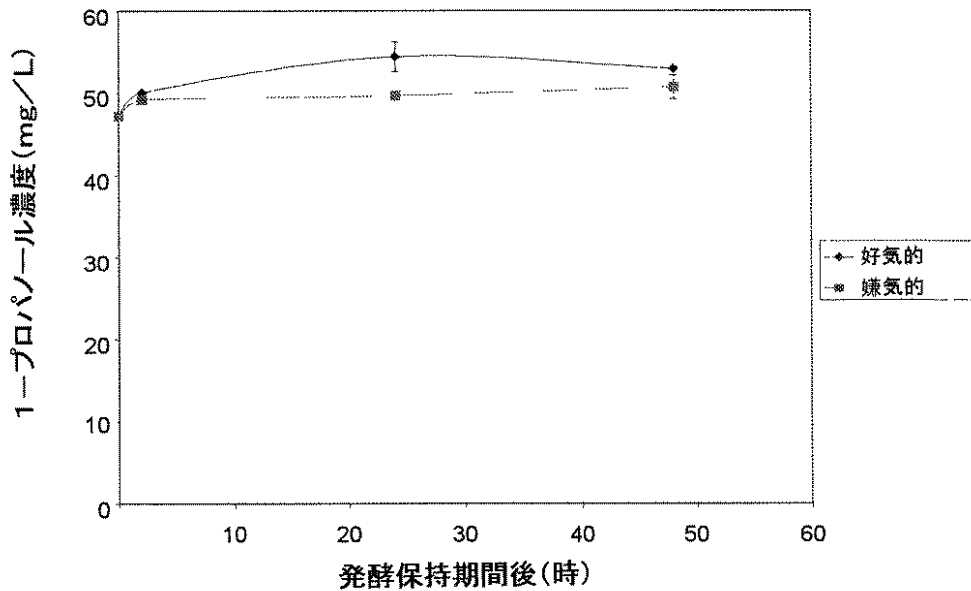
40

図7. 19 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均イソアミルアルコール濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

【0457】

50

【表 1 3 2】



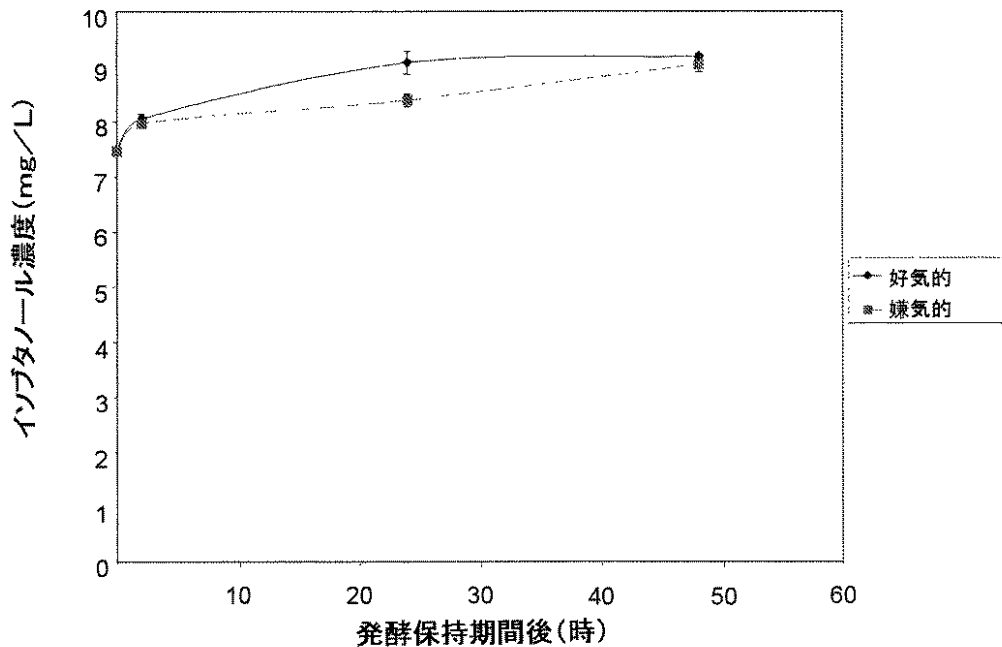
10

図 7. 20 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均 1-プロパノール濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

20

【0 4 5 8】

【表 1 3 3】



30

40

図 7. 21 ガスリフトバイオリアクター中での連続主発酵後の好気的および嫌氣的に処理したサンプルについての発酵保持時間後に対する平均イソブタノール濃度。誤差バーは、実験データの上限および下限を示す (n = 2)。

【0 4 5 9】

図 7. 22では、48時間の好気的および嫌氣的保持期間後の風味化合物数と市販のビール由来のプロファイルとを比較するためのレーダーグラフを示す。一般に、醸造業では1つのグラフ上で種々の異なるビールの特徴を試験および比較するためにレーダーグラフを使用する (Sharpe, 1988)。この図から、嫌氣的に保持した連続発酵ビールが典型的な市販のビールと最も密接に適合することが認められる。付録6から、嫌氣的液は、バッチ発酵ビ

50

ールよりも有意に高い1-プロパノールの場合を除いて市販のビールの正常な範囲内であることが認められる。本研究由来の全ての連続発酵生成物において正常な1-プロパノールよりも高かった。

【0460】

連続主発酵段階で1-プロパノールが形成され、これは条件が好氣的または嫌氣的であろうと保持期間中に有意に減少しなかった。Kunze (1996) は、以下の要因がバッチ発酵中に1-プロパノールなどの高級アルコールを増大させると述べている：混合、麦汁の強力な通気、および既存の酵母への新鮮な麦汁の反復添加。

【0461】

最後に、理想的なシナリオは、一時連続バイオリアクターにおける条件の最適化によって二次保持期間を完全に排除することである。しかし、保持期間を使用して、保持温度（酵母によって除去されたダイアセチルは温度依存性が高い）の最適化、保持期間の開始時に残存する発酵性糖の量、酵母存在濃度の最適化、保持容器の流体力学的特徴（ダイアセチルの除去を酵母とビールとの間の接触の改良によって改良することができる）、およびこの段階由来の酸素を除去するためのさらなる基準の獲得によってさらに増加させることができる。 10

【0462】

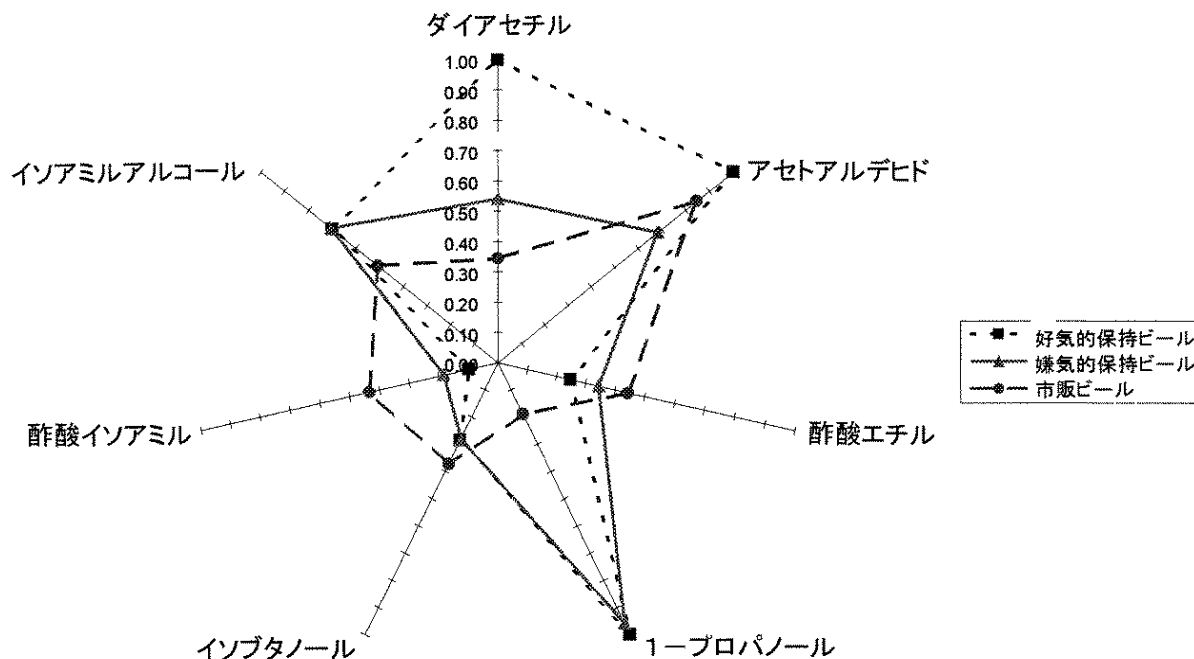
ビール生産性の体積計算を付録3に示す。24時間の滞留時間後に48時間のバッチ保持を行う連続バイオリアクター操作を使用したこの節に記載のプロセスは、現在の工業的バッチプロセスよりも1.8倍生産性が高い。7.5日のサイクル期間を使用する比較的迅速な工業的バッチプロセスのビール生産性体積は 0.093m^3 ビール生産 / (m^3 容器体積×日)であり、本明細書中に記載の連続プロセスの生産性は、 0.165m^3 ビール生産 / (m^3 容器体積×日)である。さらなる研究によりバッチ保持期間が24時間に短縮される場合、ビール生産性は工業的バッチ標準よりも2.3倍高くなる。バッチ保持を使用しない24時間の連続プロセスの理想的なシナリオが達成された場合、ビール生産性体積は、バッチ標準の7.5倍になるであろう。体積生産性の増加に加えて、バッチから連続プロセスへの移動によって実現されたさらなる利点（市場への時間の短縮、醸造所のサイズの縮小、および頻繁な酵母増殖の低下）を、相対操作費用の慎重な分析を使用してバランスを取るべきである。 20

【0463】

他の研究者（Kronlof and Virkajarvi, 1996；Nakanishiら, 1993；Yamauchiら, 1995）は、連続発酵（好氣的）の第1段階により麦汁中に存在する発酵性糖が部分的に消費されるのみである多段階連続発酵の開発に注目した。このストラテジーは風味生成に関してはいくらか成功したが、これらの系は複雑である。同様に、このような系の第1の好氣的段階は微生物汚染により感受性の高い環境を作り出す（すなわち、高い糖濃度、温度、および酸素ならびに低エタノール濃度）。本研究中に存在するガスリフトバイオリアクター系では、バイオリアクターは、発酵性糖濃度が低く、pHが低く、エタノール濃度が高く、酸素濃度が低く、潜在的な汚染物質に酷な環境を作り出す。 30

【0464】

【表134】



10

20

図7. 22 ガスリフトバイオリアクターにおける連続主発酵後の好氣的または嫌氣的保持から48時間後に得られた正規化濃度データのレーダーグラフ。正規化データは、2連のサンプルの平均に基づき、付録6に列挙したデータの中点として市販ビールのデータを得た。

【0465】

7. 2. 3 連続ビール主発酵における重要な酵母代謝産物に対する液体滞留時間の効果

図7. 23～7. 28は、バイオリアクター液相から得た分析結果を示す。表7. 3では、この実験で使用した2つの液体滞留時間での偽定常状態（最低3回のバイオリアクター回転後）での測定した被分析物の平均濃度および流速を列挙する。図7. 23に認められるように、バイオリアクターへの麦汁の流速が増加する場合に液相酵母生存率は有意に変化せず、酵母細胞濃度は変化した。

30

【0466】

【表135】

表7.3 (a) 液相酵母および重要な酵母代謝産物濃度に対するバイオリアクター滞留時間の効果ならびに偽定常状態での平均の総括表、； (b) バイオリアクターの排出口での液相酵母および重要な酵母代謝産物の流速に対するバイオリアクターの滞留時間の効果ならびに偽定常状態での平均の総括表

(a) 平均被分析物濃度	バイオリアクター滞留時間	
	1.8日間	0.9日間
細胞濃度 (個/mL)	2.38E+08	1.32E+08
総発酵性グルコース (g/100mL)	0.29	6.09
FAN (mg/L)	106.3	246.4
エタノール (g/100mL)	5.16	4.80
総ダイアセチル (μg/L)	292	460
アセトアルデヒド (mg/L)	19.47	37.07
酢酸エチル (mg/L)	41.00	38.29
1-プロパノール (mg/L)	44.95	13.53
イソブタノール (mg/L)	22.78	9.13
酢酸イソアミル (mg/L)	0.90	1.28
イソアミルアルコール (mg/L)	76.67	51.39

10

【表 1 3 6】

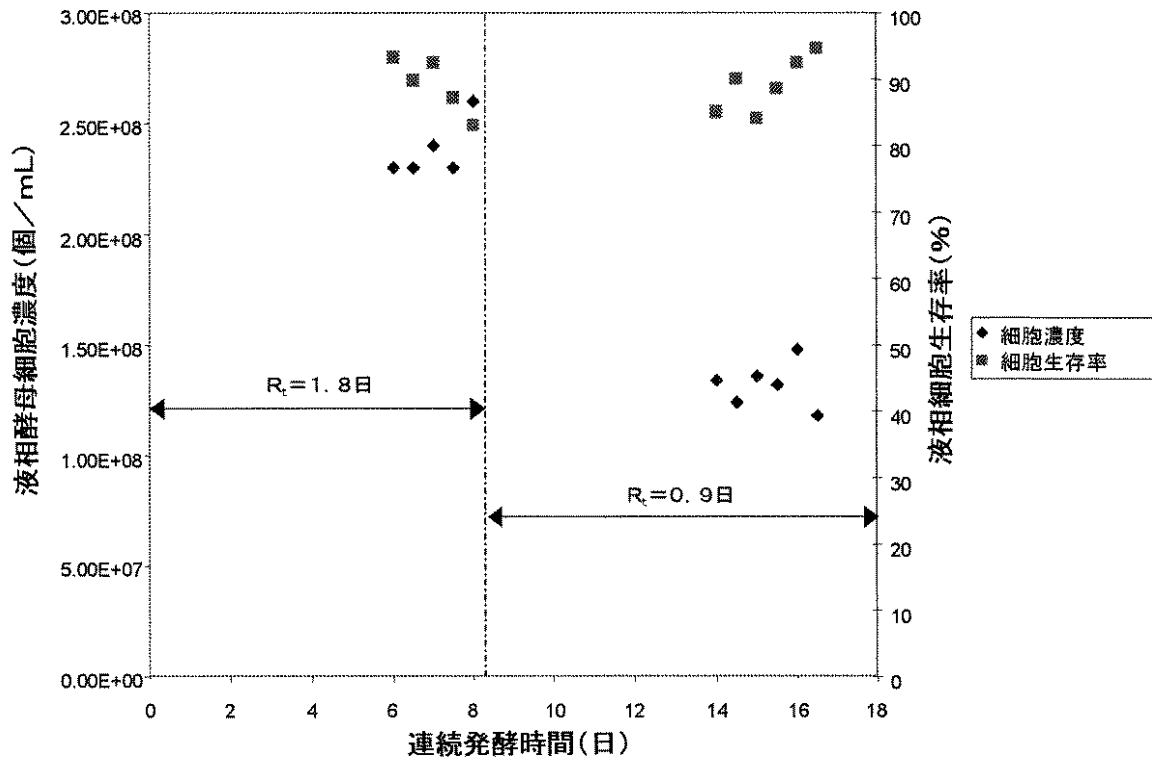
20

(b) 平均被分析物流速	バイオリアクター滞留時間	
	1.8日間	0.9日間
細胞流速 (個/分)	7.38E+08	8.22E+08
総発酵性グルコース (g/分)	8.93E-03	3.72E-01
FAN (g/分)	3.65E-04	1.50E-03
エタノール (g/分)	1.60E-01	2.93E-01
総ダイアセチル (g/分)	9.06E-07	2.81E-06
アセトアルデヒド (g/分)	6.04E-05	2.26E-04
酢酸エチル (g/分)	1.27E-04	2.34E-04
1-プロパノール (g/分)	1.39E-04	8.25E-05
イソブタノール (g/分)	7.06E-05	5.57E-05
酢酸イソアミル (g/分)	2.80E-06	7.30E-06
イソアミルアルコール (g/分)	2.38E-04	3.13E-04

30

【0 4 6 7】

【表 1 3 7】



10

20

図7. 23. 相対連続発酵時間に対する液相酵母細胞濃度（バイオリアクターにおける液体滞留時間の効果）。 R_t は日で示したバイオリアクターでの液体滞留時間である。

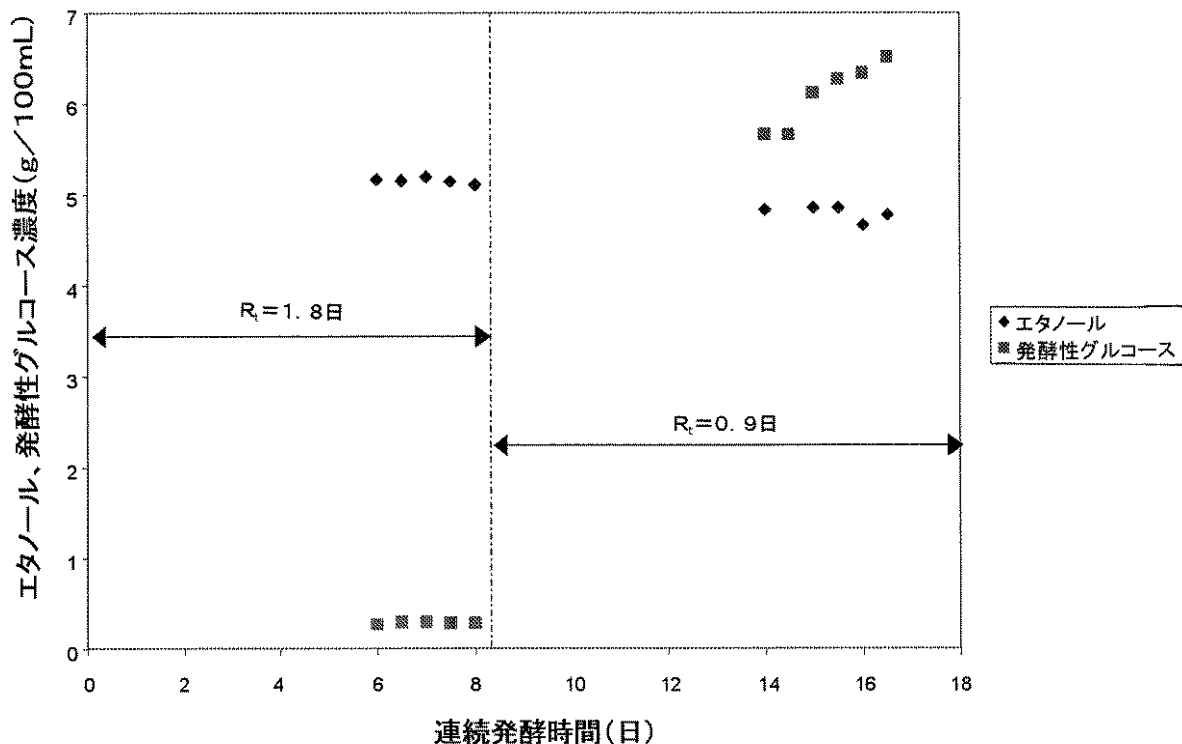
【0468】

図7. 24および7. 25では、麦汁基質である遊離アミノ窒素（FAN）および総発酵性炭水化物（グルコースとして）の濃度が液体滞留時間が1.8日間から0.9日間に減少させた場合に増加した。表7. 4中の質量バランスから、バイオリアクターでの滞留時間が増加するにつれて、総発酵性炭水化物（グルコースとして）の消費速度が増加し、遊離アミノ窒素消費が増加した。発酵性グルコース基質由来の発酵生成物エタノールの収率因子（ $Y_{P/S}$ ）は、液体滞留時間の減少と共に0.3から0.5に増加した。系に空気および二酸化炭素をスパージしていたので、おそらく気相でエタノールがわずかに損失し、エタノールに対するバランスの影響によって収率因子（ $Y_{P/S}$ ）に影響を与えるであろう。Budac and Margaritis (1999)との共同開発で行った研究は、ガスクロマトグラフ質量分析技術（GC-MS）を使用して定性的に行われ、連続発酵中にガスリフトバイオリアクターのヘッドスペースでエタノール、アセトアルデヒド、酢酸エチル、および酢酸イソアミルを含むビール風味揮発性成分が検出されている。

30

【0469】

【表138】



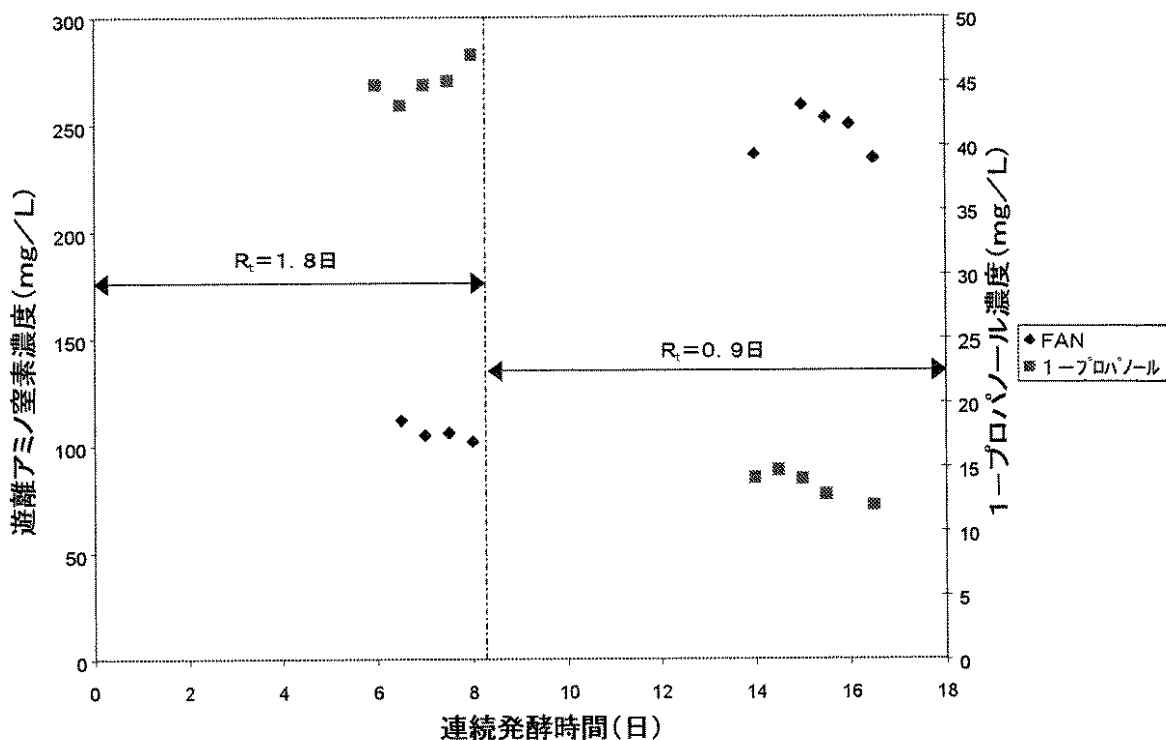
10

20

図 7. 2 4 相対連続発酵時間に対する液相エタノールおよび発酵性グルコース濃度（バイオリアクターにおける液体滞留時間の効果）。

【 0 4 7 0 】

【 表 1 3 9 】



30

40

図 7. 2 5 相対連続発酵時間に対する液相遊離アミノ窒素および 1-プロパノールの濃度（バイオリアクターにおける液体滞留時間の効果）。 R_t は日で示したバイオリアクターでの液体滞留時間である。

【 0 4 7 1 】

50

【表 1 4 0】

表 7.4 表 7.3 中の平均データに基づいた遊離アミノ窒素および総発酵性炭水化物（グルコースとして）についての質量バランス（滞留時間の効果）

滞留時間	1.8日間	0.9日間	1.8日間	0.9日間
	遊離アミノ窒素（g／分）		総発酵性グルコース（g／分）	
注入口＊	8.84E－04	1.74E－03	4.71E－01	9.26E－01
排出口	3.65E－04	1.50E－03	8.93E－03	3.72E－01
消費（△S）	5.18E－04	2.35E－04	4.62E－01	5.54E－01
収率因子（Y _{P/S} ）			0.3	0.5

10

＊ Appendix 1からの注入口濃度

【0 4 7 2】

発酵生成物であるエタノールの液相濃度は、液体滞留時間の段階的变化とともに減少した。しかし、系は全体としてより早い液体滞留時間での質量流速に基づいてより大量のエタノールを生成した。本研究の目的は単離においてエタノールを生成するだけでなく、むしろ多数の成分をバランスよく含むビールを製造することであるので、エタノール生産性の最大化は、他の要因とバランスを取らなければならない。市販のビールの主発酵の終了時に、発酵性グルコース基質の大部分は消費されなければならない。

【0 4 7 3】

図 7. 26では、麦汁流速工程の変化に対するアセトアルデヒドおよび総ダイアセチル濃度の反応を示す。液体滞留時間が減少した場合、両被分析物の濃度および生成速度が減少した。バッチビール発酵では、発酵最初の数日間で酵母によってアルデヒドが分泌される。

【0 4 7 4】

【表 1 4 1】

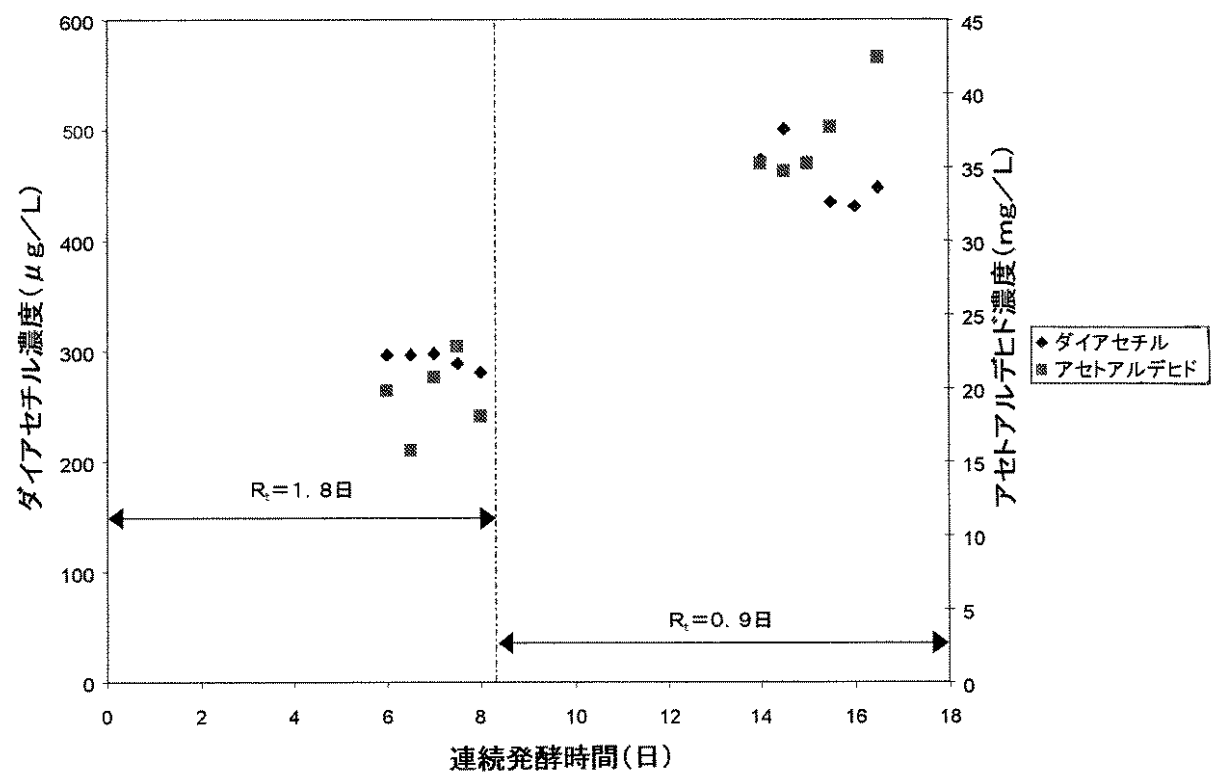


図 7. 26 相対連続発酵時間に対する液相総ダイアセチルおよびアセトアルデヒドの濃度（バイオリアクターにおける液体滞留時間の効果）。R_tは日で示したバイオリアクターでの液体滞留時間である。

【0 4 7 5】

50

図7. 25および7. 27は、高級アルコール（1-プロパノール、イソブタノール、およびイソアミルアルコール）の液相濃度に対するバイオリアクターの滞留時間の減少効果を示す。バイオリアクター滞留時間が減少した場合、3つ全ての高級アルコールの濃度が減少した。

【0 4 7 6】

【表 1 4 2】

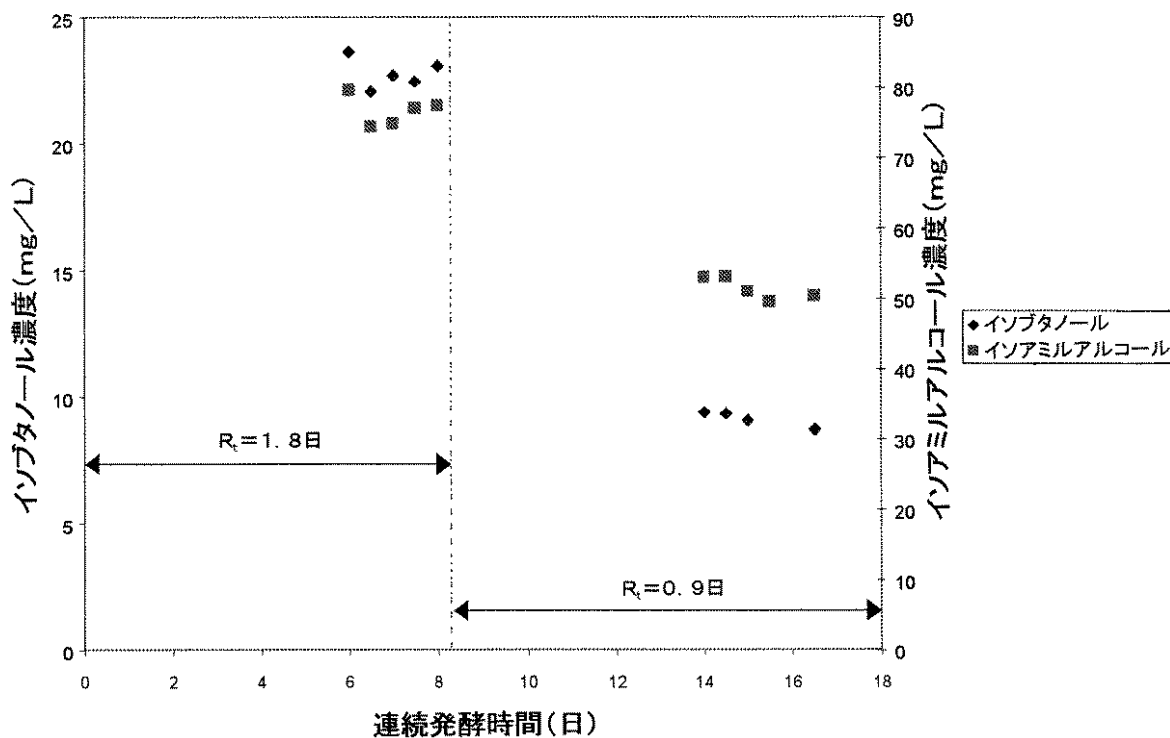


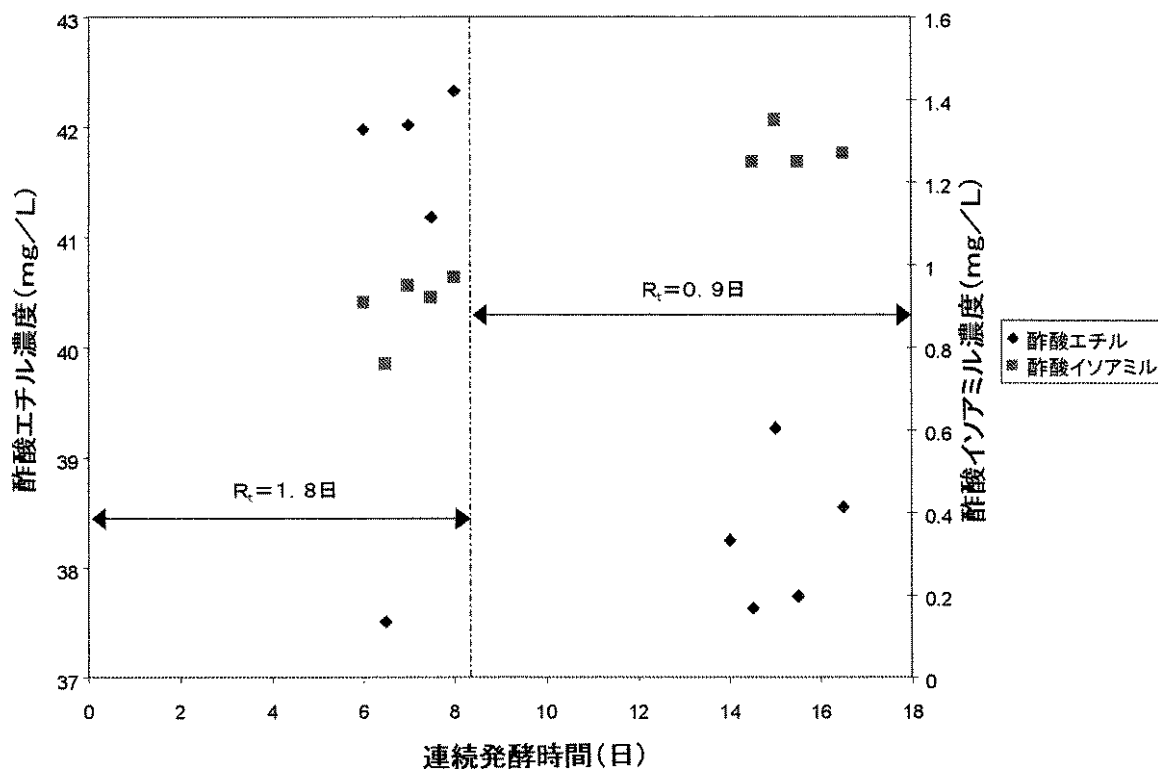
図7. 27 相対連続発酵時間に対する液相イソブタノールおよびイソアミルアルコールの濃度（バイオリアクターにおける液体滞留時間の効果）。 R_t は日で示したバイオリアクターでの液体滞留時間である。

【0 4 7 7】

表7. 3 (b) に示した酢酸エチルおよび酢酸イソアミルの質量流速は共に液体滞留時間の減少に反応して増加した。図7. 28では、酢酸エチルの液相濃度が減少し、酢酸イソアミルの液相濃度が増加した。この実験により、系に酸素供給を増加させること無く液相細胞増殖が増加するので、バイオリアクターの条件によりエステル生成が促進した。Houghら（1982）は、増殖の増加および酸素条件の減少によりエステル形成が促進されると述べている。

【0 4 7 8】

【表 1 4 3】



10

20

図7. 28 相対連続発酵時間に対する液相酢酸エチルおよび酢酸イソアミルの濃度（バイオリアクターにおける液体滞留時間の効果）。 R_t は日で示したバイオリアクターでの液体滞留時間である。

【0479】

7. 2. 4 連続ビール主発酵における総ダイアセチルを還元するための α -アセトラクターデカルボキシラーゼの商業的調製物の使用

実験1：試験を完了する前に、バイオリアクターに好氣的に増殖するグラム陽性球菌を汚染させた。麦汁供給物の微生物試験では汚染が認められなかったので、バイオリアクター自体が汚染されたと同定した。これは、バイオリアクターに改良された汚染に対する安全装置を使用した性能向上が必要であることを示す。しかし、系を遮断する前に、ALDCを麦汁供給物に添加した場合、総ダイアセチル濃度の減少が認められた。不運なことに、バイオリアクター汚染の影響により、このデータからいかなる結論も導くことができなかった。

30

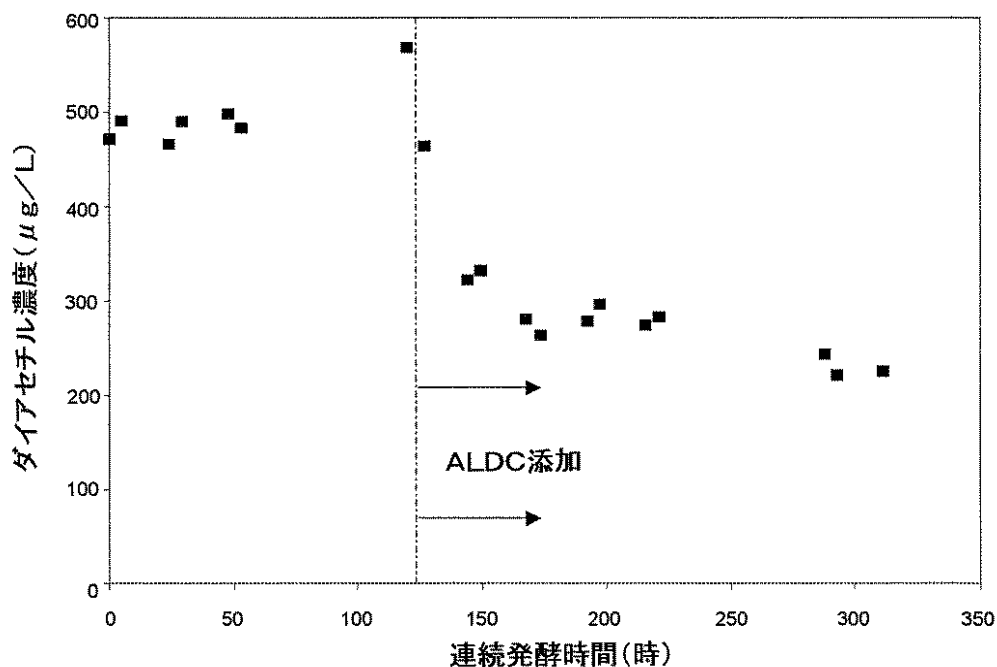
【0480】

実験2：多数のバイオリアクターの性能向上の結果として、実験2の間中汚染することなく系が操作された。この実験データを、図7. 29～7. 31に示す。表7. 5では、麦汁へのALDC添加前後の平均偽定常状態の総ダイアセチル濃度をまとめている。麦汁へのALDCの添加により総ダイアセチル濃度は47%減少し、この酵素をその後使用する（3回のバイオリアクター回転後に取った平均）。図7. 30および7. 31で認められるように、総発酵性炭水化物（グルコースとして）および細胞濃度はこの試験でわずかに外れ、これはALDCの添加前後にバイオリアクターに供給された麦汁のわずかな相違に起因し得る。

40

【0481】

【表144】

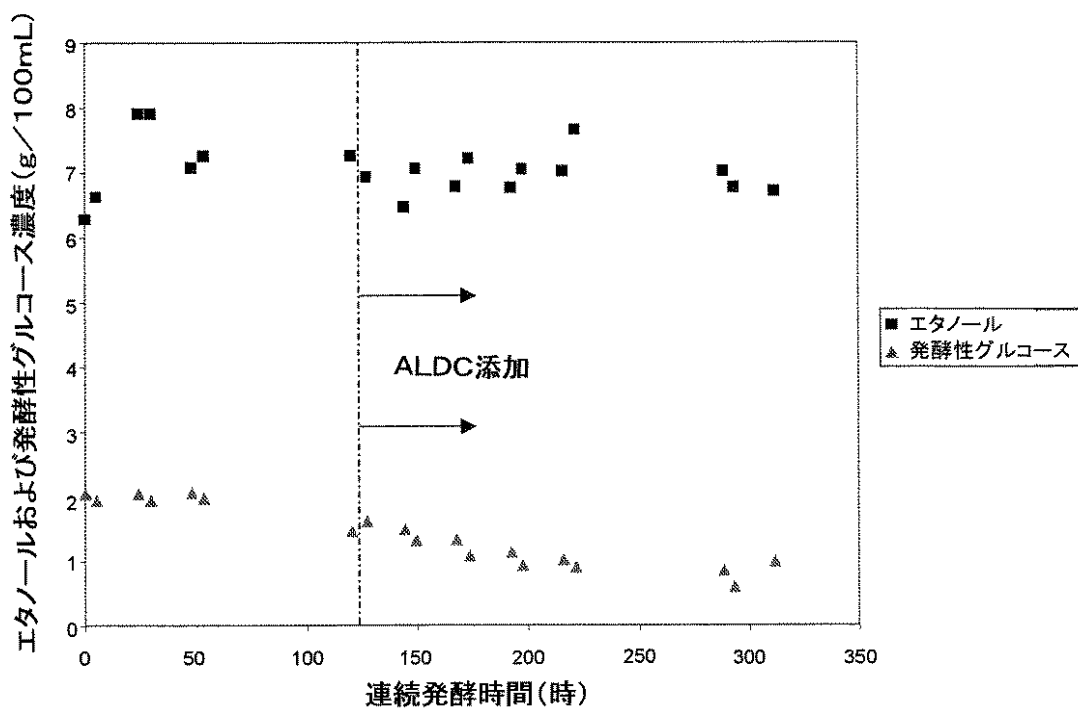


10

図 7. 29 連続発酵時間に対する液相総ダイアセチル濃度（麦汁発酵培地への A L D C 20
添加の効果（実験 2））

【 0 4 8 2 】

【 表 1 4 5 】



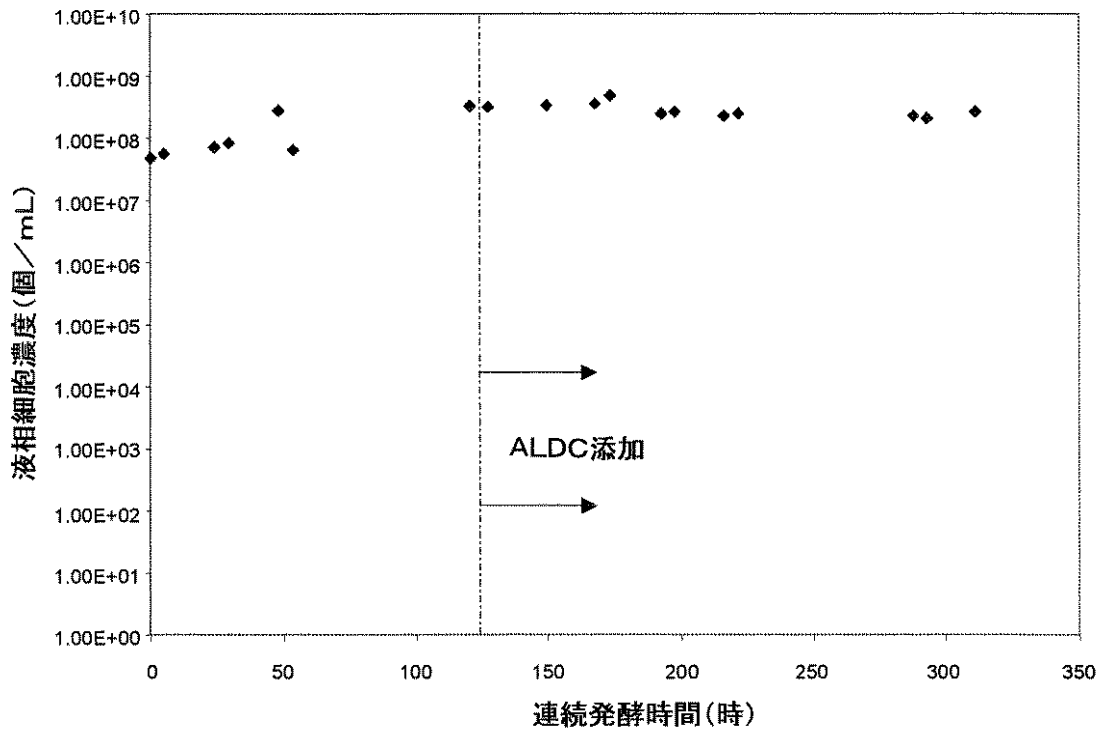
30

40

図 7. 30 連続発酵時間に対する液相発酵性炭水化物（グルコースとして）およびエタ 20
ノールの濃度（麦汁発酵培地への A L D C 添加の効果（実験 2））

【 0 4 8 3 】

【 表 1 4 6 】



10

20

図7. 31 連続発酵時間に対する液相細胞濃度（麦汁発酵培地へのALDC添加の効果（実験2））

【0484】

麦汁の変動性の潜在的に混乱させる影響を排除するために、実験3では、醸造所から大量の麦汁（14hL）を回収し、一旦偽定常状態のベースラインに達すると、この保持容器に維持した麦汁にALDCを直接添加した。これにより、実験2で発酵品質に影響を与え得るいかなる潜在的な麦汁の矛盾もさらに排除された。この麦汁保存容器には、麦汁供給物中の溶存酸素レベルが一貫して低レベルに保持されるように二酸化炭素スパージャーも具備されていた。

【0485】

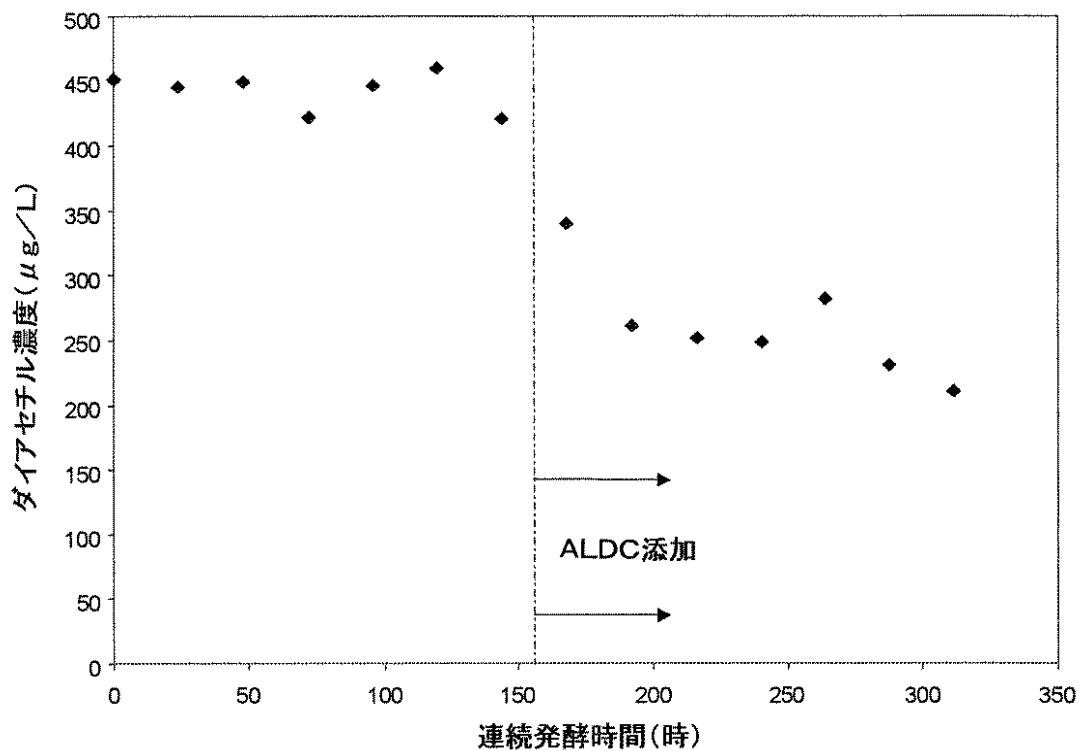
実験3：図7. 32～7. 34は、連続ビール発酵における総ダイアセチル、総発酵性炭水化物（グルコースとして）、エタノール、および自由に懸濁する細胞の濃度に対するALDC添加の効果を示す。表7. 6はまた、麦汁供給物へのALDCの添加前後での平均偽定常状態の総ダイアセチル濃度を示す（3回のバイオリアクター回転後に取った平均）。この実験のいかなる測定点においても汚染は検出されなかった。総ダイアセチル濃度は、ALDCの添加時に45%減少した。エタノール、総発酵性炭水化物（グルコースとして）、または自由に懸濁した細胞の濃度において有意差は認められず、これはAschengreen and Jepsen（1992）のバッチ所見に一致する。

30

【0486】

【表147】

40



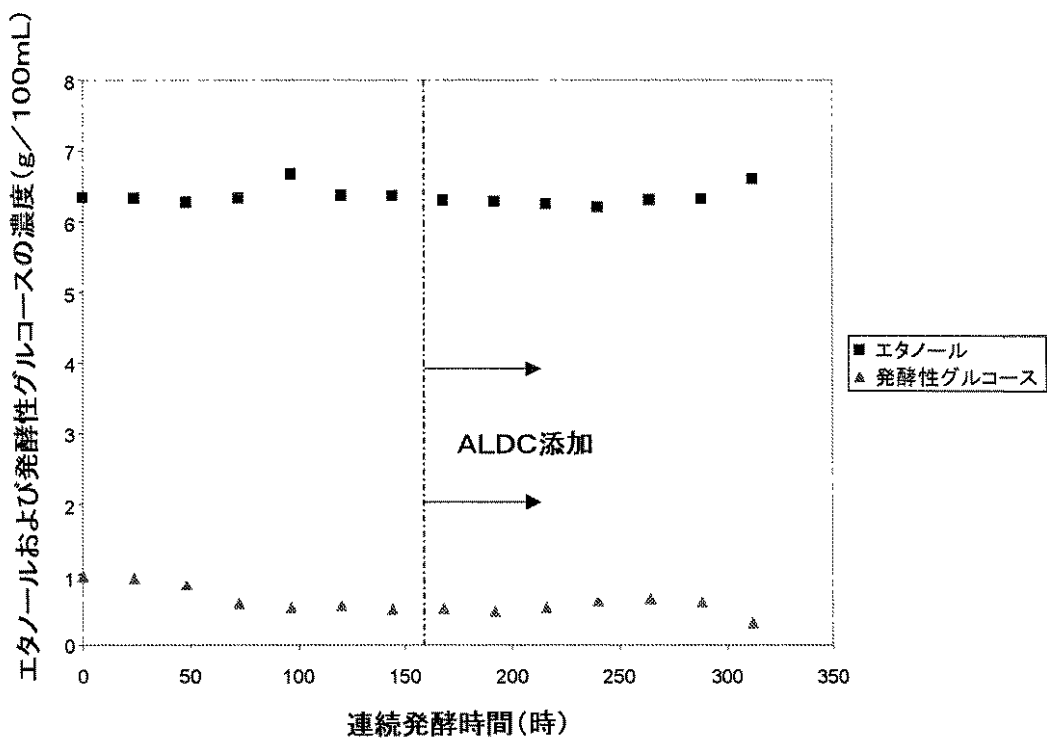
10

20

図 7. 3 2 連続発酵時間に対する液相総ダイアセチル濃度（麦汁発酵培地への A L D C 添加の効果（実験 3））

【 0 4 8 7 】

【 表 1 4 8 】



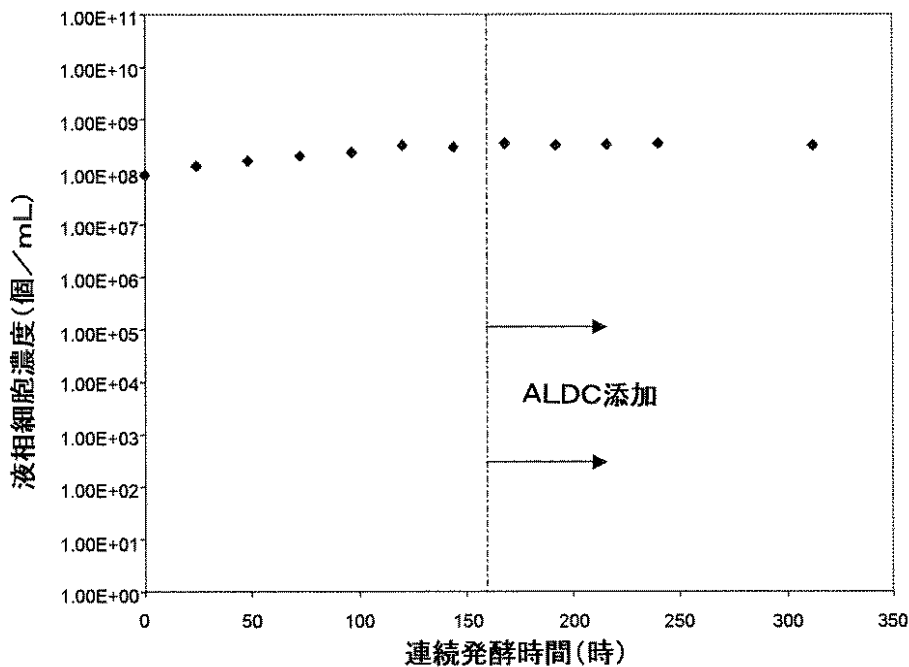
30

40

図 7. 3 3 連続発酵時間に対する液相エタノールおよび総発酵性糖（グルコースとして）の濃度（麦汁発酵培地への A L D C 添加の効果（実験 3））

【 0 4 8 8 】

【 表 1 4 9 】



10

図 7. 3 4 連続発酵時間に対する液相細胞濃度（麦汁発酵培地への A L D C 添加の効果（実験 3）） 20

【 0 4 8 9 】

実験 2 および 3 の結果は、ガスリフトバイオリアクターでの連続発酵中で ALDC が総ダイアセチル濃度に対して有意に影響することを示し、総ダイアセチル濃度の平均減少率は 46% である。これは、連続ガスリフト系のダイアセチルの還元のための二次処理を減少または排除する能力を有する。これらの実験で比較的大量の ALDC を使用し、この酵素がこのプロセスで適用される場合、麦汁中の ALDC 添加の量、方法、およびタイミングを最適にする必要がある。醸造所での発酵条件下で酵素を比較的高い活性で利用可能であるか、この酵素自体が固定されており再利用が可能である場合にさらに節約することができる（Dulieu ら、1996）。別の検討材料は、遺伝子改変生物を使用して産生された酵素添加物に対する公衆の承認である。 30

【 0 4 9 0 】

供給者が推奨する量（2kg/1000hL）および市販の酵素調製費用（131.05ドル/kg）で、発酵の材料費に 0.26ドル/hL が加わるであろう。実験で使用する場合、酵素量は 72μg/L（108ADU/L）または 7.2kg/1000hL ALDC であり、0.94ドル/hL の材料費が添加される。ガスリフト連続発酵におけるダイアセチル還元のための ALDC 使用の経済性は、バイオリアクター条件下での最適酵素量およびその使用のために節約される時間に依存する。

【 0 4 9 1 】

【 表 1 5 0 】

表 7.5 ガスリフトバイオリアクターでの連続ビール発酵における総ダイアセチル濃度に対する麦汁発酵培地への ALDC 添加の平均偽定常状態の効果のまとめ 40

実験	平均総ダイアセチル濃度（μg/L）		ダイアセチル還元率
	（無 ALDC）	（ALDC、60 μL/L）	
実験 II	495	260	47
実験 III	445	245	45

* 少なくとも 3 回分のリアクターターンオーバー時間後の偽定常状態の値に基づいた平均 50

【 0 4 9 2 】

前述は、ガスリフトドラフト管バイオリアクター系において固定化酵母および関連する遊離細胞を使用した連続発酵が以下の基準に基づいたビール製造用バッチ発酵の実行可能な代案であるという提案を支持する。

- － 風味適合の達成
- － より高いバイオリアクターの体積生産性
- － 最小の複雑性
- － 証明された長期連続操作
- － 風味制御のための流動ガス中の空気（酸素）の制御
- － 選択肢としてのダイアセチル制御のための□-アセトラクテートデカルボキシラーゼの添加
- － 細菌汚染が無いこと
- － 金銭的に有利であること

10

【0493】

さらに研究する必要がある多数の領域が依然として存在するが、大規模なテクノロジーが試験され始めている。下水処理のために産業規模でガスリフトバイオリアクターが既に使用されており、連続ビール発酵系をスケールアップすることが技術的に可能である。オランダのGrolsch醸造所は、下水処理のために230m³のガスリフトバイオリアクターの使用を報告している（Driessenら、1997）。醸造業における産業規模の連続発酵に対する最も大きな障壁の1つは、伝統と深くかかわりのある産業における新規のプロセスを使用した醸造所の許容度であるかもしれない。

20

【0494】

本研究で行われた連続ビール発酵で製造された二次酵母代謝産物に関して収集されたデータにより、ビールの風味形成のための流動化ガスにおける酸素制御の重要性が強調された。この所見は、所定の操作条件下でバイオリアクターの流動化ガス中の空気の増加はアセトアルデヒド、ダイアセチル、および高級アルコール（イソアミルアルコールおよびイソブタノール）の増加に起因する一方で、エステル（酢酸イソアミル、ヘキサン酸エチル、オクタン酸エチル）およびエタノールの濃度は減少することを示した。これらのデータにより、バイオリアクターの流動化ガスの組成によってビールの風味が制御されて、独自の製品が製造される可能性があることが示唆される。

30

【0495】

空気が流動化ガスから排除されることを除き、10⁸個/mLを超える自由に懸濁した細胞の濃度が、バイオリアクターの液相中で維持された。したがって、系は、バイオリアクター中に共存する1つを超える酵母細胞集団（固定化酵母および液相懸濁酵母）を有する。バイオリアクターの液相で増殖する大量の生きている酵母のために、酵母増殖機として連続バイオリアクターが使用される可能性がある。

【0496】

連続主発酵後に第2の48時間のバッチ保持期間を加えた場合、市販ビールの範囲内の風味プロファイルが得られた。この保持期間の温度は21℃であり、風味形成のための保持期間中の酸素への液体の曝露の最小化の重要性が実験的に証明された。プロセスに2日間の保持期間が加えられて複雑さが増すが、7日間から14日間かかる商業的バッチ発酵よりも依然として有意に速い。

40

【0497】

したがって、理想的なシナリオは、連続主発酵バイオリアクターにおける条件の最適化によって二次保持期間を完全に排除することである。しかし、保持温度（酵母によるダイアセチル除去は温度依存性が非常に高い）の最適化、保持期間開始時に液体中に残存する発酵性糖の量、酵母存在濃度、保持容器の水力学的特徴（ダイアセチルの除去を酵母とビールとの間の接触の改良によって改良することができる）、およびこの段階由来の酸素を除去するためのさらなる基準の獲得によって短期間で二次保持時間をさらに減少させることができる。

【0498】

50

他の研究者 (Kronlof and Virkajarvi、1996 ; Nakanishiら、1993 ; Yamauchiら、1995) は、連続発酵 (好氣的) の第1段階により麦汁中に存在する発酵性糖が部分的に消費されるのみである多段階連続発酵の開発に注目した。この戦略は風味生成に関してはいくらか成功したが、これらの系は複雑である。同様に、このような系の第1の好氣的段階は微生物汚染により感受性の高い環境を作り出す (すなわち、高い糖濃度、温度、および酸素ならびに低エタノール濃度)。本研究中に存在するガスリフトバイオリアクターでは、バイオリアクターは、発酵性糖濃度が低く、pHが低く、エタノール濃度が高く、酸素濃度が低く、潜在的な汚染物質に酷な環境を作り出す。開発が不十分な醸造所では、複雑さの最小化および強力な汚染耐性プロセスの開発が重要な成功要因である。

【0499】

10

α -アセトラクトデカルボキシラーゼ (ALDC) の市販の調製物の連続発酵に供給する麦汁への添加による平均ダイアセチル還元率は46%であった。しかし、ALDCは遺伝子改変生物 (GM0) によって生成される酵素であるので、このような酵素を市販用製品で使用する前に公衆の認識に関する問題に取り組むことが必要である。また、ダイアセチル制御用の市販の酵素は発酵条件下で最適な活性を示さない。

【0500】

κ -カラギーナンゲル固定化を使用した6ヶ月にわたる連続発酵では、液相中に自由に懸濁した細胞の生存率は90%を越えて保持されている一方で、固定化細胞の生存率は60%未満に減少した。走査電子顕微鏡写真により、ゲルビーズ周囲に位置付けられた細胞は複数の出芽痕および規則的な形態を有する一方で、ビーズの中心付近に位置付けられた細胞は不規則な形状で出芽痕が少なく、増殖が低下していることが明らかとなった。顕微鏡写真により、ビーズ中心付近に位置付けられた酵母は加齢の兆候を示すことも示唆された。第5節で考察されるように、 κ -カラギーナンゲルは、望ましい酵母固定化マトリックスを作製する多数の特徴を有する。しかし、現在、酵母はビーズ作製プロセスの一部としてマトリックス中に包括されているので、ビーズ製造で利用可能な産業的方法は存在せず、商業的プラントでのビーズ操作は複雑さおよび費用が増大する。自己凝集またはフロック形成などの他の固定化法を、今後調査すべきである。これにより、プラント環境におけるビーズ操作の複雑さが排除され、酵母のフロックが規則的に破壊される場合、加齢した細胞をバイオリアクターから定期的に確実に除去することができる。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0501】

【図1】

図1はパイロットスケールの連続発酵システムのフローシートであり、各部は本明細書の表5. 1にまとめてある。

【図2】

図2は50Lのパイロットスケールのガスリフトドラフト管 (GLDT) バイオリアクターを図式的に示したものである。

【図3】

図3は図2のリアクターの断面図であり、それは内部ドラフト管ならびに内部セパレーターの位置を含む。

40

【図4】

図4は図2のバイオリアクターのヘッドプレートの詳細図である。

【図5】

図5は図2のバイオリアクターのボディーの詳細図である。

【図6】

図6は図2のバイオリアクターの楕円形の底の詳細図である。

【図7】

図7は図2のガスパイプスパージャーの詳細図である。全部で160個の穴 (直径0. 16 cm) が直径1. 27 cmのパイプスパージャーに明けられており、穴の中心から中心までの距離は縦方向で0. 8 cm、横方向で0. 6 cmである。

50

【図 8】

図 8 はスタチックミキサー（Labattの特許出願第2,133,789号）を用いる連続ビーズ生産のダイアグラムである。

【図 9】

図 9 はSchott Engineeringにより供給されるシラン（登録商標）ガラスビーズの写真である。

【図 10】

図 10 はWorld Mineralsにより供給されるセライト（登録商標）珪藻土ビーズの写真である。

【図 11】

図 11 はLabatt Brewing Company Limited（"Labatt"）の研究室において製造されたκ-カラギーナンゲルビーズの写真である。

【図 12】

図 12 は非フロック形成酵母、連鎖形成酵母およびフロック形成酵母をそれぞれ示す写真である。これらの映像は倍率 100 倍の顕微鏡カメラを用いて撮影された。

【図 13】

図 13 は中フロック形成酵母 L C C 3 0 2 1 の倍率 100 倍の顕微鏡写真である。

【図 14】

図 14 は超フロック形成酵母 L C C 2 9 0 の倍率 100 倍の顕微鏡写真である。

【図 15】

図 15 は銅-カラギーナンゲルビーズのスタチックミキサー方により製造を示すダイアグラムである。スタチックミキサーにおいて液体はミキサーを通過し（ミキサーが液体を通るのではない）、液体がポンプでパイプラインを通ることにより混合される。

【図 16】

図 16 はビール主発酵用の別のガスリフトドラフト管バイオリアクターシステムの図式である。

【図 17】

図 17 は図 15 の実物のガスリフトドラフト管バイオリアクターの写真である。

【図 18】

図 18 は図 16 の 13 L（有効体積 8 L）のガスリフト管リアクター容器の詳細図である。

【図 19】

図 19 はバイオリアクター容器のヘッドプレートの詳細図である。1 は酸素センサー用の液体抜き取りポート；2 は温度センサー用サーモウェルであり、サーモスタットコントローラーに接続されている；3 は温度プローブ；4 は酸素センサー用の液体返還ポート；5 は植菌ポート；6 はステンレス鋼キャップ付き膜試料ポート。

【図 20】

図 20 はバイオリアクターの液相中に浸されたフィルターユニットを伴う酸素センサー用液体抜き取りポートの側面図である。

【図 21】

図 21 はガスリフトバイオリアクターシステムを用いる連続ビール主発酵のための装置の詳細およびフロントダイアグラムである（詳細な装置の説明には表 5. 1 参照）。

【図 22】

図 22 はカラギーナンのゲル化機構の図式である（Ress, 1972を適用）。

【図 23】

図 23 は主発酵中の固定化酵母による麦汁成分の利用の図式である。

【図 24】

図 24 はゼロタイム発酵における固定化ラガー酵母を含む銅-カラギーナンゲルビーズの写真である。

【図 25】

10

20

30

40

50

図 2 5 はバッチ発酵 2 日後のカッパーカラギーナンゲルビーズ中にトラップされたラガー酵母の小群の写真であり、個々の酵母細胞上に出芽跡が見られる。

【図 2 6】

図 2 6 はカッパーカラギーナンゲルビーズの外側の端の写真であり、連続発酵 2 日後のラガー酵母細胞が見られる。

【図 2 7】

図 2 7 は連続発酵 2 日後のカッパーカラギーナンゲルビーズ外部領域のラガー酵母細胞の写真である。

【図 2 8】

図 2 8 は連続発酵 2 日後のカッパーカラギーナンゲルビーズ中心部におけるラガー酵母細胞の写真である。 10

【図 2 9】

図 2 9 は 6 ヶ月連続発酵後のカッパーカラギーナンゲルビーズ全体の写真である。多くの破碎されたビーズは中空の中心部を有している。

【図 1】

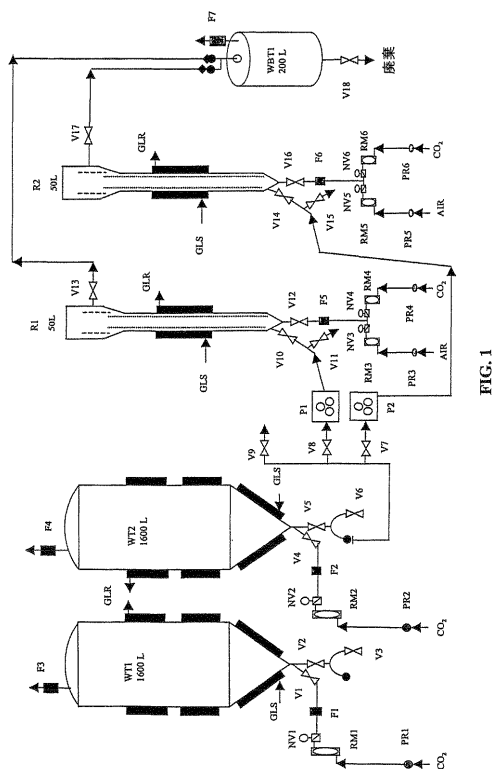


FIG. 1

【図 2】

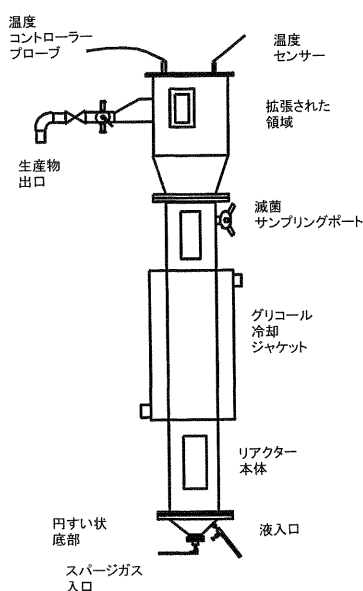


FIG. 2

【図 7】

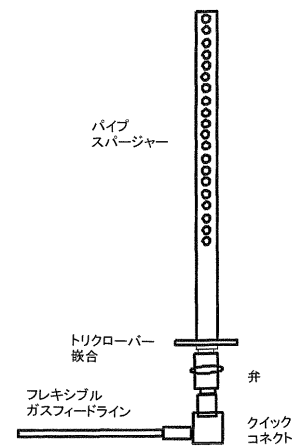


FIG. 7

【図 8】

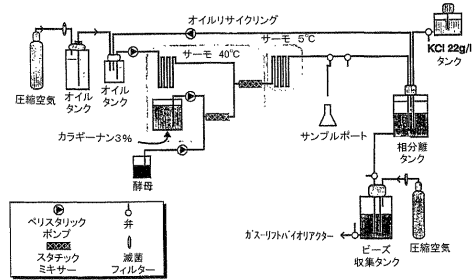


FIG. 8

【図 1 2】

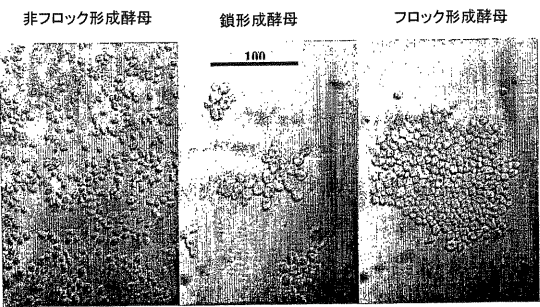


FIG. 12

【図 1 5】

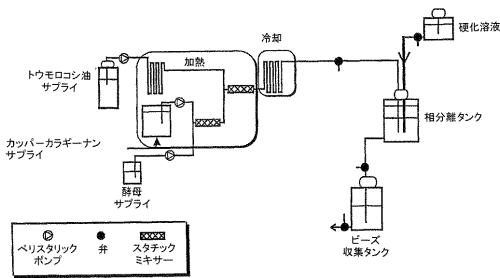


FIG. 15

【図 1 6】

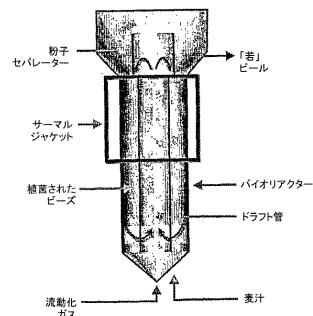


FIG. 16

【図 1 8】

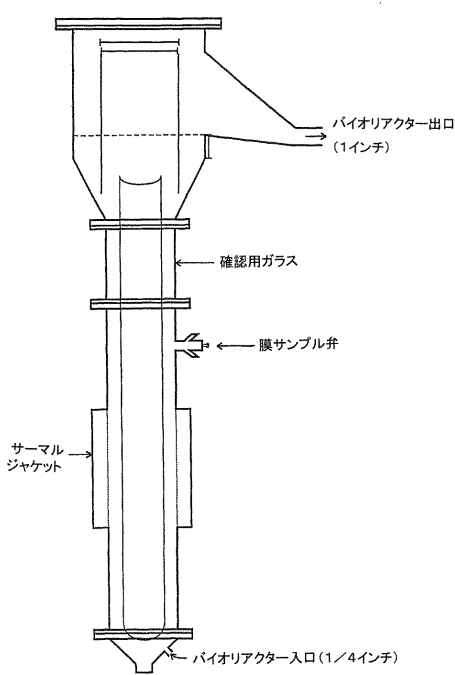


FIG. 18

【 図 1 9 】

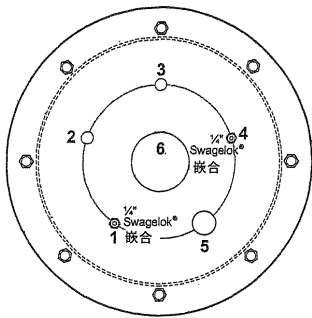


FIG. 19

【 図 2 0 】

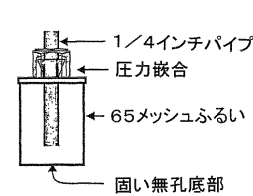


FIG. 20

【 図 2 2 】

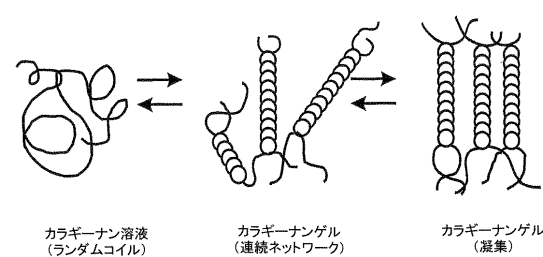


FIG. 22

【 図 2 1 】

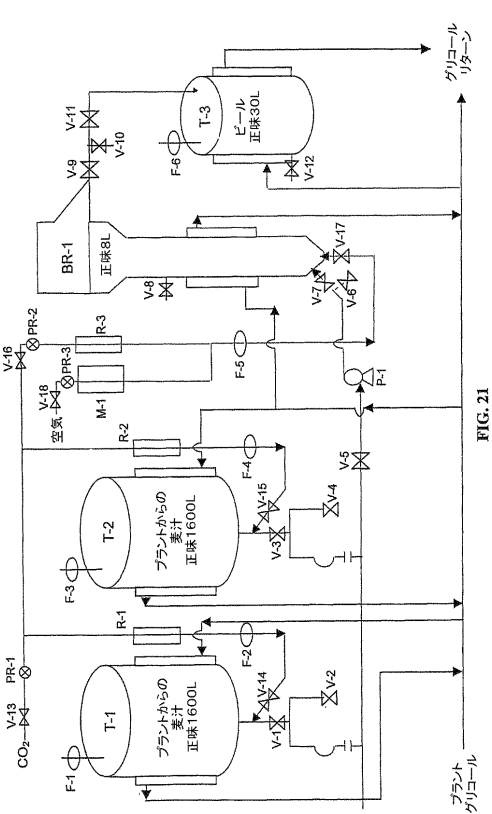


FIG. 21

【 図 2 3 】

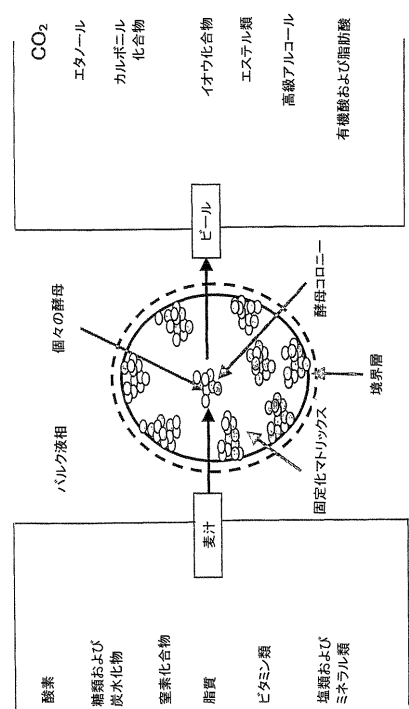


FIG. 23

【図 2 4】

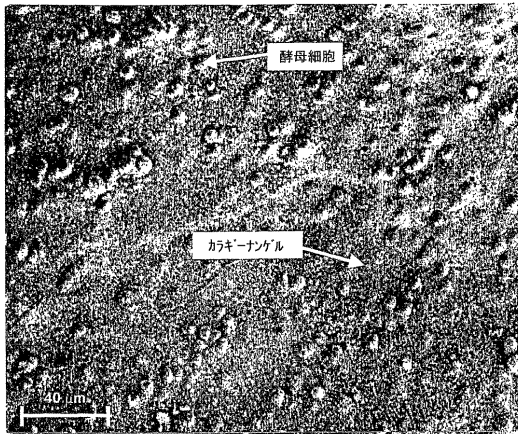


FIG. 24

【図 2 5】

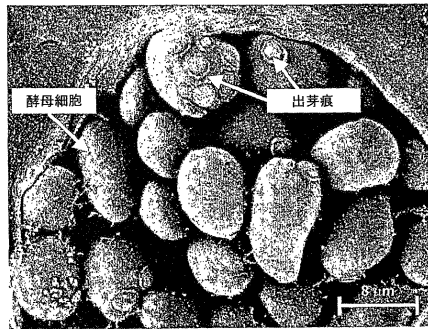


FIG. 25

【図 2 6】

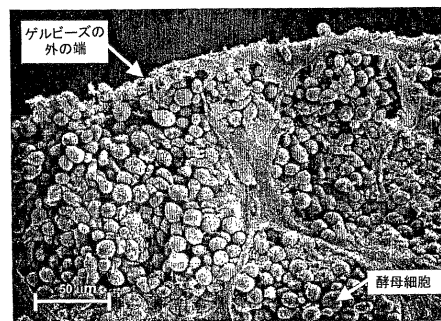


FIG. 26

【図 2 7】

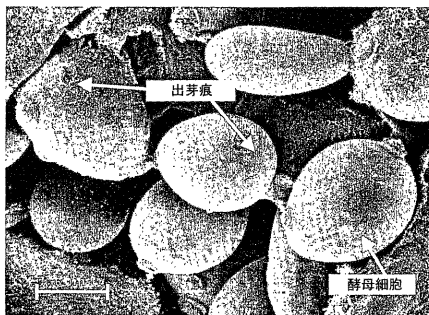


FIG. 27

【図 2 9】

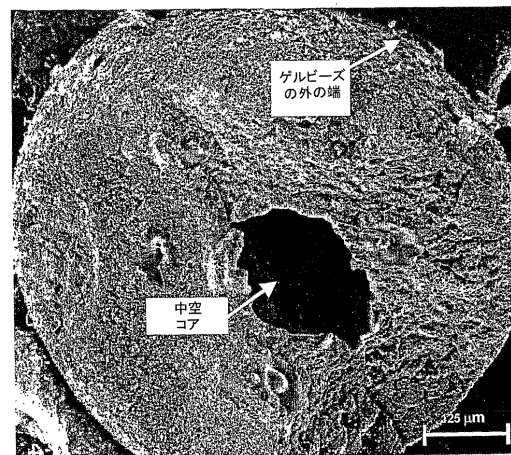


FIG. 29

【図 2 8】

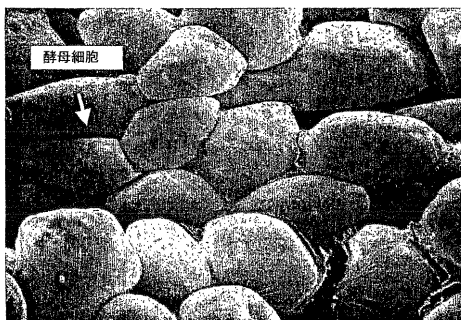


FIG. 28

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102961 A2

- (51) International Patent Classification: C12C 11/02, 11/07, 11/09 (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00970 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 20 June 2002 (20.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/299,153 20 June 2001 (20.06.2001) US
60/299,186 20 June 2001 (20.06.2001) US
- (71) Applicant: LABATT BREWING COMPANY LIMITED [CA/CA]; 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
- (72) Inventors: PILKINGTON, Phyllis, Heather; 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA); MENSOUR, Normand, Anthony; 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
- (74) Agent: KERR, James W.; Labatt Brewing Company Limited, 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/102961 A2

(54) Title: COMBINATION CONTINUOUS/BATCH FERMENTATION PROCESSES

(57) Abstract: In the production of potable alcohols, a continuous fermentation stage is employed to pitch and/or initially ferment a wort containing fermentable sugars. An exemplary continuous stage involves the use of a gas lift bioreactor employing super-flocculant yeast and stringent oxygen control. The continuous stage can then be followed by sending an at least partially fermented discharge from the continuous process is delivered to a batch processing stage for finishing.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

COMBINATION CONTINUOUS/BATCH FERMENTATION PROCESSES

Field of the Invention:

The present invention relates to the production of potable alcohol products, especially beer, and in particular using a hybrid process comprised of continuous and batch fermentation processing stages.

Background of the Invention:

The extensive number of recent publications in this area illustrates the brewing industry's great interest in immobilization. In several reviews (Enari, 1995; Iserentant, 1995; Masschelein, 1997; Mensour *et al.*, 1997; Stewart, 1996; Virkajarvi & Linko, 1999) on the general state of the brewing industry, the possible revolutionary role of immobilization in beer production has been highlighted. In addition to the groups mentioned in sections 3.1 to 3.5, many other institutions have been involved in immobilized cell R&D for brewing applications. The Miller Brewing Company (Duncombe *et al.*, 1996; Tata *et al.*, 1999) from the United States ran some preliminary evaluations on a Meura Delta test unit, as well as on the fluidized bed bioreactor distributed by Schott Engineering. Coors Brewing also performed preliminary experimentation with the Meura Delta system.

The Slovak Technical University, in collaboration with Heineken, investigated the use of calcium pectate gel in an air lift system for the production of beer (Domeny, 1996). More recently, the group from the Slovak Technical University has published several articles on their on-going research (Smogrovicova *et al.*, 1997; Smogrovicova & Domeny, 1999). Guinness initially investigated the use of various adsorption carriers for immobilization and subsequent fermentation in a fluidized bed bioreactor (Donnelly, 1998). In 1999, Donnelly and colleagues published a paper describing the kinetic of sugar metabolism inside their fluidized bed bioreactor (Donnelly *et al.*, 1999). Their experimental setup involved the use of Siran porous glass beads as the immobilization carrier for a top fermenting yeast. Guinness has become part of the Immocon Consortium that was described in section 2.2.5.

Holsten Brauerei AG and Lurgi AG, both from Germany, have jointly developed and operated a pilot plant for the continuous production of alcohol free beer (Dziondzak, 1995). Calcium alginate beads within a single-stage loop fluidized bed fermentor (120 L) were used for fermentation while a sieve bottom column (7 sieve bottoms) was used to dealcoholize the beer. The total production time for this process was 8.5 h.

A team from the Sapporo Breweries Ltd. Brewing Research Laboratories located in Japan studied the use of immobilized cells in a fluidized bed reactor for the main fermentation of beer. Their studies involved the use of polyvinyl alcohol gel beads (Shindo & Kamimur, 1990), Ca-alginate gel beads (Shindo *et al.*, 1994a), double-layered gel fibers (Shindo *et al.*, 1994b) and chitosan gel beads (Shindo *et al.*, 1994c) as immobilization matrices. In the latter study, a one liter working volume bioreactor containing 25% by volume Chitopearl® type II beads (chitosan beads) was operated on a continuous basis with wort treated with glucoamylase. This enzyme treatment allowed for acetate ester formation in the immobilized cell system to be similar to that of conventional batch fermentation, thus one step closer to product matching.

The research group from Sapporo has now focused their attention on the development of a chitosan bead fluidized bed fermenter operating in repeated batch mode. The system was operable for 75 days without

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

2

any major problems and the resulting beer was similar in quality to a commercial product. A non-flocculating strain was shown to be much more effective than a flocculent strain (Maeba et al., 2000; Umemoto et al., 1998).

Two other approaches to diacetyl reduction were presented at the EBC Congress held in Maastricht in 1997. Researchers in France (Dulieu et al., 1997) proposed the use of encapsulated α -acetylaldehyde decarboxylase to rapidly convert α -acetylaldehyde into acetoin. Meura Delta has highlighted preliminary results on the use of an aluminosilicate zeolite as a catalyst for the cold and direct conversion of acetylaldehyde into acetoin (Andries et al., 1997). If such treatments prove to be effective and consumer acceptable, lower cost alternatives to the maturation systems proposed by Culfar and Alfa Laval could become a reality.

Other non-industrial research in the field of immobilization for beer production includes that of the Singapore Institute of Standards and Industrial Research where the use of a thread type of alginate gel particle for use in a packed bed reactor was studied and found to be more favorable than alginate beads (Que, 1993). Mafra and colleagues from the Universidade do Minho in Portugal have discussed the use of a superflocculent yeast strain for the continuous maturation of beer (Mafra et al., 1997). This same research group has also published work on the use of their flocculent yeast within an airlift bioreactor for the production of ethanol (Vicente et al., 1999; Domingues et al., 2000).

Researchers at various academic institutions have also recently investigated the use of immobilization for the production of beer (Argiriou et al., 1996; Bardi et al., 1996; Cashin, 1996; Moll & Duteurtre, 1996; Nedovic et al., 1996a; Nedovic et al., 1996b; Norton et al., 1995; Scott et al., 1995; Wackerbauer et al., 1996a; Wackerbauer et al., 1996b). Research groups from China (Chao et al., 1990; Yuan, 1987; Zhang et al., 1988), Russia (Kolpachki et al., 1980; Sinitsyn et al., 1986) and Czechoslovakia (Chladek et al., 1989; Curin et al., 1987; Polednikova et al., 1981) were also involved in immobilized cell technology and published results in the 1980's.

Numerous references were considered during the background work to the studies upon which the present invention is based. These include:

- Abbott, B.J. 1978. Immobilized cells. In: *Annual Reports on Fermentation Processes*, Ed. Perlman, D., New York: Academic Press, 2: 91.
- Anon. 1994. Maturer[®] L. *Novo Nordisk publication*. B 560c-GB.
- Anon. 1996. Table Curve 2D. *User's Manual, Jandel Scientific*.
- Anon. 1997. Alfa Laval Brewery Systems. *Brewers' Guardian* 126: 26.
- Anon. 1998. Digox 5 Operating Manual. *Dr. Theidig publication*.
- Aquilla, T. 1997. The biochemistry of yeast: debunking the myth of yeast respiration and putting oxygen in its proper place. *Brewing Techniques* 50.
- Aschengreen, N.H., Jepsen, S. 1992. Use of acetylaldehyde decarboxylase in brewing fermentations. *Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section)*, Melbourne 80.
- Atkinson, B. 1986. Immobilised cells, their application and potential. In: *Process engineering aspects of immobilized cell systems*. Ed. Webb, C., Black, G.M., Atkinson, B. Manchester: Institution of Chemical Engineers 3.
- Audet, P., Paquin, C., Lacroix, C. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with kappa-carrageenan - locust bean gel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 11.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

3

PCT/CA02/00970

- Austin, G.D., Watson, R.W.J., Nordstrom, P.A., D'Amore, T. 1994. An on-line capacitance biomass monitor and its correlation with viable biomass. *MBAA Technical Quarterly* 31: 85.
- Axcell, B.C., O'Connor-Cox, E.S.C. 1996. The concept of yeast vitality - an alternative approach. *Proceedings of Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Sect.)*. Singapore 24:64.
- Axelsson, A., Sisak, C., Westrin, B.A., Szajani, B. 1994. Diffusion characteristics of a swelling gel and its consequences for bioreactor performance. *The Chemical Engineering Journal* 55: B35.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Bancel, S., Hu, W. 1996. Confocal laser scanning microscopy examination of cell distribution in macroporous microcarriers. *Biotechnology Progress* 12: 398.
- Barker, M.G., Smart, K.A. 1996. Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54(2): 121.
- Bejar, P., Casas, C., Godia, F., Sola, C. 1992. The influence of physical properties on the operation of a three-phase fluidized-bed fermenter with yeast cells immobilized in calcium alginate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34: 467.
- Bickerstaff, G.F. 1997. Immobilization of enzymes and cells. In: *Immobilization of Enzymes and Cells*, Ed. Bickerstaff, G. F., New Jersey, U.S.A.: Humana Press, Inc. 1.
- Birnbaum, S., Pendleton, R., Larson, P., Mosbach, K. 1981. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of living whole cells. *Biotechnology Letters* 3: 393.
- Budac, D., Margartis, A. 1999. *Personal communication*.
- Bütylkingtör, H. 1992. Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in kappa-carrageenan gels. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53: 173.
- Chahal, P.S. 1992. *Fluoresensor controlled fed-batch production of Cyclosporin-A from Beauveria nivea*. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario.
- Chisti, M.Y. 1989. *Airlift bioreactors*. London: Elsevier Applied Science.
- Chisti, Y., Moo-Young, M. 1993. Improve the performance of airlift reactors. *Chemical Engineering Progress* 6: 38.
- Cho, G.H., Choi, C.Y., Choi, Y.D., Han, M.H. 1982. Ethanol production by immobilised yeast and its carbon dioxide gas effects in a packed bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32: 959.
- Coutts, M.W. 1956. *Britain Patent No. 872,391*.
- Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H., Kahler, M. 1987. Beer production with immobilized yeast. *European Brewing Convention Congress*, Madrid 433.
- Dale, C.J., Hough, J.S., Young, T.W. 1986. Fractionation of high and low molecular weight components from wort and beer by adsorption chromatography using the gel Sephadex LH20. *Journal of the Institute of Brewing* 92(5): 457.
- Daoud, L.S., Searle, B.A. 1986. Yeast vitality and fermentation performance. *Monograph - XII European Brewery Convention - Symposium on Brewers' Yeast*, Helsinki 108.
- de Backer, L., Willaert, R.G., Baron, G.V. 1996. Modelling of immobilized bioprocesses. In: *Immobilized Living Cell Systems Modelling and Experimental Methods*, Ed. Willaert, R. G., Baron, G. V., and de Backer, L., Toronto: John Wiley and Sons. 47.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

4

- de Beer, D., Van den Heuvel, J.C., Ottengraaf, S.P.P. 1993. Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. *Applied Environmental Microbiology* 59: 573.
- Debourg, A., Laurent, M., Goossens, E., Borremans, E., Van De Winkel, L., Masschelein, C.A. 1994. Wort aldehyde reduction potential in free and immobilized yeast systems. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52: 100.
- Dillenhofer, W., Ronn, D. 1996. Secondary fermentation of beer with immobilized yeast. *Brauwelt International* 14: 344.
- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986a. Effects of hydroxyurea on immobilized and suspended yeast fermentation rates and cell cycle operation. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1814.
- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986b. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 73.
- dos Santos, V.A.P.M., Bruijse, M., Tramper, J., Wijffels, R.H. 1996. The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized micro-organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 447.
- Driessen, W., Habets, L., Vereijken, T. 1997. Novel anaerobic and aerobic process to meet strict effluent plant design requirements. *Proceedings of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Auckland 148.
- Dulieu, C., Boivin, P., Dautzenberg, H., Poncelet, D. 1996. Immobilized enzyme system to avoid diacetyl formation: a new tool to accelerate beer maturation. *International Workshop on Bioencapsulation*, Potsdam 22.
- Dunbar, J., Campbell, S.L., Banks, D.J., Warren, D.R. 1988. Metabolic aspects of a commercial continuous fermentation system. *Proceedings of the Convention of the Institute of Brewing*, Brisbane 151.
- Estapé, D., Gòdia, F., Solà, C. 1992. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 396.
- Evans, H.A.V., Cleary, P. 1985. Direct Measurement of Yeast and Bacterial Viability. *Journal of the Institute of Brewing* 91: 73.
- Fan, L.-S. 1989. *Gas-Liquid-Solid Fluidization Engineering*. Boston: Butterworths.
- Fernandez, E. 1996. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging. In: *Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods*. Toronto: John Wiley and Sons, Chapter 6.
- García, A.I., García, L.A., Díaz, M. 1994. Prediction of ester production in industrial beer fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 16(1): 66.
- Geankoplis, C.J. 1993. *Transport Processes and Unit Operations*. New Jersey: Prentice Hall P.T.R.
- Gee, D.A., Ramirez, W.F. 1994. A flavour model for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 321.
- Geiger, K.H., Compton, J. 1957. *Canada Patent No. 545,867*.
- Gekas, V.C. 1986. Artificial membranes as carriers for the immobilization of biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 450.
- Gift, E.A., Park, H.J., Paradis, G.A., Demain, A.L., Weaver, J.C. 1996. FACS-based isolation of slowly growing cells: double encapsulation of yeast in gel microdrops. *Nature Biotechnology* 14: 884.
- Gikas, P., Livingston, A.G. 1993. Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1337.

WO 02/102961

5

PCT/CA02/00970

- Gikas, P., Livingston, A.G. 1996. Viability of immobilised cells: use of specific ATP levels and oxygen uptake rates. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 11:264.
- Gilson, C.D., Thomas, A. 1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 62: 38.
- Gòdia, F., Casa, C., Castellano, B., Solà, C. 1987. Immobilized cells: behavior of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 342.
- Gopal, C.V., Hammond, J.R.M. 1993. Application of immobilized yeasts for fermenting beer. *Brewing and Distilling International* 24: 72.
- Hammoun, B.J.M., Stephanopoulos, G. 1986. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 829.
- Hardwick, W.A. 1995. *Handbook of Brewing*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hayat, M.A. 1972. *Basic Electron Microscopy Techniques*. Toronto: van Nostrand Reinhold Co. 96.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R., Weltevrede, R., Mulder, A. 1993. Development and scale-up of an aerobic biofilm air-lift suspension reactor. *Water Science and Technology* 27: 253.
- Higbie, R. 1935. The role of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Transactions of the American Institute of Chemical Engineers* 31: 365.
- Hines, A.L., Maddox, R.N. 1985. *Mass Transfer Fundamentals and Applications*. U.S.A.: Prentice-Hall, Inc.
- Hinfray, C., Jouenne, T., Junter, G. 1994. Ethanol production from glucose by free and agar-entrapped batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* at different oxygenation levels. *Biotechnology Letters* 16: 1107.
- Hoekstra, S.F. 1975. Wort composition, a review of known and unknown facts. *Proceedings of the European Brewery Convention*, Nice 465.
- Hooijmans, C.M., Ras, C., Luyben, K.Ch.A.M. 1990. Determination of oxygen profiles in biocatalyst particles by means of a combined polarographic oxygen microsensor. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 178.
- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Young, T.W. 1982. Metabolism of wort by yeast. In: *Malting and Brewing Science Volume 2 Hopped Wort and Beer*, Ed. Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., and Young, T. W., London, U.K.: Chapman and Hall. 566.
- Hüsken, L.E., Tramper, J., Wijffels, R. 1996. Growth and eruption of gel-entrapped microcolonies. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 336.
- Hutter, K.J. 1996. Flow-cytometric analyses for assessment of fermentative ability of various yeasts. *Brauwelt International* 1: 52.
- Hwang, S.-J., Fan, L.-S. 1986. Some design consideration of a draft tube gas-liquid-solid spouted bed. *The Chemical Engineering Journal* 33: 49.
- Imai, T. 1996. Recent advances in the determination of yeast vitality. *Proceedings of the Congress of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Singapore 24: 60.
- Inloes, D.S., Taylor, D.P., Cohen, S.N., Michaels, A.S., Robertson, C.R. 1983. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 264.
- Inoue, T. 1987. Possibilities opened by "new biotechnology" and application of immobilized yeast to beer brewing. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewery Co., Ltd.* 7.

WO 02/102961

6

PCT/CA02/00970

Inoue, T. 1992. A review of diacetyl control technology. *Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section)*, Melbourne 76.

Jepsen, S. 1993. Using ALDC to speed up fermentation. *Brewers' Guardian*. 55.

Jones, M., Pierce, J.S. 1964. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing* 70: 307.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1984. A review of yeast ionic nutrition – Part I: growth and fermentation requirements. *Process Biochemistry* 19(2): 48.

Jones, R.P., Pamment, N., Greenfield, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeast – the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry* 16(3): 42.

Kara, B.V., David, I., Searls, B.A. 1987. Assessment of yeast quality. *Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention*, Madrid, 21: 409.

Karamanev, D.G. 1991. Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 10: 51.

Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science* 40: 1321.

Kasten, F.H. 1993. Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications. In: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Ed. Mason, W. T. London, U.K.: Academic Press Limited 12.

Klopper, W.J. 1974. Wort composition, a survey. *European Brewery Convention Monograph 1. Wort Symposium*, Zeist 8.

Korgel, B.A., Rotem, A., Monbouquette, H.G. 1992. Effective diffusivity of galactose in calcium alginate gels containing immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Progress* 8: 111.

Kreger-Van Rij, N. 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Kronlöf, J., Virkajärvi, I. 1996. Main fermentation with immobilized yeast - pilot scale. *Proceedings of the European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 94.

Kunze, W. 1996. *Technology Brewing and Malting*. Berlin: VLB.

Kuriyama, H., Ishibashi, H., Umeda, I.M.T., Kobayashi, H. 1993. Control of yeast flocculation activity in continuous ethanol fermentation. *Journal of Chemical Engineering Japan* 26(4): 429.

Kurosawa, H., Matsamura, M., Tanaka, H. 1989. Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 926.

Kurosawa, H., Tanaka, H. 1990. Advances in immobilized cell culture: development of a co-immobilized mixed culture system of aerobic and anaerobic micro-organisms. *Process Biochemistry International* 25: 189.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study, Fourth Edition*. Amsterdam: Elsevier 361.

Kyung, K.H., Gerhardt, P. 1984. Continuous production of ethanol by yeast "immobilized" in a membrane-contained fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 252.

Lee, S.S., Robinson, P.M., Wang, H.Y. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 11*, Gatlingburg, USA 641.

Leitini, A. 1993. A review of the various methods available for monitoring the physiological status of yeast: yeast viability and vitality. *Ferment* 6: 321.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

7

- Lentini, A., Takis, S., Hawthorne, D.B., Kavanagh, T.E. 1994. The influence of trub on fermentation and flavour development. *Proceedings of the 23rd Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Sydney 89.
- Leudeking, R. 1967. Fermentation process kinetics. In: *Biochemical and Biological Engineering*, Ed. Blakebrough, N., London: Academic Press, Inc. 203.
- Leudeking, R., Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1: 393.
- Lewandowski, Z., Altobelli, A., Fukushima, E. 1993. NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnology Progress* 9: 40.
- Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S. 1995. Experimental and conceptual studies on mass transport in biofilms. *Water Science Technology* 31: 153.
- Lewis, M., Young, T. 1995. *Brewing*. London: Chapman and Hall.
- Li, J., Humphrey, A.E. 1991. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 1043.
- Lim, H.-S., Han, B.-K., Kim, J.-H., Peshwa, M.V., Hu, W.-S. 1992. Spatial distribution of mammalian cells grown on macroporous microcarriers with improved attachment kinetics. *Biotechnology Progress* 8: 486.
- Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N. 1996. Effect of flocculation characteristics on immobilized yeast performance. *European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 102.
- Lloyd, D., Moran, C.A., Suller, M.T.E., Dinsdale, M.G. 1996. Flow cytometric monitoring of rhodamine 123 and a cyanine dye uptake by yeast during cider fermentation. *Journal of Institute of Brewing* 102: 251.
- Lundberg, P., Kuchel, P.W. 1997. Diffusion of solutes in agarose and alginate gels: ¹H and ²³Na PFGSE and ²³Na TQF NMR studies. *Magnetic Resonance in Medicine* 37: 44.
- Margaritis, A., te Bokkel, D.W., El Kashab, M. 1987. Repeated batch fermentation of ethanol using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a fluidized bioreactor system. In: *Biological Research on Industrial Yeasts*, Ed. Stewart, G.G., Russell, I., Klein, R.D., Hiebsch, R.R., Boca Raton: CRC Press 121.
- Margaritis, A., Wallace, J.B. 1982. The use of immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in a novel fluidized bioreactor to produce ethanol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 147.
- Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978a. The rotorfermentor. Part I: description of the apparatus, power requirements, and mass transfer characteristics. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 709.
- Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978b. The rotorfermentor. Part II: application to ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 727.
- Marris, W.M. 1998. The stability of carrageenans to processing. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 9*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 218: 345.
- Martens, F.B., Egberts, G.T.C., Kempers, J., Robles de Medina, M.H.L., Welton, H.G. 1986. *European Brewing Convention Monograph XII, Symposium on Brewing Yeast*, Helsinki 339.
- Masschelein, C.A. 1990. Yeast metabolism and beer flavour. *Proceedings of the Third Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling* 103.
- Masschelein, C.A., Carlier, A., Ramos-Jeunehomme, C., Abe, I. 1985. The effect of immobilization on yeast physiology and beer quality in continuous and discontinuous systems. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress*, Helsinki 339.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

8

- Masschelein, C.A., Ramos-Jeunhomme, C. 1985. The potential of alginate immobilized yeast in brewery fermentations. *Institute of Brewing Central and Southern African Section Proceedings of the 1st Scientific and Technical Convention*, Johannesburg 392.
- Masschelein, C.A., Vandenbussche, J. 1999. Current outlook and future perspectives for immobilized yeast technology in the brewing industry. *Brewers' Guardian* 28(4): 35.
- Masters, B.R., Thaeer, A.A. 1994. Real-time scanning slit confocal microscopy of the *in vivo* human cornea. *Applied Optics* 33: 695.
- Meilgaard, M. 1982. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition, *Brygmesteren* 5.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1996. Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 661.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 363.
- Merchant, F.J.A. 1986. *Diffusivity Characteristics of Glucose in Alginate Immobilization Matrices*. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario.
- Merchant, F.J.A., Margaritis, A., Wallace, J.B. 1987. A novel technique for measuring solute diffusivities in entrapment matrices used in immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 30: 936.
- Mochaba, F.M. 1997. A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 99.
- Mochaba, F., O'Connor-Cox, E.S.C., Axcell, B.C. 1998. Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(1): 1.
- Muhr, A.H., Blanshard, J.M.V. 1982. Diffusion in gels. *Polymer* 23: 1012.
- Mulder, M.H.V., Smolders, C.A. 1986. Continuous ethanol production controlled by membrane processes. *Process Biochemistry* 21: 35.
- Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A., Mitsui, S. 1993. Beer brewing using an immobilized yeast bioreactor system. *Bioprocess Technology* 16: 275.
- Nakanishi, K., Onaka, T., Inoue, T. 1986. A new immobilized yeast reactor system for rapid production of beer. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewing Company* 13.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984a. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (I) formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(2): 73.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984b. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (II) theoretical aspect for the formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(4): 175.
- Nakatani, K., Fukui, N., Nagami, K., Nishigaki, M. 1991. Kinetic analysis of ester formation during beer fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49(4): 152.
- Narziß, L., Miedaner, H., Graf, P., Eichhorn, P., Lustig, S. 1993. Technological approach to improve flavour stability. *MBAA Technical Quarterly* 30: 48.
- Nava Saucedo, J.E., Roisin, C., Barbotin, J.-N. 1996. Complexity and heterogeneity of microenvironments in immobilized systems. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 39.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

9

- Nedovic, A.N., Vrnjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I., Cutkovic, M. 1996. A study on considerably accelerated fermentation of beer using an airlift bioreactor with calcium alginate entrapped yeast cells. *Fifth World Congress of Chemical Engineering* 2: 474.
- Neufeld, R. J., Poncellet, D.J., Norton, S.D. 1996. *Application for Canadian Patent No. 2133789*.
- Norton, S., D'Amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 365.
- Norton, S., Watson, K., D'Amore, T. 1995. Ethanol tolerance of immobilized brewer's yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 18.
- O'Connor-Cox, E., Mochaba, F.M., Lodolo, E.J., Majara, M., Axcell, B. 1997. Methylene blue staining: use at your own risk. *MBAA Technical Quarterly* 34(1): 306.
- O'Reilly, A.M., Scott, J.A. 1995. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 636.
- Okazaki, M., Hamada, T., Fujii, H., Mizobe, A., Matsuzawa, S. 1995. Development of poly(vinyl alcohol) hydrogel for waste water cleaning. I. Study of poly(vinyl alcohol) gel as a carrier for immobilizing organisms. *Journal of Applied Polymer Science* 58: 2235.
- Oldshue, J.Y., Herbst, N.R. 1992. *A Guide to Fluid Mixing*. New York: Lightnin.
- Opelkarova, M., Sigler, K. 1982. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast). *Folia Microbiologica* 27: 395.
- Øyaas, J., Storro, I., Svendsen, H., Levine, D.W. 1995. The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 47: 492.
- Paiva, T.C.B., Sato, S., Visconti, A.E.S., Castro, L.A.B. 1996. Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58(0): 55.
- Pajunen, E., Mäkinen, V., Gíslar, R. 1987. *Secondary fermentation with immobilized yeast*. *European Brewery Convention Congress*, Madrid 441.
- Parascandola, P., de Alteriis, E. 1996. Pattern of growth and respiratory activity of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) cells growing entrapped in an insolubilized gelatin gel. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23: 7.
- Perry, R.H., Green, D.W. 1984. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. 1998a. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology* 18(2 & 3): 237.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I. 1998b. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 104: 19.
- Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I., Russell, I. 1999. Kappa-carrageenan gel immobilization of lager brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 105(6): 398.
- Polson, A. 1950. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *Journal of Physical and Colloidal Chemistry* 54: 649.
- Power, D.A., McCuen, P.J. 1988. *Manual of BBL® Products and Laboratory Procedures, Sixth Edition*. Maryland: Becton Dickinson Microbiology Systems 249.
- Priest, F.G., Campbell, I. 1996. *Brewing Microbiology 2nd Ed.*, UK: Chapman and Hall.

WO 02/102961

10

PCT/CA02/00970

- Rees, D.A. 1972. Polysaccharide gels: a molecular view. *Chemistry and Industry* 19: 630.
- Roca, E., Camesselle, C., Nunez, M. 1995. Continuous ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilised in Ca-alginate beads hardened with Al^{3+} . *Biotechnology Letters* 9: 815.
- Roukas, T. 1994. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59: 387.
- Russell, I., Stewart, G.G. 1992. Contribution of yeast and immobilization technology to flavour development in fermented beverages. *Food Technology* 148.
- Ryder, D.S. 1985. The growth process of brewing yeast and the biotechnological challenge. *MBAA Technical Quarterly* 22: 124.
- Ryu, D.D., Kim, Y.J., Kim, J.H. 1984. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 12.
- Salmon, P.M., Robertson, C.R. 1987. Mass transfer limitations in gel beads containing growing immobilized cells. *Journal of Theoretical Biology* 125: 325.
- Schumpe, A., Quicker, G., Deckwer, W.-D. 1982. Gas solubilities in microbial culture media. *Advances in Biochemical Engineering* 24: 1.
- Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. 1994. Suppression of alpha-acetolactate formation in brewing with immobilized yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 69.
- Smart, K.A. 1995. The importance of the brewing yeast cell wall. *Brewers' Guardian* 124(4): 44.
- Smart, K.A. 1999. Ageing in brewing yeast. *Brewers' Guardian* 19.
- Smart, K.A., Chambers, K.M., Lambert, I., Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57(1):18.
- Sharpe, F.R. 1988. Assessment and control of beer flavour. *Journal of the Institute of Brewing* 95: 301.
- Stewart, G.G. 1977. Fermentation – yesterday, today and tomorrow. *MBAA Technical Quarterly* 14: 1.
- Stewart, G.G., Russell, I. 1986. The relevance of the flocculation properties of yeast in today's brewing industry. *European Brewery Convention Symposium on Brewers' Yeast*, Helsinki 53.
- Stewart, G.G., Lyness, A., Younis, O. 1999. The control of ester synthesis during wort fermentation. *MBAA Technical Quarterly* 36(1): 61.
- Takahashi, S. and Kimura, Y. 1996. Effect of main fermentation parameters on stale flavour. *Brauwelt International* 14 (3): 253.
- Taylor, D.G. 1989. Influence of brewhouse practice on wort composition. *Brewer's Guardian* 118(2): 30.
- Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (ASBC). 1992. *Methods of Analysis*. 8th Edition. Minnesota: ASBC.
- Utamlal, M., Walt, D.R. 1995. A fiber-optic carbon dioxide sensor for fermentation monitoring. *Biotechnology* 13: 597.
- Venâncio, A., Teixeira, J.A. 1997. Characterization of sugar diffusion coefficients in alginate membranes. *Biotechnology Techniques* 11: 183.
- Vilachá, C., Uhlir, K. 1985. The measurement of low levels of oxygen in bottled beer. *Brauwelt International* 70.
- Virkajärvi, I., Kronlöf, J. 1998. Long-term stability of immobilized yeast columns in primary fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(2): 70.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

11

PCT/CA02/00970

- Vives, C., Casas, C., Gòdia, F., Solà, C. 1993. Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in calcium alginate beads and observation on their growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 467.
- Wada, M., Kato, J., Chibata, I. 1979. A new immobilization of microbial cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 8: 241.
- Wang, H.Y., Lee, S.S., Takach, Y., Cawthon, L. 1982. Maximizing microbial cell loading in immobilized-cell systems. *Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 12* 139.
- Westrin, B.A., Axelsson, A. 1991. Diffusion in gels containing immobilized cells: a critical review. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 439.
- Wheatcroft, R., Lim, Y.M., Hawthorne, D.B., Clarke, B.J., Kavanagh, T.E. 1988. An assessment of the use of specific oxygen uptake measurements to predict the fermentation performance of brewing yeasts. *The Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section) Proceedings of the Twentieth Convention*, Brinsbane 193.
- White, F.H., Portno, A.D. 1978. Continuous fermentation by immobilized brewers yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 84: 228.
- Wijffels, R.H., de Gooijer, C.D., Schepers, A.W., Tramper, J. 1996. Immobilized-cell growth: diffusion limitation in expanding micro-colonies. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* Ed. Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 249.
- Wijffels, R.H., Englund, G., Hunik, J.H., Leenen, J.T.M., Bakketun, A. et al. 1995. Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying microorganisms at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* 45: 1.
- Aivasidis, A., 1996. Another Look at Immobilized Yeast Systems. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 27.
- Aivasidis, A., Wandrey, C., Eils, H.-G. & Katzke, M., 1991. Continuous Fermentation of Alcohol-Free Beer with Immobilized Yeast in Fluidized Bed Reactors. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Lisbon, 1991*, 569.
- Akiyama-Jibiki, M., Ishibiki, T., Yamashita, H. & Eto, M., 1997. A Rapid and Simple Assay to Measure Flocculation in Brewer's Yeast. *Master Brewers of the Americas Technical Quarterly*, 34, 278.
- Alfa Laval Brewery Systems, 1997. Immobilized Yeast System Reduces Maturation Time. *Brewers' Guardian*, 126, 26.
- Alfa Laval Brewery Systems, 1996. *Continuous Maturation of Beer with Immobilized Yeast*, Company Report.
- Al Taweel, A.M. & Walker, L.D., 1983. Liquid Dispersion in Static In-line Mixers. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 61, 527.
- Andries, M., Derdelinckx, G., Ione, K.G., Delvaux, F., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1997a. Zeolites as Catalysts for the Cold and Direct Conversion of Acetolactate into Acetoin. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 48.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1995. Design of a Multi-Purpose Immobilized Yeast Bioreactor System for Application in the Brewing Process. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 134.

WO 02/102961

12

PCT/CA02/00970

- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1996a. Design and Application of an Immobilized Loop Bioreactor for Continuous Beer Fermentation. in *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, eds.) Amsterdam: Elsevier Science, 672.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschelein, C.A., 1996b. Design and Applications of an Immobilized Loop Bioreactor to the Continuous Fermentation of Beer. *Proceedings of the 6th International Brewing Technology Conference*, Harrogate, 380.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschelein, C.A., 1997b. Practical Results Using the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentation System. *Brewers' Guardian*, 26.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschelein, C.A., 1997c. First Results on Semi-Industrial Continuous Fermentation with the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 34, 119.
- Argiriou, T., Kanellaki, M., Voliotis, S. & Koutinas, A.A., 1996. Kissiris-Supported Yeast Cells: High Biocatalytic Stability and Productivity Improvement by Successive Preservatives at 0 °C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 4028.
- Audet, P. & Lacroix, C., 1989. Two Phase Dispersion Process for the Production of Biopolymer Gel Beads: Effects of Barious Parameters on Bead Size and their Distribution. *Process Biochemistry*, 24, 217.
- Axelsson, A. & Persson, B., 1988. Determination of Effective Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Plates with Varying Yeast Cell Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 18, 231.
- Bardi, E.P., Koutinas, A.A., Soupioni, M.J. & Kanellaki, M.E., 1996. Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperature Brewing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 463.
- Berkman, P. D. & Calabrese, R. V., 1988. Dispersion of Viscous Liquids by Turbulent Flow in a Static Mixer. *American Institute of Chemical Engineering Journal*, 34, 602.
- Borreman, E., 1997. Secondary Fermentation of Beer with Immobilized Yeast. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 33.
- Bower, J.L. & Christensen, C.M., 1995. Disruptive Technologies: Catching the Wave. *Harvard Business Review*, 73, 43.
- Breitenblicher, K. & Mistle, M., 1995. Fluidized Bed Fermenters for the Continuous Production of Non-Alcoholic Beer with Open-Pore Sintered Glass Carriers. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 77.
- Brewers Association of Canada, 1988. *About Beer And The Brewing Industry*, Ottawa, Ontario.
- Broderick, Harold M., 1979. *The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry*, 2nd Ed. Impressions Inc., Wisconsin.
- Burns, J.A., 1937. *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 31.
- Calleja, G.B. & Johnson, B.F., 1977. A Comparison of Quantitative Methods for Measuring Yeast Flocculation. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 68.
- Carberry, J.J., 1976. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*, McGraw-Hill.
- Carberry, J.J. & Varma, A., 1987. *Chemical Reaction and Reactor Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Cashin, M.-M., 1996. Comparative Studies of Five Porous Supports for Yeast Immobilization by Adsorption/Attachment. *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 5.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

13

PCT/CA02/00970

- Champagne, C.P., 1994. Overview: Immobilized Cell Technology in Food Processing. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 33.
- Chang, C.M., Lu, W.J., Own, K.S. & Hwang, S.J., 1994. Comparison of Airlift and Stirred Tank Reactors for Immobilized Enzyme Reactions. *Process Biochemistry*, **29**, 133.
- Chao, X., Ye, G. & Shi, S., 1990. Kinetic Study of the Continuous Fermentative Process of Green Beer Production with Immobilized Yeast. *Huagong Jixie*, **17**, 18.
- Chibata, I., 1979. Immobilized Microbial cells with Polyacrylamide Gel and Carrageenan and their Industrial Applications. American Chemical Society Series, **106**, 187.
- Chisti, M.Y., 1991. *Airlift Bioreactors*, Elsevier Applied Science, New York.
- Chisti, Y. & Moo-Young, M., 1993. Improve the Performance of Airlift Reactors. *Chemical Engineering Progress*, **6**, 38.
- Chladek, L., Voborsky, J., Sima, J. & Hosek, Z., 1989. *Prumysl Potravin*, **40**, 590.
- Coe, H.S. & Cleveuger, G.H., 1916. Methods for Determining the Capacities of Slime Thickening Tanks. *Transcript of the American Institute of Mechanical Engineering*, **55**, 356.
- Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1987. Beer Production with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention, Madrid*, 433.
- Decamps, C. & Norton, S., 1994. New Emulsion Process using Static Mixer for the Production of □-Carrageenan Gel Beads. Labatt Breweries of Canada Internal Report.
- Del Pozo, M., Briens, C.L. & Wild, G., 1994. Effect of Liquid Coalescing Properties on Mass Transfer, Heat Transfer and Hydrodynamics in a Three-Phase Fluidized Bed. *The Chemical Engineering Journal*, **55**, 1.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996a. Alfa Laval/Schott System of Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *Brewing & Distilling International*, **27**, 35.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996b. Secondary Fermentation of Beer With Immobilized Yeast. *Brauwelt International*, **14**, 344.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996c. Continuous Maturation of Beer. *Beverage World International*, **34**.
- Domeny, Z., Smogrovicova, D., Gemeiner, P., Malovikova, A. & Sturdik, E., 1996. Calcium Pectate Gel to Immobilize Yeast for Continuous Beer Production. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group V, Potsdam, Germany*, Poster 12.
- Domingues, L., Lima, N. & Teixeira, J.A., 2000. Contamination of a High-Cell-Density Continuous Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 584.
- Donnelly, D., 1998. Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Annual Convention*, Minneapolis, Poster 8.
- Donnelly, D., Bergin, J., Gardiner, S. & Cahill, G., 1998. Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **36**, 183.
- Dulieu, C., Boivin, P., Malanda, M., Dautzenberg, H. & Poncelet, D., 1997. Encapsulation of α-Acetolactate Decarboxylase to Avoid Diacetyl Formation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 44.
- Duncombe, D., Bower, P., Bromberg, S., Fehring, J., Lau, V. & Tata, M., 1996. The Contribution of Free Cells in an Immobilized Yeast System. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Poster Presentation.

WO 02/102961

14

PCT/CA02/00970

- Dziondzia, K. & Seiffert, T., 1995. Process for the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 301.
- Enari, T.-M., 1995. State of the Art of Brewing Research. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 1.
- Fix, G., 1989. Principles of Brewing Science. Brewers Publications, USA.
- Fouhy, K. & Parkinson, G., 1996. Brewers Break with Tradition. *Chemical Engineering*, 103, 45.
- Gil, G.H., 1991. Continuous Ethanol Production in a Two-Stage, Immobilized and Suspended Cell Bioreactor (Alcohol Dehydrogenase). *Ph.D. Thesis*, Georgia Institute of Technology.
- Gilliland, R.B., 1951. The Flocculation Characteristics of Brewing Yeasts During Fermentation. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 8, 35.
- Groboillot, A., D.K. Boadi, D. Poncelet & Neufeld, R.J., 1994. Immobilization of Cells for Application in the Food Industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 75.
- Haikara, A., Virkajarvi, I., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Microbial Contaminations in Immobilized Yeast Bioreactors for Primary Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 439.
- Heggart, H.M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R.J., Dowhamick, T.M. & Russell, I., 1999. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 383.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W. & Hoeks, F., 1989. Review on the Application of Anaerobic Fluidized Bed Reactors in Waste-Water Treatment. *The Chemical Engineering Journal*, 41, B 37.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Weltevrede, R., Hols, J. & van Leeuwen, H.L.J.M., 1991. Large Scale Anaerobic-Aerobic Treatment of Complex Industrial Waste-Water Using Biofilm Reactors. *Water Science Technology*, 23, 1427.
- Heijnen, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R.W.R. & Mulder, A., 1993. Development and Scale-Up of an Aerobic Biofilm Air-Lift Suspension Reactor. *Water Science Technology*, 27, 253.
- Helm, E., Nohr, B. & Thorne, R.S.W., 1953. The Measurement of Yeast Flocculence and its Significance in Brewing. *Wallerstein Laboratories Communications*, 16, 315.
- Horitsu, H., Wang, M.Y. & Kawai, K., 1991. A Modified Process for Soy Sauce Fermentation by Immobilized Yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 269.
- Hryciuk, Kevin, Gerry Ginter, Jim Helmke, & Jim Spiers, 1987. *The How's And Why's of Brewing*, Revision #2, LBOC.
- Hunik, J.H., Tramper, J. & Wijffels, R.H., 1994. A Strategy to Scale Up Nitrification Processes with Immobilized Cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering*, 11, 73.
- Hwang, S.-J. & Fan, L.-S., 1986. Some Design Considerations of a Draft Tube Gas-Liquid-Solid Spouted Bed. *The Chemical Engineering Journal*, 33, 49.
- Hyttinen, I., Kronlof, J. & Hartwall, P., 1995. Use of Porous Glass at Hartwall Brewery in the Maturation of Beer with Immobilized Yeast. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 55.
- Ibrahim, Y.A.A., Briens, C.L., Margaritis, A. & Bergougnou, M.A., 1996. Hydrodynamic Characteristics of a Three-Phase Inverse Fluidized Bed Column. *Journal of the American Institute of Chemical Engineering*, 42, 1889.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

15

PCT/CA02/00970

- Inoue, T., 1995. Development of a Two-Stage Immobilized Yeast Fermentation System for Continuous Beer Brewing. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 25.
- Isentant, D., 1995. Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. *Fermented Beverage Production*. (A.G.H. Lea & J.R. Piggott, eds.) London: Chapman & Hall, 45.
- Kaplan, R.S. & Norton, D.P., 1996. The Balanced Scorecard. *President and Fellows of Harvard College, Harvard Business School Press*, Massachusetts, USA.
- Karamanev, D.G., Nagamune, T. & Endo, I., 1992. Hydrodynamic and Mass Transfer Study of a Gas-Liquid-Solid Draft Tube Spouted Bed Bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 47, 3581.
- Karel, S.F., Libicki, S.B. & Robertson, C.R., 1985. The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. *Chemical Engineering Science*, 40, 1321.
- Katzbauer, B., Narodoslawsky, M. & Moser, A., 1995. Classification System for Immobilization Techniques. *Bioprocess Engineering*, 12, 173.
- Kennard, M. & Janekeh, M., 1991. Two- and Three-Phase Mixing in a Concentric Draft Tube Gas-Lift Fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1261.
- Kolot, F.B., 1988. *Immobilized Microbial Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications*. Robert E. Krieger Publishing Company, Florida.
- Kolpachki, A.P., Isaeva, V.S., Kazantsev, E.N. & Fertman, G.I., 1980. Intensification of Wort Fermentation with Immobilized Yeasts. *Fermentnaya i Spirtovaya Promyshlennost*, 9.
- Krikilion, Ph., Andries, M., Goffin, O., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Optimal Matrix and Reactor Design for High Gravity Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 419.
- Kronlof, J., 1994. Immobilized Yeast in Continuous Fermentation of Beer. Ph.D. Thesis, VTT Publications, 167.
- Kronlof, J., Linko, M. & Pajunen, E., 1995. Primary Fermentation with a Two-Stage Packed Bed System Pilot Scale Experiences. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 118.
- Kronlof, J. & Viikajarvi, I., 1996. Main Fermentation with Immobilized Yeast – Pilot Scale *European Brewery Convention Brewing Science Group Bulletin, Zoeterwoude*, 94.
- Kronlof, J., Viikajarvi, I., Storgards, E.L., Lonsborough, J. & Dymond, G., 2000. Combined Primary and Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *World Brewing Congress*, Poster #56.
- Ku, W.Y., 1982. Fermentation Kinetics for the Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells (Biomass). *Ph.D. Thesis*, The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Kunze, W., 1999. *Technology Brewing and Malting*. VLB Berlin, Germany.
- Kynch, G.J., 1952. *Transcripts of the Faraday Society*, 48, 166.
- Lacroix, C., Paquin, C. & Arnaud, J.P., 1990. Batch Fermentation with Entrapped Growing Cells of *Lactobacillus casei*: Optimization of the Rheological Properties of the Entrapment Gel Matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 403.
- Levenspiel, O., 1972. *Chemical Reaction Engineering*. John Wiley & Sons, New York.

WO 02/102961

16

PCT/CA02/00970

- Linko, M., Virkajärvi, I., Pohjola, N., Lindborg, K., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Main Fermentation with Immobilized Yeast – A Breakthrough?. *Proceedings of the European Brewery Convention, Maastricht*, 385.
- Livingston, A.G. & Chase, H.A., 1990. Liquid-Solid Mass Transfer in a Three Phase Draft Tube Fluidized Bed Reactor. *Chemical Engineering Communications*, 92, 225.
- Livingston, A.G. & Zhang, S.F., 1993. Hydrodynamic Behaviour of Three-Phase (Gas-Liquid-Solid) Airlift Reactors. *Chemical Engineering Science*, 48, 1641.
- Lommi, H., 1990. Immobilized Yeast for Maturation and Alcohol-Free Beer. *Brewing and Distilling International*, 21, 23.
- Lommi, H., Gronqvist, A., & Pajunen, E., 1990. Immobilized Yeast Reactor Speeds Beer Production. *Food Technology*, 5, 128.
- Lorenzen, K., 1996. Immobilized Yeast Plants for Alcohol-Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.
- Maeba, H., Umemoto, S., Sato, M. & Shinotsuka, K., 2000. Primary Fermentation with Yeast Immobilized in Porous Chitosan Beads – Pilot Scale Trial. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing – Asia Pacific Section*, 82.
- Maffa, I., Machado Cruz, J.M. & Teixeira, J.A., 1997. Beer Maturation in a Continuously Operating Bioreactor using a Flocculating Brewer's Yeast Strain. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 509.
- Maiorella, B.L., 1983. *Fermentative Ethanol Production (Alcohol, Distillation, Economics)*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- Margaritis, A., 1975. *A Study of the Rotorfermentor and the Kinetics of Ethanol Fermentation*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982a. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part I. Use of Free Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1473.
- Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982b. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part II. Use of Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1483.
- Margaritis, A. & Merchant, F., 1984. Advances in Ethanol Production Using Immobilized Cell Systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1, 339.
- Margaritis, A. & Rowe, G.B., 1983. Ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* Immobilized in Different Carrageenan Gels. *Developments in Industrial Microbiology*, 24, 329.
- Margaritis, A., to Bokkel, D. & El Kashab, M., 1987. Repeated Batch Fermentation of Ethanol Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a Fluidized Bioreactor System. *Biological Research on Industrial Yeasts. Volume I*, (G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein & R.R. Hiebsch, eds.) Boca Raton: CRC Press, 121.
- Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1982. The Use of Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* in a Novel Fluidized Bioreactor to Produce Ethanol. *Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation*, Gatlinburg, Tennessee, 12, 147.
- Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1984. Novel Bioreactor Systems and their Applications. *BioTechnology*, 2, 447.
- Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978a. The Rotorfermentor. Part I: Description of the Apparatus, Power Requirements, and Mass Transfer Characteristics. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 709.

WO 02/102961

17

PCT/CA02/00970

- Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978b. The Rotorfermentor: Part II: Application to Ethanol Fermentation. *Biotechnology & Bioengineering*, **20**, 727.
- Masschelein, C.A., 1997. A Realistic View on the Role of Research in the Brewing Industry Today. *Journal of the Institute of Brewing*, **103**, 103.
- Masschelein, C.A., 1994. State-of-the-Art and Future Developments in Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **52**, 1.
- Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996a. The Meura-Delta Immobilised Yeast Fermenter for the Continuous Production of Beer. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **21**, 28.
- Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996b. Meura-Delta's Immobilized Yeast Fermenter for Continuous Beer Production. *Brewing & Distilling International*, **27**, 16.
- Masschelein, C.A., Andries, M., Franken, F., Van de Winkel, L. & Van Beveren, P.C., 1995. The Membrane Loop Concept: A New Approach for Optimal Oxygen Transfer into High Cell Density Pitching Yeast Suspensions. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 377.
- Masschelein, C.A., Ryder, D.S. & Simon, J-P., 1994. Immobilized Cell Technology in Beer Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 155.
- Matsuura, K., Hirotsune, M., Nakada, F. & Hamachi, M., 1991. A Kinetic Study on Continuous Sake Fermentation. *Hakkokogaku Kaishi*, **69**, 345.
- McCabe, J.T., 1999. The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry. Master Brewers Association of the Americas, USA.
- Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing*, **103**, 363.
- Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1996. Application of Immobilized Yeast Cells in the Brewing Industry. *Immobilized Cells: Basics and Applications*, (R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, eds.) Amsterdam: Elsevier Science, 661.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1995. Gas Lift Systems for Immobilized Cell Fermentation. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 125.
- Mensour, N., Margaritis, A., Russell, I., Briens, C.L., Decamps, C. & Norton, S., 1994. Beer Production with Immobilized Yeast Cells in a Pilot Plant Scale Airlift Reactor. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 49.
- Middleman, S., 1974. Drop Size Distributions Produced by Turbulent Pipe Flow of Immiscible Fluids Through a Static Mixer. *Industrial Engineering and Chemical Process Design and Development*, **13**, 78.
- Mieth, H.O., 1995. Immobilized Yeast Plants for Alcohol Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 166.
- Mistler, M., Breitenbücher, K. & Jaeger, R., 1995. Continuous Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Porous Glass Carriers. *Brewers Digest*, **70**, 48.
- Moll, M. & Duteurtre, B., 1996. Fermentation and Maturation of Beer with Immobilized Microorganisms. *Brauwelt International*, **3**, 248.

WO 02/102961

18

PCT/CA02/00970

- Motai, H., Hamada, T. & Fukushima, Y., 1993. Application of a Bioreactor System to Soy Sauce Production. in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 315.
- Muhr, A.H. & Blanchard, M.V., 1982. Diffusion in Gels. *Polymer*, **23**, 1012.
- Mwesigye, P.K. & Barford, J.P., 1994. Transport of Sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77**, 687.
- Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A. & Mitsui, S., 1993. Beer Brewing Using an Immobilized Yeast Bioreactor System. in *Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 275.
- Nakanishi, K., T. Onaka, T. Inoue & Kubo, S., 1985. A New Immobilized Yeast Reactor System for Rapid Production of Beer. *Proceedings of the 20th European Brewing Convention Congress*, Helsinki, 331.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K. & Kumada, J., 1984. Kinetic Study of Vicinal Diketones in Brewing (I) Formation of Total Vicinal Diketones. *Master Brewers Association of the Americas Technical Committee*, **21**, 73.
- Nedovic, V.A., Leskosek-Cukalovic, I. & Vunjak-Novaki, G., 1996a. Short-Time Fermentation of Beer in an Immobilization Yeast Air-Lift Bioreactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.
- Nedovic, V.A., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I. & Cutkovic, M., 1996b. A Study on Considerably Accelerated Fermentation of Beer Using an Airlift Bioreactor with Calcium Alginate Entrapped Yeast Cells. *Proceedings of the 5th World Congress of Chemical Engineering, San Diego*, 474.
- Neufeld, R.J., Norton, S. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. *Canadian Patent Application* 2,133,789.
- Nguyen, A.L. & Luong, J.H.T., 1986. Diffusion in k-Carrageenan Gel Beads. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 1261.
- Nielsen, J. & Villadsen, J., 1994. Bioreactor Modeling. *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, 9.
- Norton, S. & D'Amore, T., 1994. Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**, 365.
- Norton, S., Neufeld, R.J. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. *Canadian Patent Application* 2,133,789.
- Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Decamps, C. & Russell, I., 1994. Pilot Scale Primary Fermentation of Beer with a Gaslift Immobilized Yeast Reactor. *Proceedings of the European Brewing Convention, Sub-Committee*, Dublin.
- Norton, S., Watson, K. & D'Amore, T., 1995. Ethanol Tolerance of Immobilized Brewers' Yeast Cells. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **43**, 18.
- Nothhaft, A., 1995. The Start-Up of an Immobilized Yeast System for Secondary Fermentation at Brahma. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 41.

WO 02/102961

19

PCT/CA02/00970

- Nunokawa, Y. & Hirotsune, M., 1993. Production of Soft Sake by an Immobilized Yeast Reactor System. in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 235.
- Pajunen, E., 1996a. The Behaviour of Immobilized Yeast Cells. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **21**, 33.
- Pajunen, E., 1996b. Immobilized System in the Brewing Industry. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 38.
- Pajunen, E., 1995. Immobilized Yeast Lager Beer Maturation: DEAB-Cellulose at Sinebrychoff. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, **24**.
- Pajunen E. & Gronqvist A., 1994. Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. *Proceedings for the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 101.
- Pajunen, E., A. Gronqvist & Lommi, H., 1989. Continuous Secondary Fermentation and Maturation of Beer in an Immobilized Yeast Reactor. *MBAA Technical Quarterly*, **26**, 147.
- Pajunen, E., Gronqvist, A., Simonsen, B. & Lommi, H., 1994. Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. *ALAFAE Annual Meeting, Quito*, 13.
- Pajunen, E., Ranta, B., Andersen, K., Lommi, H., Viljava, T., Bergin, J. & Guercia, H., 2000a. Novel Process for Beer Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing, Asia-Pacific Section*, 91.
- Pajunen, E., Viljava, T. & Lommi, H., 2000b. Novel Primary Fermentation with Immobilized Yeast System. *World Brewing Congress*, Oral presentation.
- Paul, F. & Vignais, P.M., 1980. Photophosphorylation in Bacterial Chromatophores Entrapped in Alginate Gel: Improvement of the Physical and Biochemical Properties of Gel Beads with Barium as Gel-Inducing Agent. *Enzyme and Microbial Technology*, **2**, 281.
- Peach, M., 1996. Fermenting Faster Pints. *New Scientist*, **2058**, 23.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A. & Mensour, N.A., 1998a. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, **18**, 237.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. & Russell, I., 1998b. Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, **104**, 19.
- Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I. & Russell, I., 1999. Kappa-Carrageenan Gel Immobilization of Lager Brewing Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, **105**, 398.
- Pirt, S.J., 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific, Oxford.
- Pittner, H. & Back, W., 1995. Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **32**, 163.
- Pittner, H., W. Back, W. Swinkels, E. Meersman, B. van Dieren & Lommi, H., 1993. Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol-Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress, Oslo*, 323.
- Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1981. Immobilized Brewing Yeast. *Kvasny Prumysl*, **27**, 193.
- Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J. & Fournier, A., 1992. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **38**, 39.

WO 02/102961

20

PCT/CA02/00970

- Poncelet, D., Poncelet de Smet, B., Beaulieu, C. & Neufeld, R. J., 1993. Scale Up of Gel Bead and Microcapsule Production in Cell Immobilization. in *Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization*, Goosen, M.F.A., Ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Prakash, A., Briens, C.L. & Bergougnou, M.A., 1987. Mass Transfer Between Solid Particles and Liquid in a Three Phase Fluidized Bed. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **65**, 228.
- Prasad, K.Y. & Ramanujam, T.K., 1995. Overall Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Modified Reversed Flow Jet Loop Bioreactor with Low Density Particles. *Bioprocess Engineering*, **12**, 214.
- Pritchett, Price. 1993. *Culture Shift*. Texas: Pritchett & Associates, Inc.
- Que, F., 1993. Using a Thread Type of Alginate Gel Particles as Cell-Immobilised Support and Some Concept of Packed Bed Fermenter Design. *Biotechnology Techniques*, **7**, 755.
- Rajotte, P., 1998. Continuous Fermentation with Immobilized Yeast Cells. *American Brewer*, **76**, 42.
- Rajotte, P., 1997. Jumping into the Next Millenium Canadian Style. *American Brewer*, **75**, 42.
- Russell, I., Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A. & Briens, C., 1995. Immobilized Yeast Cells: Applications for Brewing. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 159.
- Ryder, D.S. & Masschelein, C.A., 1985. The Growth Process of Brewing Yeast and the Biotechnological Challenge. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **43**, 66.
- Satterfield, C.N., 1970. *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysts*, MIT Press, Cambridge.
- Scott, J.A., O'Reilly, A.M. & Kirkhope, S., 1995. A Fibrous Sponge Matrix to Immobilized Yeast for Beverage Fermentations. *Biotechnology Techniques*, **9**, 305.
- Shindo, S. & Kamimur, M., 1990. Immobilization of Yeast with Hollow PVA Gel Beads. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 232.
- Shindo, S., Sahara, H. & Koshino, S., 1994a. Suppression of α -Acetolactate Formation in Brewing with Immobilized Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, **100**, 69.
- Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. & Tanaka, H., 1993. Control of Diacetyl Precursor [α -acetolactate] Formation During Alcohol Fermentation with Yeast Cells Immobilized in Alginate Fibers with Double Gel Layers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **76**, 199.
- Shindo, S., Sahara, S., Watanabe, N. & Koshino, S., 1994b. Main Fermentation with Immobilized Yeast Using Fluidized-Bed Reactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 109.
- Sinitsyn, A.P., Rajnina, E.I., Efremov, A.B., Gracheva, I.M. & Gernet, M.V., 1986. Fermentation of Hydrolysed Mash by Yeasts Immobilized on Borosilicate Carriers. *Fermentnaya I Spirtovaya Promyshlennost*, 31.
- Smogrovicova, D. & Domeny, Z., 1999. Beer Volatile By-Product Formation at Different Fermentation Temperature using Immobilized Yeasts. *Process Biochemistry*, **34**, 785.
- Smogrovicova, D., Domeny, Z., Gemeiner, P., Malovikova, A. & Sturdik, E., 1997. Reactors for Continuous Primary Beer Fermentation using Immobilized Yeast, *Biotechnology Techniques*, **11**, 261.
- Sodini, L., Boquien, C.Y., Corrieu, G. & Lacroix, C., 1997. Use of an Immobilized Cell Bioreactor for the Continuous Inoculation of Milk in Fresh Cheese Manufacturing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **18**, 56.
- Speers, R.A. & Ritcey, L.L., 1995. Towards an Ideal Flocculation Assay. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 174.
- Stewart, G.G., 1996. Brewing Technology for the Future. *The Brewer*, **82**, 348.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

21

PCT/CA02/00970

- Stewart, G.G. & Russell, I., 2000. *Brewer's Yeast*. The Institute of Brewing, England.
- Stewart, G.G. & Russell, I., 1981. Yeast Flocculation, in *Brewing Science*, Ed. J.R.A. Pollock, Academic Press, New York.
- Stratford, M., 1996. Yeast Flocculation: Restructuring the Theories in Line with Recent Research, *Cerevisiae Belgium Journal of Biotechnology*, 38.
- Sumino, T., Nakamura, H. & Mori, N., 1993. Development of a High-Efficiency Wastewater Treatment System Using Immobilized Microorganisms, in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, eds.) New York: Marcel Dekker, 377.
- Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D. & Stassi, P. 1999. Immobilized Yeast Bioreactor Systems for Continuous Beer Fermentation. *Biotechnology Progress*, 15, 105.
- Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists. 1992. *Methods of Analysis*. 8th Edition, Minnesota, ASBC.
- Teixera, J.M., Teixeira, J.A., Mota, M., Manuela, M., Guerra, B., Machado Cruz, J.M. & Sa Almeida, A.M., 1991. The Influence of Cell Wall Composition of a Brewer's Flocculent Lager Yeast on Sedimentation During Successive Industrial Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Congress*, 241.
- Umemoto, S., Mitani, Y. & Shinotsuka, K., 1998. Primary Fermentation with Immobilized Yeast in a Fluidized Bed Reactor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 35, 58.
- Van de Winkel, L., 1995. Design and Optimization of a Multipurpose Immobilized Yeast Bioreactor for Brewery Fermentations. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 20, 77.
- Van de Winkel, L. & De Vuyst, L., 1997. Immobilized Yeast Cell Systems in Today's Breweries and Tomorrow's. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 27.
- Van de Winkel, L., McMurrough, I., Evers, G., Van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Pilot-Scale Evaluation of Silicon Carbide Immobilized Yeast Systems for Continuous Alcohol-Free Beer Production. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 90.
- Van de Winkel, L., P.C. van Beveren & C.A. Masschelein, 1991a. The Application of an Immobilized Yeast Loop Reactor to the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the 23rd European Brewing Convention Congress*, Lisbon, 577.
- Van de Winkel, L., P.C. van Beveren, E. Borremans, E. Goossens & C.A. Masschelein, 1991b. High Performance Immobilized Yeast Reactor Design for Continuous Beer Fermentation. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress, Oslo*, 307.
- Van Dieren, B., 1995. Yeast Metabolism and the Production of Alcohol-Free Beer. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 66.
- Van Iersel, M.F.M., Meersman, B., Swinkels, W., Abee, T. & Rombouts, F.M., 1995. Continuous Production of Non-Alcohol Beer by Immobilized Yeast at Low Temperature. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 495.
- Van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J., 1993. Biofilm Bioreactors for Waste-Water Treatment. *Trends in Biotechnology*, 11, 117.
- Vicente, A.A., Dluhy, M. & Teixeira, J.A., 1999. Increase of Ethanol Productivity in an Airlift Reactor with a Modified Draught Tube. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77, 497.

WO 02/102961

22

PCT/CA02/00970

- Virkajarvi, I. & Linko, M., 1999. Immobilization: A Revolution in Traditional Brewing. *Naturwissenschaften*, **86**, 112.
- Virkajarvi, I. & Kronlof, J., 1998. Long Term Stability of Immobilized Yeast Columns in Main Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **56**, 70.
- Virkajarvi, I. & Pohjala, N., 1999. Profiting from Immobilized Fermentation. *Proceedings of the 5th Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*, 290.
- Wackerbauer, K., Fitzer, M. & Gunther, J., 1996a. Technisch-technologische Möglichkeiten mit Immobilisierter Hefe. *Brauwelt*, **136**, 2140.
- Wackerbauer, K., Fitzer, M. & Lopsien, M., 1996b. Untersuchungen mit dem Neuen MPI-Bioreaktor-System. *Brauwelt*, **136**, 2250.
- Webb, C., G.M. Black & B. Atkinson, 1986. *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System*. England: The Institution of Chemical Engineers.
- Westrin, B.A. & A. Axelsson, 1991. Diffusion in Gels Containing Immobilized Cells: A Critical Review. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 439.
- Wu, W.T., Wu, J.Y. & Jong, J.Z., 1992. Mass Transfer in an Airlift Reactor with a Net Draft Tube. *Biotechnology Progress*, **8**, 465.
- Yamane, T., 1981. On Approximate Expressions of Effectiveness Factors for Immobilized Biocatalysts. *Journal of Fermentation Technology*, **59**, 375.
- Yamauchi, Y. & Kashiwara, T., 1995a. Kirin Immobilized System. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 99.
- Yamauchi, Y., Kashiwara, T., Murayama, H., Nagara, A., Okamoto, T. & Mawatari, M., 1994. Scaleup of Immobilized Yeast Bioreactor for Continuous Fermentation of Beer. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **31**, 90.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Amikura, T., Hiratsu, H., Nagara, A., Kamiya, T. & Inoue, T., 1995b. Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 1. Heat Conversion of α -Acetolactate. *Journal of Biotechnology*, **38**, 101.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Nagara, A. & Noguchi, K., 1995c. Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 2. Balance of Total Diacetyl Reduction and Regeneration. *Journal of Biotechnology*, **38**, 109.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A. & Kashiwara, T., 1995d. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Sulfite Formation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**, 277.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiwara, T., Yoshida, M. & Nakanishi, K., 1995e. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Balance Control of Extract and Amino Acid Uptake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**, 245.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiwara, T., Yoshida, M., Yasui, T. & Nakanishi, K., 1995f. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Minor Products of Carbohydrate Metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**, 261.
- Yuan, X., 1987. Application of Immobilization Technique in Brewing Industry. *Shipin Kexue*, **94**, 8.

WO 02/102961

23

PCT/CA02/00970

Zhang, Z., Su, E. & Yu, J., 1988. . Studies on Continuous and Rapid Fermentation of Beer by Immobilized Yeast. *Gongye Weishengvau*, 18, 11.

Summary of the Invention:

The present invention relates to a process for the production of potable alcohols, which comprises a continuous fermentation stage that is employed to pitch and/or at least initially ferment a wort containing fermentable sugars.

In particular there is provided a preferred process in which the continuous fermentation is carried out using a gas lift type bioreactor, employing a flocculent (and especially a highly flocculent or superflocculant) yeast strain and employing stringent oxygen control.

In a particularly preferred form of the present invention, the "at least partially fermented" discharge from the continuous process is delivered to a batch processing stage for finishing, (which in the context of the claims of the present invention can include – but is not limited to – the completion of the fermentation process through which fermentable carbohydrates to alcohol).

The present invention relates to the production of beer, (including in particular pale styles of beer, lagers, and especially North American style beers). In this connection see for example, the Essentials of Beer Style – F. Eckhardt.

The process according to claim 1 wherein the continuous stage is carried out in a gas lift bioreactor

In accordance with a continuous stage useful in the various practices under the present invention, it is preferred that immobilized cells be utilized, (as opposed to purely free cells) and this may be carried out using a selected one of carrier immobilized or flocculating yeasts. Notwithstanding the forgoing, it is preferred that flocculating yeasts be used instead of carrier immobilized cells, and superflocculant yeasts are especially preferred for this purpose.

More details concerning preferred practices and advantages associated with the continuous processes are provided over the course of the detailed description of the present invention. These include the use of artificial (e.g. controlled) gas mixtures, and the use of nitrogen, carbon dioxide and oxygen as well as air.

In addition, greater details concerning the batch hold processing stage are provided herein. Note that in certain embodiments of the present invention, the focus of the batch hold process goes beyond issues of "completion" of the conversion of fermentable carbohydrates to alcohol (which in any case can be virtually completed in the continuous stage of the processing). In such embodiments, the primary focus of the batch hold processing stage is on flavour-matching (or remediation), particularly in connection with diacetyl and acetaldehyde.

Preferred embodiments of the present invention provide for the post-continuous stage distribution of the pitched and/or at least partially fermented wort through a distribution manifold (whether as a fixed manifold or by selectively connecting and disconnecting conduit) amongst a plurality of batch hold tanks. In a serial distribution process one tank is filled, followed by the next, and so on. In a particularly preferred embodiment, the continuous reactor throughput capacity and batch hold capacity are matched in terms of size and number of reactors/batch hold vessels – such that the production flow-rate is matched in terms of capacity over time. Ideally, a batch hold vessel is drained of finished product just in time to be cleaned, reconnected and then refilled from the ongoing discharge from the continuous fermentation stage.

WO 02/102961

24

PCT/CA02/00970

In accordance with another aspect of the present invention, certain embodiments are particularly managed in relation to the oxygen content of the wort/beer. This applies to both the continuous and batch hold stages of the process. With regard to the continuous stage the oxygen concentration has a variety of effects, but notably, it may be desirable to minimize it in order to optimize conversion of higher alcohols to flavor active esters. In this connection it is noted that concentrations of higher alcohols can remain largely un-effected by the batch hold processing stage so if desired stringent O₂ control is used to manage the fusel ester flavour balance. Pre-purging of wort with CO₂ prior to continuous fermentation can be useful in this connection.

In one embodiment of the present invention, the primary purpose of the continuous stage of the processing is to provide for pitching of the downstream batch fermentation that then occurs in the batch hold process.

For greater certainty, the contents of the priority documents are incorporated herein in full and form as much a part of the present specification as if they were fully reproduced herein.

Detailed Description:

The following is a two-part detailed description of aspects of the present invention.

The description contains and/or refers to graphs, formula, figures and the like, each of which is referred to by the term "Figure" followed by a specific identifying number, and to accompanying drawings each of which are described and/or referred to by the term "FIG" followed by a specific identifying number. In these drawings the items illustrated may not be to exact scale.

In the accompany drawings:

FIG. 1 is a process flowsheet for the Pilot Scale Continuous Fermentation System, the individual pieces of equipment shown being summarized in Table 5.1 herein.

FIG. 2 is a schematic diagram of the 50L pilot scale gas-lift draft tube (GLDT) bioreactor.

FIG. 3 is a cross sectional view of the reactor of FIG. 2 including the location of the internal draft tube as well as the internal separator.

FIG. 4 is a detailed drawing of the head plate of the bioreactor of FIG. 2.

FIG 5 is a detailed drawing of the body of the bioreactor of FIG. 2.

FIG. 6 is a detailed drawing of the conical bottom of the bioreactor of FIG. 2.

FIG. 7 is a detailed drawing of the gas pipe sparger of the bioreactor of FIG. 2. A total of 160 holes (0.16 cm diameter) were drilled into the 1.27 cm diameter pipe sparger with a longitudinal spacing of 0.8 cm center to center and a latitudinal spacing of 0.6 cm.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

25

PCT/CA02/00970

FIG. 8 is a diagram of the continuous bead production using static mixers (Labatt Patent Application No. 2,133,789).

FIG. 9 is a picture of Siran® glass beads supplied by Schott Engineering.

FIG. 10 is a picture of Celite® diatomaceous earth beads supplied by World Minerals.

FIG. 11 is a picture of κ -carrageenan gel beads produced in the laboratories of Labatt Brewing Company Limited ("Labatt").

FIG. 12 is a series of pictures representing non-flocculent yeast; chain-forming yeast and flocculent yeast respectively. These images were taken using a microscopic focussing camera at a magnification of 100 X.

FIG. 13 is a microscopic picture of the medium flocculent yeast strain LCC3021 at a magnification of 100 X.

FIG. 14 is a microscopic picture of the superflocculent yeast strain LCC290 at a magnification of 100 X.

FIG. 15 is a schematic diagram of the static mixer process for the making of kappa-carrageenan gel beads. In the static mixer, the fluid moves through the mixer (rather than the mixer through the fluid) allowing for mixing of fluids as they are pumped through the pipe line.

FIG. 16 is another schematic of a gas-lift draft tube bioreactor system for primary beer fermentation.

FIG. 17 is a photograph of the actual gas-lift draft tube bioreactor vessel of FIG. 15.

FIG. 18 is a detailed drawing of a 13L (i.e. 8L working volume) gas-lift tube reactor vessel of FIG. 16.

FIG. 19 is a detailed drawing of a bioreactor vessel headplate where: 1-liquid withdrawal port for oxygen sensor; 2-thermowell for temperature sensor, linked to thermostatic controller; 3-temperature probe; 4-liquid return port for oxygen sensor; 5-inoculation port; 6 membrane sample port with stainless steel cap.

FIG. 20 is a profile of liquid withdrawal port for oxygen sensor with filler unit submerged in bioreactor liquid phase.

FIG. 21 is a detailed equipment and front diagram for continuous primary beer fermentation using a gas-lift bioreactor system (see Table 5.1 for detailed equipment description).

FIG. 22 is a schematic of the gelation mechanism of carrageenan (adapted from Rees, 1972).

WO 02/102961

26

PCT/CA02/00970

FIG. 23 is a schematic of the utilization of wort constituents by immobilized yeast during primary fermentation.

FIG. 24 is a picture of kappa-carrageenan gel bead containing immobilized lager yeast at zero time fermentation.

FIG. 25 is a picture of a pod of lager yeast entrapped in kappa-carrageenan gel bead after two days of batch fermentation showing bud scars on individual yeast cells.

FIG. 26 is a picture of an outer edge of a kappa-carrageenan gel bead showing lager yeast cells after two months of continuous fermentation.

FIG. 27 is a picture of lager yeast cells at an outer region of a kappa-carrageenan gel bead after two months of continuous fermentation.

FIG. 28 is a picture of lager yeast cells at the centre of a kappa-carrageenan gel bead after two months continuous fermentation.

FIG. 29 is a picture of an entire kappa-carrageenan gel bead after six months continuous fermentation; many fractured beads had hollow centres.

Detailed Description - Part 1:

YEAST STRAIN AND INOCULUM PREPARATION

The fermentations conducted in this thesis employed a polyploid yeast from the *Saccharomyces cerevisiae* family (also referred to as *Saccharomyces uvarum* and/or *Saccharomyces carlsbergensis*). The brewing community will commonly refer to this yeast as bottom fermenting producing a lager-type beer. This characterization is attributable to lager yeast's ability to settle out of the liquid medium upon completion of the fermentation. Ale yeast, unlike the lager yeast, will rise to the top of the fermentation vessel and was therefore known as a top fermenting strain. The ability of yeast to settle or rise is not necessarily dependent on whether the yeast is a lager or ale type but is strain specific. Lager yeast typically does not ferment at temperatures above 34°C while ale yeast cannot ferment melibiose. Scientists will use these characteristics to differentiate lager strains from ale yeast (McCabe, 1999).

The medium flocculent yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* strain 3021 from the Labatt Culture Collection was used in both the free cell self-aggregated fermentations and the κ -carrageenan immobilized fermentations. For the trials involving the use of superflocculent yeast as the immobilizant, a variant of the LCC3021 strain, namely LCC290, was used.

Pure yeast cultures were cryogenically stored in a -80°C freezer located within the Labatt Technology Development Department. When required, sterile loops of yeast culture were aerobically pre-grown at 21 °C on PYG agar plates (3.5 g of peptone, 3.0 g of yeast extract, 2.0 g of KH_2PO_4 , 1.0 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20.0 g of glucose, and, 20.0 g of agar dissolved in distilled water up to a volume of one liter).

WO 02/102961

27

PCT/CA02/00970

Isolated yeast colonies were then transferred into test tubes containing 10 mL of pasteurized wort and incubated with agitation at 21°C for a 24 hour period. This inoculum was progressively scaled up to a volume of 5 L by adding the previous culture into the appropriate wort volume (10 mL into 190 mL, 200 mL into 800 mL and 1 L into 4L). The yeast inoculum was then transferred into centrifuging jars and subjected to centrifugation at 10000 rpm and 4°C for 10 minutes. The desired mass of yeast for all subsequent fermentations was drawn from the resulting wet yeast pellets (30% w/v).

FERMENTATION MEDIUM

Industrial grade lager wort produced by the Labatt London brewhouse was used as the nutrient medium for all fermentations. Reference is made throughout this thesis to the wort's specific gravity expressed as degrees Plato (°P). Formula 4.1 describes the relationship between specific gravity and °P.

$$^{\circ}P = 135.997 \bullet SG^3 - 630.272 \bullet SG^2 + 1111.14 \bullet SG - 616.868 \quad (4.1)$$

The wort used throughout this thesis was 17.5 °P which corresponds to a specific gravity of 1.072.

Table 4.1 provides the typical carbohydrate profile of this wort as measured by the high performance liquid chromatography (HPLC) method described in section 4.7.2. Approximately 73% of the carbohydrates in this wort are fermentable, while the brewing yeast employed in this study cannot readily take up 27% of the longer chain carbohydrates.

Table 4.1 Typical carbohydrate composition of the wort utilized in the fermentation trials. The wort was produced by the Labatt London brewhouse and had a specific gravity measured as 17.5 °P.

	Average (g/L)	Coefficient of variation (%)	Fermentable (%)	Unfermentable (%)
Fructose	3.3	18.0	1.9	
Glucose	16.5	4.3	9.3	
Maltose	87.7	10.1	47.8	
Maltotriose	25.2	10.8	14.2	
Maltotetrose	6.4	18.3		3.6
Polysaccharides	41.1	9.1		23.2
Total	177.2		73.2	26.8

WO 02/102961

28

PCT/CA02/00970

The coefficient of variation for most of the analyzed substances ranges between 10% and 20%. This variability is due in large part to the industrial production process utilized, as well as the variability in raw materials from one brew to another.

IMMOBILIZATION TYPES

Three types of immobilization -- entrapment, adsorption and self-aggregation -- were tested during this Ph.D. research. For the industrially sourced carriers, supplier data are presented first and then supplemented by in-lab analysis. Pictures and size distributions of the investigated carriers (when available) are presented elsewhere herein.

Two types of adsorption matrices were tested in the pilot scale gas-lift draft tube bioreactor. Pictures of both these carriers are presented herein. Schott Engineering provided a sintered glass bead carrier, Siran®. The selected particles were 1-2 mm in diameter, had open pores for yeast immobilization with a 55-60 % pore volume and pore size distribution between 60 and 300 nm, an appropriate size for yeast cells. This type of carrier is reported to be biologically and chemically stable, easy to clean, reusable, sterilizable with steam, non-compacting and neutral in taste, and is therefore food approved.

World Minerals of California supplied a spherical carrier composed of diatomaceous earth. This carrier provided the advantages of thermal and chemical stability, mechanical strength and rigidity. Diatomite, the basic raw material, is commonly used in the brewing industry for filtration of beer. The Celite® R-632 carrier was specifically designed for whole cell immobilization.

Supplier specifications were as follows:

Size range:	0.595 mm to 1.41 mm (14/30 mesh cut)
Mean pore diameter:	7.0 nm
Total pore volume:	1.19 cm ³ /g
Compacted bed density:	0.334 kg/m ³

Kappa-carrageenan gel beads, an entrapment based carrier, were produced in the laboratories of the Labatt Brewing Company Ltd. The production process is described in Section 5.2 and the results of this production process are presented in Section 6.2.1.

The simplest mode of immobilization, self-aggregation, was possible by the selection of yeast strains capable of flocculation. The industrial lager yeast LCC3021 possesses the natural capability of flocculation and is considered as a medium flocculent strain. As the fermentation progresses, small clumps of yeast, measuring from 0.5 mm to 1.0 mm, will form in the liquid medium. The LCC290 yeast, a variant of LCC3021 lager yeast, will form much larger flocs (from 1.0 mm to 5.0 mm depending on degree of agitation) and is therefore classified as a superflocculent yeast. Images of the various yeast flocs are presented herein.

SAMPLING PROTOCOL

As the fermentations progressed, it was necessary to withdraw samples from the fermenting liquid at numerous time intervals. To perform this task, sterile sampling valves were purchased from Scandi-brew®. These valves are constructed of stainless steel and are equipped with a chamber (delimited by a top and bottom port) in which

WO 02/102961

29

PCT/CA02/00970

ethanol can be stored to maintain an aseptic environment. Before taking a sample, the ethanol is released from the chamber by removing the retaining cap from the bottom spout. Fresh ethanol (75% by volume) is run through the chamber and the cap is then placed on the top port of the valve. The valve lever is then pulled and approximately 50 mL of liquid sample is collected into a sterilized container. A second sample is collected for the fermentations involving superflocculent yeast so that proper deflocculation can be performed prior to cell enumeration. Once the sampling is complete, the valve chamber is rinsed with hot water and peracetic acid and then, finally, with ethanol. The retaining cap is placed on the bottom spout and the chamber is filled with ethanol in preparation for the next sampling.

MICROBIOLOGICAL MONITORING

Free Yeast Cell Enumeration and Viability by Methylene Blue Method

Liquid samples containing freely suspended yeast cells are first collected from the fermentation medium by the above sampling procedure. A Hauser Scientific Company Hemacytometer with a volume of 10^{-4} mL is used in conjunction with a light microscope to perform the cell counts. The liquid samples should be diluted with distilled water in order to achieve a total yeast count of 150 to 200 cells in the counting field. Heggart et al. (1999) describe all the factors that affect viability and vitality characteristics of yeast.

In order to assess the degree of viability within the sample, the methylene blue staining technique described by the American Society of Brewing Chemists was used (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Live cells can render the methylene blue stain colorless by oxidizing it. Dead cells, on the other hand, will stain blue. The following reagents were used in the preparation of methylene blue for viability assessment:

Solution A: 0.1 g of methylene blue in 500 mL distilled water

Solution B: 13.6 g of KH_2PO_4 in 500 mL distilled water

Solution C: 2.4 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 100 mL distilled water

The Fink-Kuhles buffered methylene blue was then prepared by mixing 500 mL of solution A with 498.75 mL of solution B and 1.25 mL of solution C to yield a final mixture at a pH of 4.6.

A mixture of diluted cell suspension and methylene blue was prepared in a test tube and then thoroughly mixed. After allowing this mixture to rest for several minutes (ensures contact between cells and the dye), a drop of liquid was placed between the hemacytometer's counting glass and the cover slip (defined volume). The percentage of viable cells was determined by counting both the viable and dead cells within the counting field and then dividing the number of viable cells by the total number of cells.

4.5.2 Immobilized Yeast Cell Counts- Self Aggregation

When using yeast cells with a tendency to form flocs, it becomes difficult to accurately assess the number of cells present in a liquid sample because the cells will tend to settle in the sample jar. In order to obtain a representative sample, a deflocculating agent was used. In these experiments, a 0.5% by volume sulfuric acid solution was employed to destabilize the flocculated yeast cells, hence allowing for a representative yeast cell count. The same enumeration and viability procedure outlined in section 4.5.1 was used with the sulfuric acid replacing distilled water as the diluting agent.

WO 02/102961

30

PCT/CA02/00970

Immobilized Yeast Cell Counts- Gel Beads

Before yeast counts were performed on gel-entrapped cells, it was necessary to disrupt the gel matrix using a Polytron[®] apparatus (Brinkmann Instruments). A sample of beads was first passed through a sterile sieve (500 μ m mesh size) and then flushed with sterile water. One milliliter of gel-entrapped-cell beads and 19 mL of distilled water were added into a 50 mL sample container. The Polytron[®] was then used to physically disrupt the gel and thus release the yeast into solution. The enumeration and viability methods described in section 5.5.1. were then performed on the gel-disrupted sample.

Contamination Monitoring

All the fermentations performed throughout this thesis were regularly monitored for contamination. The monitoring program consisted of at least one check per week of the liquid in the 50-L continuous fermenters and the wort in the storage vessels. Liquid samples were withdrawn aseptically and then spread onto culture plates composed of Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories) and 10 mg/L of cycloheximide. These test samples were then incubated at 28 °C for up to 10 days in both aerobic and anaerobic conditions. Placing the selected plates into jars containing an AnaeroGen[®] packet (Oxoid), which removes any oxygen remaining in the jar, created the desired anaerobic growth environment. The use of an indicator strip (turns pink if oxygen is present) allowed us to verify that the environment was, indeed, anaerobic. Bacterial contaminants, if present in the liquid sample, would then be detected by this method.

Wild or non-brewing yeast detection required a separate growth medium that would not favor bacterial and/or brewing yeast growth. Pour plates prepared with yeast medium (YM, Difco Laboratories) supplemented with 0.4 g/L CuSO₄ were utilized to selectively allow for the growth of any potential wild yeast (incubation at 25 °C for 7 days). Incubating the liquid sample plated on PYN agar (Peptone Yeast-Extract Nutrient, Difco Laboratories) for 7 days at 37 °C allowed for the detection of non-lager brewing yeast. Lager yeast growth is inhibited at temperatures above 34 °C, thus any growth on these plates would indicate an ale yeast contamination.

ANALYTICAL METHODS

Appropriate calibrations were performed on all the relevant equipment as prescribed by standard industrial operating procedures.

Ethanol

Ethanol concentration in beer and fermenting samples was analyzed using the gas chromatography method described by the Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992). A de-gassed sample of liquid was combined with 5% v/v isopropanol internal standard followed by the injection of 0.2 μ L of this mixture into a Perkin Elmer 8500 Gas Chromatograph. The following list provides further detail regarding the exact setup of the GC:

Flame ionization detector (FID)

Dynatech autosampler

Chromosorb 102, 80-100 mesh support packing

Helium carrier gas flowing at 20 mL/min

WO 02/102961

31

PCT/CA02/00970

Injector temperature of 175 °C, detector temperature of 250 °C & column temperature of 185 °C isothermally.

Carbohydrates

The glucose, fructose, maltose, maltotriose, maltotetraose, polysaccharides and glycerol concentrations were measured using a high-performance liquid chromatography (Spectra-Physics SP8100XR HPLC) system. A cation exchange column (Bio-Rad Aminex HPX-87K) with potassium phosphate dibasic as the mobile phase was used to separate these carbohydrates as they eluted through the system. The quantity of the compounds was then determined using a refractive index detector to generate the appropriate compound peaks. The HPLC was operated at a back pressure of 800 psi, a column temperature of 85 °C and a detector temperature of 40 °C. The samples were degassed and diluted to the appropriate levels. A 10 µL injection was then introduced into the system at a flow rate of 0.6 mL/min.

The brewing industry commonly uses another measure to assess the liquid's overall carbohydrate level. The liquid specific gravity expressed in degrees Plato was measured using an Anton Paar DMA-58 Densitometer. Filtered and de-gassed samples were transferred into a special glass u-tube, which was then subjected to an electronic oscillation. The frequency of the oscillation through the liquid was measured and then correlated to a liquid specific gravity (g/100 g or °P). It should be noted that this measurement is an approximation of the sample's total carbohydrate concentration (or specific gravity) since the calibrations are performed on aqueous sucrose solutions at 20 °C whose specific gravity is the same as the wort in question.

Vicinal Diketones

Total diacetyl (2,3-butanedione) and total 2,3-pentanedione concentrations were determined using a Perkin Elmer 8310 Gas Chromatograph equipped with an electron capture detector. A 5% methane in argon carrier gas flowing at 1.0 mL/min was used as the carrier gas and the sample was passed through a J & W DB-Wax column. The injector temperature was maintained at 105 °C while the detector temperature was set at 120 °C. A Hewlett Packard 7694E headspace autosampler facilitated the analysis. Quantification was calculated by evaluating the peak area of the selected sample component and then cross-referencing it to the 2,3-hexanedione internal standard calibration value.

In order to assess the "total" concentration of these compounds, it was first necessary to equilibrate these samples to 65 °C and then hold then for 30 minutes at this temperature. This pre-analysis sample handling allowed for the conversion of L-lactate and D-hydroxybutyrate into their respective diketones, diacetyl and 2,3-butanedione.

Esters and Higher Alcohols

Some of the most important flavor compounds detected in beer were measured using a headspace gas chromatography method. Acetaldehyde, ethyl acetate, isobutanol, 1-propanol, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate and ethyl octanoate were quantified using n-butanol as the internal standard. A Hewlett Packard 5890 Gas Chromatograph equipped with a flame ionization detector, a HP 7994 headspace autosampler and a J&W DB-Wax capillary column was utilized. The injector temperature was set at 200 °C and the detector temperature was 220 °C. The oven temperature profile was as follows: 40 °C for 5 min, ramp from 40 °C to 200 °C at rate of 10 °C/min, ramp from 200 °C to 220 °C at a rate of 50 °C/min, and finally a hold at 220 °C for 5

WO 02/102961

32

PCT/CA02/00970

min. A helium makeup gas at 30 mL/min (28 psig), a hydrogen stream at 50 mL/min (25 psig) and an air stream at 300 mL/min (35 psig) supplemented a helium carrier gas flow of 6.0 mL/min. The entire GC cycle for a sample loop of 1 mL was 40 minutes.

Other Analyses

Several other analytical measurements were performed on an as-needed-basis on fermentation liquid that was subjected to aging and packaging. Finished product analyses were performed by the Labatt Quality Control department as per finished beer standards. The methods described by the Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992) were the basis for these measurements. A list of the analyses, as well as a brief description of the relevance of these measurements, is provided in Table 4.2.

Table 4.2 Quality Control Analyses and Description

Specification	Description
Air	Total air carried over during the packaging process; specification is less than 1 mL
Carbon Dioxide	Level of carbonation introduced into the product; reported as % with specification of 2.75 %
Sulfur Dioxide	Amount of sulfur dioxide in the beer measured by GC; target of <10 mg/L
Dimethyl Sulfide	Amount of dimethyl sulfide (cooked corn smell) in the beer measured by GC; target of <70 □g/L
Bitterness	Amount of bitterness contributed by the hops to the beer; measurement of alpha-acids in beer; 1 bitterness unit (BU) is equivalent to ~1 mg/L alpha-acid.
Colour	Colour of the beer measured by spectrophotometry; absorbance of sample at 430 nm for light path of 0.5 inch
pH	Measured using calibrated pH meter; $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$
Apparent Extract	Amount of available soluble mass in liquid without compensating for the effect of alcohol on the relative density of the liquid; measured using a hydrometer and reported as °P; AE
Real Extract	Same as apparent extract except alcohol is being accounted for in this measurement; RE
Calculated Original Extract	Based on Balling's experiment that 2.0665 g of extract produces 1.0000 g alcohol; $\text{COE} = 100 * [(2.0665 * (\% \text{ w/w alcohol}) + \text{RE}) / (100 + 1.0665 * (\% \text{ w/w alcohol}))]$
Warm Haze	Haze present in beer at room temperature (21 °C) without disturbing the sediment; evaluated using nephelometric method based on light scatter and reported as Formazin Turbidity Unit (FTU); spec is < 200 FTU
Initial Chill Haze	Haze formed in beer when it is chilled from room temperature (21 °C) to 0 °C without disturbing sediment; measurement method as above; spec is <100 FTU
Foam	Measurement of beer foaming potential using the NIBEM instrument; foam is generated in a controlled manner and the rate of foam collapse is recorded; spec is >170 seconds

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

34

*YEAST SETTLING PROTOCOL – LCC290**Preparation of Yeast Test Sample*

Superfloculent yeast (LCC290) was grown in wort as described in section 4.1. This inoculum was then centrifuged at 4 °C and 10000 rpm for 15 minutes in order to obtain a yeast pellet for further inoculation. Wort, as described in section 4.2, was pasteurized at 100 °C for 60 minutes and then one liter was aseptically transferred into 6 X 2L sterilized shake flasks. Each shake flask was inoculated with 4 g of centrifuged yeast. The flasks were placed on a shaker operating at 135 rpm (21 °C ambient room temperature) and allowed to ferment. One flask was withdrawn at the following time intervals: 24 h, 40 h, 48 h, 64 h, 71 h, and 192 h. At each interval, a small sample of liquid was taken for carbohydrate analysis and for yeast concentration and viability measurements (actual methods described in Chapter 4). The remaining liquid/yeast mixture was subjected to the yeast settling protocol described in section 4.7.2.

Yeast Settling Protocol

The settling rate for LCC290 superfloculent yeast strains was measured using the following method. Each sample was allowed to ferment until the desired interval as described in section 4.7.1. At the prescribed time, the appropriate sample flask was withdrawn. The samples were agitated in order to ensure that all particles were suspended. The contents of the flask were then immediately transferred into a 1000 mL graduated cylinder. As the flocs settled, the distance between the liquid surface and the floc-liquid interface was measured at 30 second intervals. The settling rate was calculated by applying the following equation:

$$\text{Settling rate} = \frac{\Delta H}{\Delta t} = \frac{(H_o - H_i)}{(t - t_o)} \quad (5.1)$$

Using the standard Kynch method (1952), a settling rate versus cell concentration curve was generated from the settling curves obtained for each fermentation interval.

CIRCULATION & MIXING RATE METHODS

In order to measure mixing time and circulation rate inside the three phase gas-lift draft tube bioreactor, an acid injection system linked to a data acquisition system was utilized. By applying a pulse of a strong acid into the bioreactor, it was possible to calculate both circulation rate and mixing time by monitoring the change in pH over time and then relating them to the equations presented in section 3.2.2. The data acquisition system consisted of:

an Ingold pH probe (Cole-Parmer, cat. #P-05990-90) coupled to an Ingold Microprocessor-Based pH Transmitter (Model 2300)

a Data Translation DT2805 card

a 386DX personal computer

and a Quick Basic data acquisition program (written by C. Hudson and J. Beltrano in 1994 and modified by N. Mensour in 1998).

WO 02/102961

35

PCT/CA02/00970

Ten milliliters of 10 N hydrochloric acid were injected into the annulus section of the gas-lift draft tube bioreactor (diagram is provided in Figure 5.5) just under the pH probe location. This distance corresponded to a height of 26 cm below the head plate. The pH probe was subjected to a two-point calibration with certified standard buffers (Beckman pH 7.0 green buffer and Beckman pH 4.0 red buffer) prior to all mixing experiments. The 4-20 mA current produced by the pH meter was connected to a screw terminal board, where the current was transformed into a voltage, which was then measured by the data acquisition card located inside the computer. The data acquisition program was started simultaneously to the acid injection. The length of data collection was 5 minutes at a sampling frequency of 50 Hz. The array size in the program was set at 3750 (total of 15000 points collected) with a gain of 1 set for the data acquisition card.

The collected data was transferred from the laboratory to a more powerful computer (Pentium II microprocessor) for further analysis. TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Canada) was utilized extensively for data analysis due to its capacity to deal with large data sets, as well as its many built-in data handling functions (data smoothing, curve fitting, etc.). The Savitzky-Golay algorithm, a time-domain smoothing method based on least squares quartic polynomial fitting across a moving window, was applied to the original data to eliminate noise. The smoothed data was then adjusted to reflect a change in pH rather than the actual pH measurement. A decaying sinusoidal function was fitted to the adjusted data. The mixing times and circulation rates were then calculated from the fitting parameters.

These mixing experiments were conducted on actual fermentations inside the 50-L gas-lift bioreactor with one of three immobilization carriers present (either superflocculent yeast LCC290, medium flocculent yeast LCC3021 or κ -carrageenan gel beads). The liquid phase was fermented beer with a specific gravity of 2.5 °P and the gas phase was comprised of carbon dioxide sparging gas. The fermentation temperature was controlled at 15 °C. The sparging gas superficial velocities were varied between 2.0 and 6.0 mm/s. At a given gas flowrate, the system was allowed to equilibrate for 10 minutes. The acid injection test would then start and be repeated 3 times. The next gas flowrate would be selected and the mixture inside the reactor would have its pH readjusted to the starting level.

DESIGN OF A PILOT SCALE GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR SYSTEM *GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR FERMENTATION SYSTEM*

Draft tube fluidized bed (DTFB) systems have shown their value for use in three phase systems. Two identical pilot scale gas-lift draft tube bioreactors were designed, built and installed in the Experimental Brewery of the Labatt Brewing Company Ltd. in order to carry out the experimental work for this thesis. In addition, several existing vessels were modified for both wort storage and beer collection. The flowsheet in FIG. 1 depicts the overall process used in the pilot scale continuous fermentation experiments and Table 5.1 lists a more detailed description of the equipment represented in FIG. 1.

Wort was supplied from the London Brewing plant through 5.08 cm stainless steel lines and transferred into 1600 L working volume wort storage tanks (WT1 & WT2). With a two-tank system, it was possible to ensure a continuous supply of nutrient medium to the pilot scale continuous fermenters (R1 & R2). Each holding tank is

WO 02/102961

36

PCT/CA02/00970

equipped with a carbon dioxide sparge system for oxygen and homogeneity control and a glycol cooling jacket system for temperature control. This central source of nutrient medium was set up to feed up to 3 independent fermenters through a valve header system (V7, V8 & V9). Masterflex peristaltic pumps (P1 & P2) were utilized to deliver a prescribed flow of wort to the pilot scale bioreactors (R1 & R2).

Table 5.1. Description of individual equipment represented in Figure 5.1

<i>Item</i>	<i>Description</i>
Air	100 psig air supply from London plant
CO ₂	100 psig carbon dioxide supply from London plant
F1	Sterile filter at carbon dioxide inlet
F2	Sterile filter at carbon dioxide inlet
F3	Sterile filter at vent outlet of WT1
F4	Sterile filter at vent outlet of WT2
F5	Sterile filter at inlet of sparge gas
F6	Sterile filter at inlet of sparge gas
F7	Sterile filter at outlet of WBT1
GLR	Glycol line return; 25 psig
GLS	Glycol line supply; 45 psig
NV1	Carbon dioxide needle valve
NV2	Carbon dioxide needle valve
NV3	Needle valve at air inlet
NV4	Needle valve at carbon dioxide inlet
NV5	Needle valve at air inlet
NV6	Needle valve at carbon dioxide inlet
P1	Masterflex peristaltic feed pump for R1
P2	Masterflex peristaltic feed pump for R2
PR1	Carbon dioxide pressure regulator
PR2	Carbon dioxide pressure regulator
PR3	Air pressure regulator
PR4	Carbon dioxide pressure regulator
PR5	Air pressure regulator
PR6	Carbon dioxide pressure regulator
R1	Pilot scale gas-lift draft tube bioreactor; 50 L working volume
R2	Pilot scale gas-lift draft tube bioreactor; 50 L working volume
RM1	Carbon dioxide rotameter; 0 to 20 scfh scale
RM2	Carbon dioxide rotameter; 0 to 20 scfh scale
RM3	Air rotameter; 0 to 2.5 scfh scale
RM4	Carbon dioxide rotameter; 0 to 10 scfh scale

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

37

PCT/CA02/00970

<i>Item</i>	<i>Description</i>
RM5	Air rotameter; 0 to 2.5 scfh scale
RM6	Carbon dioxide rotameter; 0 to 10 scfh scale
V1,V2,V3	Butterfly valves at the inlet/outlet of WT1
V4,V5,V6	Butterfly valves at the inlet/outlet of WT2
V7,V8,V9	Ball valve at wort distribution header
V10,V11	Ball valves at wort inlet of R1
V12	Quick disconnect valve at inlet of sparge gas
V13	Butterfly valve at outlet of R1
V14,V15	Ball valves at wort inlet of R2
V16	Quick disconnect valve at inlet of sparge gas
V17	Butterfly valve at outlet of R2
V18	Butterfly valve at outlet of WBT1
WBT1	Waste beer tank; 200 L working volume
WT1	Wort storage tank equipped with glycol wall jackets and sparging capabilities;1600 L working volume
WT2	Wort storage tank equipped with glycol wall jackets and sparging capabilities;1600 L working volume

Carbon dioxide gas and air were sparged into the gas-lift system through stainless steel gas pipe spargers (FIG. 7). Rotameters (RM3, RM4, RM5 & RM6) were used to monitor the flow rates injected into the system. Sterile filters (0.2 μ m mesh) were installed on the gas lines to ensure that no contaminants were introduced into the bioreactors. Product flowed out of the reactor through an overflow system (FIG. 4). The feed pump alone therefore controlled liquid residence time. Both reactors (R1 & R2) were connected to a waste beer tank (WBT1) to collect the overflow liquid. Special 50 L collection tanks were utilized for product collection and processing on an as needed basis.

More detailed diagrams and exact dimensions of the 50-L pilot scale bioreactor are provided in section 5.1.1. The wort handling and storage protocol will be presented in section 5.1.2 while the cleaning and sterilization protocols for the continuous fermentation system will be discussed in section 5.1.3. Section 5.1.4 covers the fermentation protocol followed throughout this thesis work.

Reactor Design & Specifications

The 50-L working volume bioreactor designed for this work was built entirely of 304L stainless steel with 4 Plexiglas look windows located in the body of the reactor so that particle and fluid motion could be observed. The material of construction was chosen for its resistance to sanitation chemicals (caustic and acid), as well as for its durability to steam sterilization. Another important aspect of the design was the minimization of threaded fittings in direct contact with the fermentation medium. Instead, ports were welded and, where necessary, sanitary TriClover fittings were used. The reactor was designed with an expanded head region so as to maximize

WO 02/102961

38

PCT/CA02/00970

gas disengagement and thus promote better liquid-solid mass transfer (Chisti & Moo-Young, 1993). The reactor bottom was designed with a 90-degree cone angle so as to minimize any solids from collecting at the bottom. FIG. 2 is a schematic diagram of the 50-L pilot scale systems that were installed in the Labatt Experimental Brewery. This diagram indicates the location of the inlet sparge gas, the liquid inlet, the glycol cooling jacket, the product outlet, the temperature sensing and control system, as well as the location of the two sanitary sampling ports. FIG. 3 is a schematic of the same GLDT bioreactor with dimensions provided in centimeters. FIG. 4 to FIG. 6 are detailed sectional drawings of the 50 L gas-lift draft tube bioreactor and FIG. 7 is a schematic of the gas sparging device utilized in these experiments.

The internal draft tube and the particle separator (baffle) are illustrated in FIG. 3. A draft tube diameter to reactor diameter ratio of 2/3 was chosen based on literature data (Chisti, 1991). The particle separator was sized to allow for better separation of gas from the solid-liquid mixture. By increasing the diameter of this baffling device (20.32 cm compared to a draft tube diameter of 10.16 cm), it is possible to obtain a greater differential between the bubble rise velocity and the liquid-solid fluid descent velocity. Gas entrainment into the annulus of the draft-tube system will be lowered and a better solid-liquid mass transfer will result.

A pipe sparger (FIG. 7) was designed for the injection of carbon dioxide mixing gas into the draft tube section. A total of 160 holes measuring 0.16 cm in diameter were drilled into the 1.27 cm diameter sparger. The holes were positioned with a longitudinal spacing of 0.8 cm center to center and a latitudinal spacing of 0.6 cm center to center (8 rows of 20 holes). Because mixing was the primary function of the sparged gas, a sparging hole diameter of 0.16 cm was selected.

Wort Handling and Storage Protocol

In traditional fermentation practices, wort is not held for extended periods of time without being pitched with yeast. Oxygenated wort is an excellent growth medium for many organisms, including yeast. Because the fermentation protocol for the continuous gas-lift systems required large quantities of wort to be held, it was necessary to develop wort transfer and holding protocols. It was the opinion of the researchers that unoxygenated cold wort could be stored for up to two weeks without it being compromised by contamination, if the wort was transferred to the holding vessel appropriately.

It was also deemed necessary to ensure that the temperature of the wort was controlled appropriately once inside the wort holding vessel. The available tankage inside the Experimental Brewery was originally designed for fermentation rather than wort holding. A test of these tanks's capability to maintain the temperature of stagnant liquid was performed. FIG. 2 clearly illustrates that these vessels cannot be used without agitation if a constant temperature of 4 °C is to be maintained. Wort was initially introduced into these vessels at a temperature of 4 °C. Temperature measurements were performed at several points throughout the tank in order to gain a better understanding of the real temperature. When the liquid was left in the vessel for 24 hours without agitation, the liquid temperature near the top climbed to approximately 20 °C. The liquid in the middle of the tank also rose slightly (ΔT of ~3 °C), while that in the cone of the tank remained near the original 4 °C.

WO 02/102961

39

PCT/CA02/00970

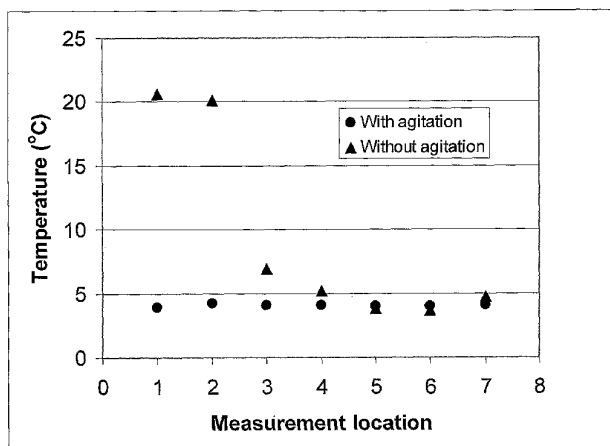


FIGURE 5.8 EFFECT OF AGITATION BY GAS SPARGING ON TEMPERATURE PROFILE IN CYLINDROCONICAL WORT HOLDING TANK. THE WORT WAS INTRODUCED INTO THE VESSEL AT A TEMPERATURE OF 4 °C. MEASUREMENTS WERE PERFORMED 24 HOURS FOLLOWING TANK FILLING. CARBON DIOXIDE GAS WAS SPARGED INTO THE VESSEL AT A FLOW RATE OF 0.113 CM³/HOUR. THE AMBIENT ROOM TEMPERATURE WAS 19.8 °C. MEASUREMENT LOCATION: (1) TOP OF TANK AT WALL; (2) TOP OF TANK AT CENTRE; (3) MID TANK AT WALL; (4) MID TANK AT CENTRE; (5) TOP OF CONE AT WALL; (6) TOP OF CONE AT CENTRE; (7) BOTTOM OF CONE

By introducing slight agitation through the injection of carbon dioxide at a flow rate of 0.133 cm³/hour, it was possible to maintain the temperature of the wort inside the holding vessel at 4 °C. As a result of these findings, both wort holding vessels were fitted at the base of the cone with a 2.54 cm sanitary tubing to be used for wort agitation.

Un-aerated wort was subsequently transferred from the Labatt London plant through the 5.08 cm stainless steel line into a buffer tank. From this tank, the wort was passed through a flash pasteurizer into one of the wort holding tanks (WT1 or WT2) where it was stored at 2 °C for up to 2 weeks. This pasteurization step was put in place as a precautionary measure to ensure that unwanted microorganisms were eliminated from the wort during the entire holding period. By utilizing unoxygenated wort, the damage to the hot wort by oxygen (formation of

WO 02/102961

40

PCT/CA02/00970

staling aldehydes) would be minimized. In addition, the air introduced with the sparge gas could therefore strictly accomplish the control of oxygen to the continuous fermenters.

Dissolved oxygen measurements were performed on the wort once inside the wort holding vessel. Figure 5.9 depicts the dissolved oxygen concentration of the wort over time following three transferring protocols. In the first instance, wort was transferred into the holding vessel and the carbon dioxide sparge was started (0.085 m³/h) to ensure proper temperature control. The wort dissolved oxygen concentration increased over the first day to reach approximately 1.3 mg/L, and was subsequently reduced to approximately 0.1 mg/L by the fifth day. In the second trial, the wort holding vessel was purged for 3 hours with 0.85 m³/h carbon dioxide prior to filling. The initial oxygen pickup was greatly decreased and wort within the desired oxygen content (< 0.1 mg/L) was reached in 2 days.

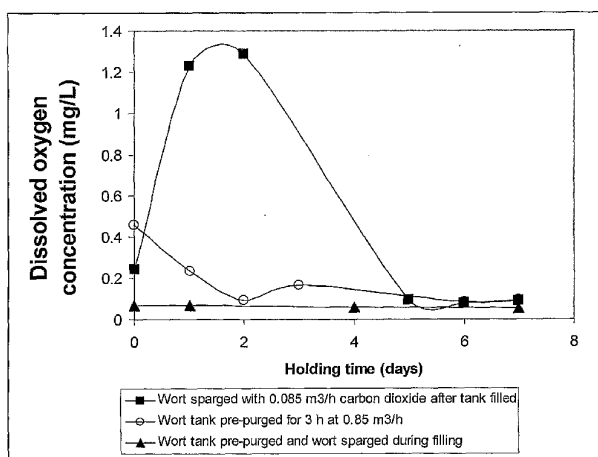


FIGURE 5.9 CONTROL OF DISSOLVED OXYGEN IN WORT DURING TRANSFERRING FROM THE LONDON PLANT. THREE FILLING PROTOCOLS WERE EVALUATED WITH THE THIRD SIMPLY BEING A COMBINATION OF THE PREVIOUS TWO METHODS. WORT TEMPERATURE WAS KEPT AT 4 °C.

WO 02/102961

41

PCT/CA02/00970

In the final trial, the tank was pre-purged as above and a continuous carbon dioxide sparge (0.085 m³/h) was introduced through the filling process, as well as during the hold period. The dissolved oxygen content was kept to a minimum (<0.1 mg/L) throughout the holding phase. Consequently, this method was adopted as the protocol for all future wort collections.

5.1.2 Cleaning & Sterilization Protocol

The wort holding tanks were subjected to a cleaning cycle consisting of a pre-rinse with hot water (85 °C), a caustic cleaning rinse (40 % caustic at 60 °C) followed by a hot water post-rinse (85 °C). Sanitization of these vessels was accomplished by contacting the walls with a peracetic acid solution (2 % w/v). The piping wort transfer piping also went through the same cleaning and sanitization regiment.

The 50-L bioreactors followed a different cleaning and sterilization protocol. The systems were rinsed with hot water (60 °C) and then filled to the top with 40 °C warm water. An industrial cleaning agent, Diversol CX/A (DiverseyLever, Canada), was then added to this water to form a 2 % w/v solution. Air was sparged into the bottom of the reactor at a superficial gas velocity of 5 mm/s to ensure proper dissolution and proper contacting within the reactor. After one hour contact time, the reactor was emptied and flushed with fresh city water. This cleaning procedure was repeated a second time, culminating in two final cold city water fill-empty cycles.

The waste beer vessel was cleaned using a 2% w/v Diversol CX/A solution. Unlike the gas-lift bioreactors, sparging was not utilized since the WBT was not fitted with a sparger. Mechanical agitation was accomplished by rolling this vessel on its side. The cycle was repeated twice and was followed by two water fill-empty cycles.

Prior to steam sterilization, the 50-L bioreactors were connected to the waste beer vessel and the wort feed line was disconnected, as was the gas sparge line. Valves V10, V11, V12, V13, V14, V15, V16, V17 and V18 were opened and filters F5, F6 and F7 were removed. These gas lines and filters were autoclaved separately for 15 minutes at 121 °C. The steam supply was connected at valves V12 and V16. The steam valve was opened slowly to minimize damage to the equipment and the temperature inside the reactor was monitored closely. A 1-hour sterilization was performed once an internal temperature of 100 °C was reached. Valves V10, V11, V14, V15 and V18 were closed first. The steam supply was then shut off and sterilized filter F7 was connected. The sterilized filters F5 and F6 were immediately connected to the gas supply line and a superficial carbon dioxide gas velocity of 3 mm/s was started. This gas stream not only ensured that the reactors would not collapse during cool-down but also displaced any air present in the 50-L gas-lift bioreactors.

The wort feed line was connected to the bioreactor after an internal temperature of 20 °C was reached. With valves V2, V5, V10 and V14 still in the closed position and with valves V6, V7, V8, V9, V11, and V15 open, the steam supply was connected at either V3 or V6, depending on the wort supply being utilized. The steaming cycle lasted for 1 hour after which time valves V9, V11 and V15 were shut off simultaneously with the steam

WO 02/102961

42

PCT/CA02/00970

supply. Once the lines had reached room temperature (20 °C), valves V3 and V6 were closed and the steam supply was disconnected. At this point, the entire continuous fermentation system, including the wort supply, the 50 L bioreactors and the waste beer tank, was sterilized and ready for fermentation.

5.1.3 Fermentation Protocol

The 50-L pilot scale gas-lift draft tube bioreactors were used for the continuous primary fermentation of brewer's wort into beer. A glycol thermal jacket provided temperature control with a liquid temperature of 15 °C targeted throughout the fermentation trials. Each reactor was equipped with a temperature probe for measurement purposes and a temperature thermocouple and glycol solenoid valve for the adjustment of glycol feed to the reactor. The gas-lift fermenters were also equipped with a primary mixing gas (carbon dioxide or nitrogen), as well as with an air supply for oxygen dosing. The desired mixture of gas was selected by adjusting the appropriate rotameter/needle valve combination and then passing this gas mixture through the sterile filter (Millipore, Millex®-FG50, 0.2 µm Filter Unit) and into the draft-tube of the bioreactor. A superficial air velocity of 0.39 mm/s (0.4 scfh) was injected into the reactor for all the fermentations, while the primary mixing gas flowrate was adjusted to suit the specific immobilization type.

The 50-L gas-lift bioreactor followed a traditional batch start-up before a continuous mode of operation was started. After cleaning and sterilization as described in section 5.1.2, the gas-lift bioreactor was filled with 50 liters of wort from the wort holding tanks (WT1 or WT2) and then injected with 200 grams of yeast (4 g/L) through the Scandi-Brew® sterile sample port. In the case of the k-carrageenan gel beads, 20 L of beads were injected into the reactor, yielding an initial concentration of LCC3021 medium flocculent yeast of 4 grams per liter. The bioreactors were sampled daily and the evolution of diacetyl and the liquid specific gravity were closely monitored. Once the specific gravity had reached its minimum value and the diacetyl concentration had dropped below 30 µg/L, it was deemed that the system could be set into continuous operation.

The fermentation medium (wort) was continuously fed through the bottom of the reactor while "green" beer overflowed through the funnel at the top of the reactor. As the reactor's working volume was fixed, selecting the flowrate of the fresh wort feed into the reactor controlled the average liquid residence time. Liquid samples were withdrawn from the reactor daily at the outlet through the sterile sampling valve (Scandi-Brew®) for both chemical and microbiological analyses (methods described in Chapter 4).

At selected time periods, continuous fermentation product was collected from the 50-L primary fermentation bioreactor in larger quantities (40-L sterile stainless steel cans) and subjected to post-fermentation processing in order to produce a finished, saleable beer for evaluation and comparison to industrially-produced control beer. The selected 50-L bioreactor was disconnected from the waste beer vessel and immediately connected to the beer collection vessel. Once the desired liquid had been collected, the bioreactor was reconnected to the waste beer vessel. The collected "green" beer was subjected to a post-fermentation hold period in order to reduce the liquid's diacetyl level below 30 µg/L. The yeast carried over with the liquid was allowed to settle and the liquid (cells concentration of ~ 1-5 million cells/mL) was placed in cold storage for aging (7 days at 2 °C). After the

WO 02/102961

43

PCT/CA02/00970

aging period, the liquid was filtered, diluted to 5 % alcohol by volume and carbonated before being packaged in 341-mL beer bottles. All packaged liquid was then subjected to pasteurization through Labatt plant equipment.

5.2 CONTINUOUS GEL BEAD PRODUCTION PROCESS

The objective of this section of experimental work was to evaluate a continuous bead production process for the production of yeast-inoculated gel beads in order to supply immobilized LCC3021 yeast cells to the 50-L continuous gas-lift draft tube bioreactors described in section 5.1.

The production process (FIG. 8) first entailed the formation of an emulsion between the non-aqueous continuous phase (vegetable oil) and the aqueous dispersed phase (κ -carrageenan gel solution mixed with yeast cells) with the use of static mixers. Rapid cooling to induce polymer gelation followed this step. The formed beads were then introduced into a potassium chloride solution which both promoted hardening as well as separation of the beads from the oil phase.

The formation of the κ -carrageenan gel bead emulsion was conducted in a 37 °C temperature controlled water bath in order to prevent premature gelification of the carrageenan gel. The sterilized polymer was maintained at 37 °C in a temperature regulated water bath and the yeast inoculum was maintained at 20 °C prior to immobilization. Using Masterflex peristaltic pumps (Cole Parmer Company, USA), the gel and the yeast slurry were pumped through 24 elements of the 6.4 mm diameter static mixer in order to disperse the cells evenly through the gel. The sterilized oil, stored at room temperature, was pumped (Masterflex peristaltic pump) into the hot water bath to also reach a temperature of 37 °C.

The inoculated polymer (aqueous phase) was then mixed with the oil (continuous phase) through another series of static mixers to create the desired emulsion. This resulting emulsion was rapidly cooled to 5 °C inside a water/ice bath, provoking the gelling of the polymer droplets into beads. The beads then proceeded into a sterile 22 g/L potassium chloride solution which aided their hardening and allowed for their separation from the oil phase. The process oil was recycled back to the process and the aqueous phase (beads and potassium chloride solution) was transferred into a separate tank for size classification before loading into the 50-L bioreactors.

5.2.1 Static Mixer – Kenics Type

At the heart of this novel bead production process are Kenics static mixers (Cole Parmer Instrument Company, Niles, Illinois, USA). They are composed of a series of stationary elements placed in a tube with an internal diameter equivalent to that of the static mixer diameter. These elements form crossed channels, which promote the division and the longitudinal recombination of the liquid flowing through the static mixer. The transversal rupture of these finely created streamlines into an increasingly homogenous emulsion is furthermore provoked by this mixing system. Table 5.2 lists the three types of static mixers that were used in this study.

Table 5.2 Description of Kenics static mixers used. (supplied by Cole Parmer)

Model	Static mixer diameter D (mm)	Number of elements (N_s)
G-04667-04	6.4	12
G-04667-06	9.5	12
G-04667-08	12.7	12

5.2.2 Gel Production Materials

The two principal materials in the production of the gel beads were the oil and polymer. κ -Carrageenan (type X-0909, lot 330360, Copenhagen Pectin, Denmark), a polysaccharide polymer extracted from red algae, was a generous gift from Copenhagen Pectin A/S. This polymer possesses the unique property of thermo-gelation, where its gelling temperature depends on the concentrations of both κ -carrageenan ($[\text{Car}]$) and potassium chloride ($[\text{KCl}]$). The polymer was dissolved to a concentration of 30 g/L into distilled water at 80°C containing 2.0 g/L of KCl. The resulting gel solution had a gelling temperature of 28°C. The gel was autoclaved for 1 hour at 121 °C and then placed into a 40 °C water bath so that it would not harden. Commercial grade corn oil (Pasquale Bros. Inc., Canada) was also sterilized for 1 hour at 121°C and then stored at room temperature (20°C) until its use. A yeast slurry was prepared as described in section 4.1.

5.2.3 Measurement of Bead Diameter

Bead samples were collected at the exit of the 5 °C heat exchanger in flasks containing 100 mL of 22 g/L KCl solution. The beads were allowed to soak in this solution for 2 hours to promote their hardening. The oil was removed from the aqueous phase by successive washes with potassium chloride solution. The samples were then stored at 4 °C to prevent microbial contamination prior to analysis.

The measurement of bead diameter was performed using the image analysis software Optimas (Version 4.02, BioScan, Inc, USA) linked to a video camera (Pentax Macro 50 mm). A bead sample was transferred into a petri dish containing a fine film of water (used to separate the beads) and then placed under the camera. A total of 300 to 400 beads were measured using this system. The capabilities of the Optimas software lie between 100 μm and several mm with a maximum absolute error of 30 μm . The data obtained from Optimas was analyzed further using Microsoft Excel. The resulting sample size distributions were characterized by their sample mean diameter (D_s) and coefficient of variation (COV).

5.2.4 Bead System Evaluation - Experimental Plan

A total of 3 static mixer diameters ($D_s = 6.4 \text{ mm}, 9.5 \text{ mm}$ and 12.7 mm) were compared to assess which type of bead population would be produced as measured by the sample's average bead diameter and coefficient of variation of the size distribution. The number of static mixer elements (N_s) was varied between 12 and 120

WO 02/102961

45

PCT/CA02/00970

elements while the polymer volume fraction (ϕ_p) was studied between 8.3 % v/v and 50 %v/v gel in oil solution. Above an ϕ_p of 50%, the dispersed (gel) and continuous (oil) phases became inverted, that is to say, oil droplet inclusion within the polymer matrix resulted instead of gel droplets within the oil matrix. The superficial liquid velocity of the oil/gel emulsion through the emulsion section was adjusted in the range of 3.6 cm/s and 17.8 cm/s. The superficial liquid velocity (V_{sl}) through the emulsion static mixer was calculated by the following equation:

$$V_{sl} = (Q_{oil} + Q_{car})/S$$

where S is the cross sectional area of the tubing which contain the static mixer, Q_{oil} is the volumetric flowrate of the oil phase and Q_{car} is the volumetric flowrate of the carrageenan gel solution.

RESULTS AND DISCUSSION: FERMENTATIONS & MIXING DYNAMICS WITHIN 50-L GAS-LIFT BIOREACTORS

The use of immobilized cells for the production of ethanol has been published. In the last two decades, researchers have attempted to optimize the ethanol production process by coupling immobilized cell technology with continuous processing (Kuu, 1982; Gil, 1991; Maiorella, 1983). Many have met with great success and the use of continuous immobilized cell systems for ethanol production has become industrial. However, the implementation of such a continuous process in the brewing industry for the primary fermentation of beer is not as simple. Beer is comprised not only of ethanol, but also of a myriad of flavor compounds, which add both complexity and depth to the final product. The following chapter describes the results obtained by the author in the quest for producing a well-balanced beer within the pilot scale GLDT fermenter.

6.1 BATCH FERMENTATIONS IN THE PILOT SCALE GLDT SYSTEM

Batch fermentations utilizing freely suspended yeast cells were conducted in the 50-L pilot scale gas-lift draft tube bioreactor. These trials provided the opportunity to assess the feasibility of using such a system for the fermentation of wort into beer. In addition, the trials served to establish a benchmark for future comparison with continuous fermentation liquids. Two batch fermentations were undertaken in the 50-L bioreactor using a lager yeast strain from the Labatt Culture Collection (LCC3021). The yeast growth rate, as well as the consumption of nutrients and release of products, was monitored throughout the fermentations.

Figures 6.1 and 6.2 present the yeast concentration and viability profiles for Batch fermentation 1 and 2, respectively. In both instances, yeast growth followed the classical rates reported in literature. Viabilities as measured by methylene blue remained high throughout, with values remaining ranging near ninety percent. The carbohydrate concentration profiles for batches 1 and 2 are presented in Figures 6.3 and 6.4. The simple sugars, glucose and fructose, were taken up first by the yeast, followed by the consumption of maltose and maltotriose. The levels of maltotetraose as well as the larger polysaccharides remained unchanged through the fermentation. Ethanol is one of the most important by-products of yeast metabolism. An optimized anaerobic fermentation will produce about 48 g of ethanol and 47 g of carbon dioxide per 100 g of metabolized glucose. Small quantities of glycerol will also be produced (3.3 g per 100 g glucose) as this by-product is involved in

WO 02/102961

46

PCT/CA02/00970

maintaining the redox balance within the fermenting yeast, as well as supporting the cell in its osmotic balance, particularly in hypertonic media. Figures 6.5 and 6.6 illustrate the evolution of the ethanol and glycerol concentrations over fermentation time. The ethanol levels rise very slowly at the beginning of the fermentation due to the presence of oxygen in the fermentation medium as the yeast cells are in their aerobic growth phase. Once the oxygen has been depleted, ethanol levels rise exponentially until the fermentable sugars are depleted, at which point the concentration levels off. Vicinal diketones are also very important by-products of yeast metabolism. The total diacetyl and pentanedione concentrations for batches 1 and 2 are provided in Figures 6.7 and 6.8. These compounds rose until approximately 40 hours into the fermentation, corresponding to the peak levels of yeast concentration and are a result of the amino acid syntheses that yeast undertake during their growth phase. During the latter portion of the fermentation, diacetyl, pentanedione and their precursors α -acetylacetalate and α -ketobutyrate, are converted by the yeast to their corresponding, less flavor active diols. From the results presented in this section, it appeared that the two batch fermentations proceeded normally within the gas-lift draft tube bioreactor. Yeast growth and carbohydrate uptake followed the expected paths, as did the by-products, ethanol, diacetyl and pentanedione. A comparison of the individual batch data indicates that the two batches fermented in very similar fashion. Figure 6.9 compares the ethanol concentration from batches 1 and 2. The individual curves follow the same profile with many of the data points overlapping each other, indicating a level of repeatability. Although the sequence of consumption of substrates and subsequent yield of products did not change within the gas-lift system, the rate of fermentation did. The completion of primary fermentation represented by the peak ethanol concentration was achieved in both batches at about 80-85 hours. Diacetyl reduction to below 30 μ g/L was achieved in an additional 20 hours. These results suggested that primary fermentation of high gravity wort could be completed in about 100 hours as compared to 120-168 hours for traditional batch lager fermentation. The agitation provided by the gas-lift draft tube bioreactor contributed to this decrease in fermentation time due to the enhanced mass transfer afforded by such systems. With this information, future fermentation trials were performed with confidence that the gas-lift draft tube bioreactor did not significantly alter the fermentation metabolism of yeast and that fermenting with freely suspended yeast within this system could reduce batch fermentation time by at least 20 hours.

WO 02/102961

47

PCT/CA02/00970

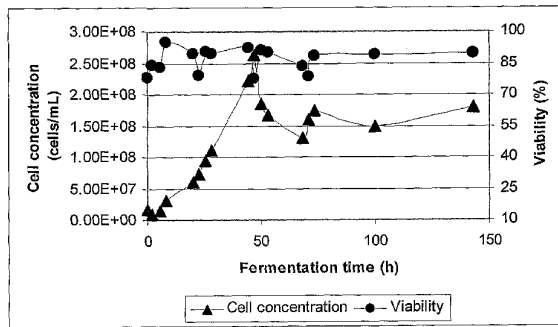


FIGURE 6.1 TOTAL CELL CONCENTRATION AND VIABILITY VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 1 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

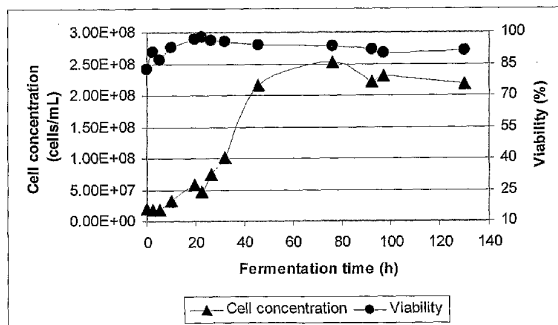


FIGURE 6.2 TOTAL CELL CONCENTRATION AND VIABILITY VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 2 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

48

PCT/CA02/00970

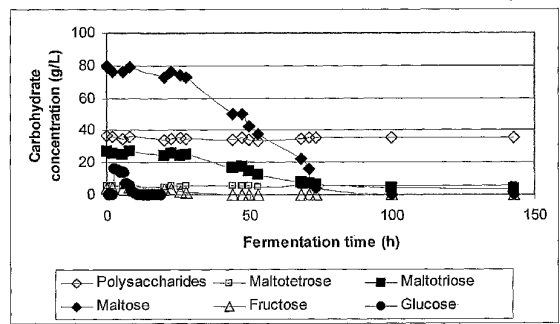


FIGURE 6.3 CARBOHYDRATE CONCENTRATION PROFILES VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 1 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

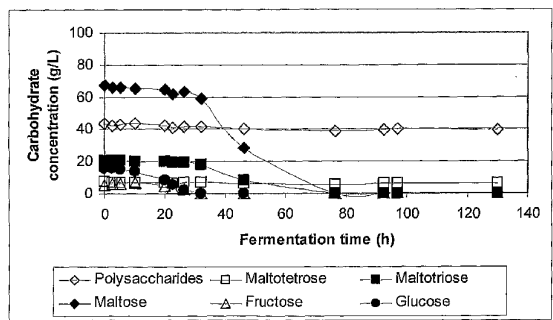


FIGURE 6.4 CARBOHYDRATE CONCENTRATION PROFILES VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 2 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

49 1 8 AUG 2004 1 7 10 00 00

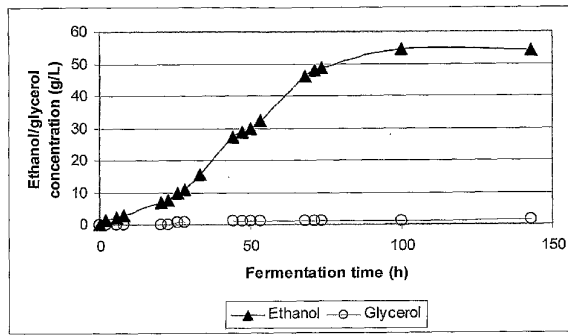


FIGURE 6.5 ETHANOL AND GLYCEROL CONCENTRATIONS VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 1 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

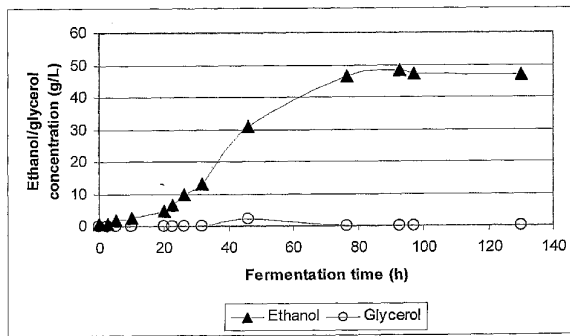


FIGURE 6.6 ETHANOL AND GLYCEROL CONCENTRATIONS VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 2 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

50

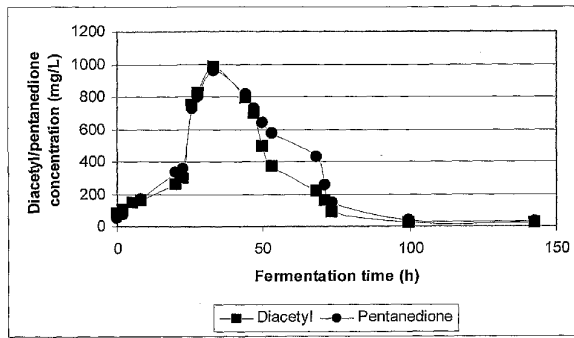


FIGURE 6.7 DIACETYL AND PENTANEDIONE CONCENTRATIONS VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 1 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

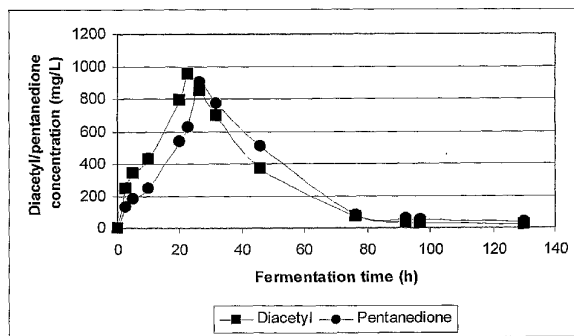


FIGURE 6.8 DIACETYL AND PENTANEDIONE CONCENTRATIONS VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC3021 YEAST BATCH FERMENTATION 2 WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

51

1 AUG 2002 17:08:04

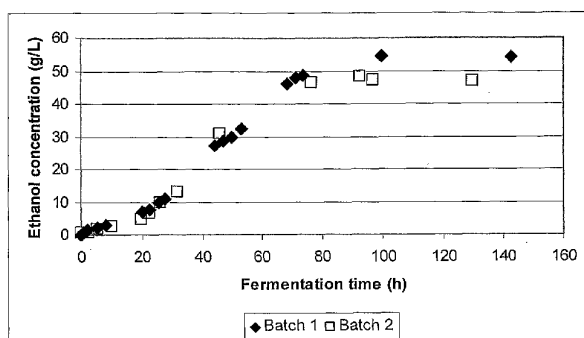


FIGURE 6.9 ETHANOL CONCENTRATION COMPARISON FOR BATCH 1 AND BATCH 2 VERSUS FERMENTATION TIME. LCC3021 YEAST WAS USED WITHIN A PILOT SCALE GLDT BIOREACTOR.

6.2 IMMOBILIZATION CARRIERS

Several carriers were investigated throughout this research project to identify the most promising alternatives for future development work. Three distinct modes of immobilization were tested within the 50-L gas-lift draft tube bioreactor. Two commercially available adsorption carriers with sizes ranging between 1 and 2 mm were evaluated. Siran[®], a glass bead carrier supplied by Schott Engineering (FIG. 9), and Celite[®], a diatomaceous earth bead provided by World Minerals (FIG. 10), were tested because of their proposed ease of handling and their commercial availability. Adsorption-based carriers provide the opportunity for more aseptic operation since the reactor can be first loaded with the carrier, followed by in-place sterilization and finally inoculation of yeast directly into the reactor. From an industrial standpoint, this option is very attractive as the carrier would not require special storage and the plant would not have to significantly alter its inoculation practices.

The initial fermentation results with both of these carriers in the 50-L gas-lift draft tube bioreactor were unfavorable. The problems that arose were mainly due to the high particle densities of Siran[®] and Celite[®] as compared to the liquid medium. Three phase gas-lift draft tube systems work best when the ratio of the carrier and the liquid densities is kept close to unity. In the case of Siran[®], the ratio was 1.34, whereas the ratio for Celite[®] was 1.31. The consequence of having such high density differences between the solid and liquid phase was a significant increase in the minimum gas fluidization velocity required to operate the 50-L gas-lift draft tube bioreactor. For 4 liters of Siran[®] carrier (8% v/v solids loading), a gas velocity of 21.5 mm/s (based on draft

WO 02/102961

52

PCT/CA02/00970

tube diameter) was required in order to achieve circulation. This higher gas velocity was not a significant problem when testing was performed in a water solution, however, as soon as the liquid medium was wort, catastrophic failure occurred within the gas-lift draft tube (GLDT) system. The required gas velocity caused excessive foaming within the reactor, which ultimately reduced the liquid level to below the draft tube, effectively stopping liquid and solid circulation. Failure similar to that encountered with the Siran[®] occurred when Celite[®] was substituted as the immobilization material. Due to these results, both of these adsorption-based carriers were abandoned in future gas-lift fermentation trials.

Using an entrapment-based carrier like κ -carrageenan allowed the system to be loaded on a 40% (v/v) basis with solid and required about 0.17 standard cubic meters per hour of gas (5.8 mm/s superficial gas velocity) for its fluidization and subsequent circulation. The positive results experienced with operating the system with carrageenan-entrapped yeast cell beads were due to the carrier's lower density (about 1100 kg/m³) and consequent ease of fluidization. Similarly, desired solids loading with the self-aggregating yeast, LCC 3021 (medium flocculent) and LCC290 (super flocculent), were achieved with gas fluidization velocities of approximately 3 mm/s required to ensure proper circulation. Section 6.2.1 describes in more detail the κ -carrageenan gel carrier and section 6.2.2 describes the self-aggregating yeast – LCC3021 flocs and LCC290 flocs which were evaluated as immobilization matrices for continuous primary fermentation within the 50-L GLDT fermenter.

6.2.1 κ -Carrageenan Gel Beads

Entrapment-based immobilization methods require the inclusion of the yeast cells within the matrix prior to their introduction into the fermentation vessel. Since in-situ reactor inoculation is not feasible at this time, it is necessary to produce these gel beads prior to the commencement of fermentation. It is still not clear what effects long term storage has on inoculated gel beads. In order to minimize any potential negative storage effects, it was decided to produce large quantities of gel beads within a short period of time (8 hours). The static mixer bead process described in Section 5.2 was therefore utilized for this purpose. The ideal beads would have particle diameters (D_p) between 0.8 mm and 1.4 mm with the coefficient of variation (COV) of the size distribution kept to a minimum. It was necessary to adjust several parameters of the bead making process to produce the desired amount and consistency of beads. The following section presents a summary of the bead process parameter selection and Section 6.2.1.2 describes the beads used in the continuous fermentation trials.

6.2.1.1 Bead Production Process: Variable Selection

Characterization of the bead making process was undertaken in collaboration with other researchers with emphasis placed on the following process parameters: static mixer diameter (D_s), number of static mixer elements (N_s), superficial liquid flowrate (V_{SL}) and polymer volume fraction (ϕ_c). Figures 6.12 to 6.21 summarize the results obtained through experimentation.

Figure 6.12 illustrates a typical size distribution obtained using the static mixer process to immobilize yeast within the carrageenan gel. In this example, the following parameters were utilized: static mixer diameter of 12.7 mm, 60 static mixer elements, superficial liquid velocity of 10.5 cm/s, and polymer volume fraction of

WO 02/102961

53

PCT/CA02/00970

0.25. The mean bead diameter was measured at 701 μm with a coefficient of variation of 45%. The cumulative size distribution illustrated in Figure 6.13 appeared to fit a normal cumulative distribution calculated with the sample mean and standard deviation. The de Kolmogorof Smirnov method (Scheaffer et McClave, 1990) was used to test the normality. The maximum distance between the experimental data and the fitted data (K-S statistic D) was calculated at 0.0274. The modified D value corresponding to data following a normal distribution must lie below 0.895 at a 95% confidence level. In our case, the modified D value was calculated to be 0.174, well below the limit of 0.895, and it can be concluded that our data fits a normal distribution.

All of the data collected from this bead making process showed size distributions with only one peak. Poncelet et al. (1992), however, showed the occurrence of satellite peaks and/or a secondary peak corresponding to beads with diameters smaller than 200 μm for alginate beads produced by dispersion in a stirred tank. It is possible that smaller beads produced in our process were simply lost during the bead-washing step and therefore would not appear in our size distribution data.

The effects of superficial liquid velocity and static mixer diameter on the average bead diameter and on the coefficient of variation of the size distribution are depicted in Figures 6.14 and 6.15 respectively. The average bead diameter decreases with an increase of superficial liquid velocity for all three static mixer diameters with a more pronounced effect on the 12.7-mm static mixer. Beads with average diameters larger than 700 μm were not produced with the smaller diameter static mixers (6.4 mm and 9.5 mm) at all tested liquid velocities, whereas the 12.7 mm diameter static mixer produced beads larger than 700 μm at liquid velocities below 11 cm/s. All three static mixer diameters produced beads with coefficients of variation between 38% and 58%. It also appeared that as the velocity increased the coefficient of variation decreased in all three cases. The coefficient of variation varied with the static mixer diameter, with the lowest values produced with the lowest diameter static mixer.

At a superficial liquid velocity of 3.5 cm/s, the polymer volume fraction appeared to affect the average bead diameter, while velocities above 7 cm/s produced relatively no differences at experimental values of ϕ_p varying between 0.083 and 0.5 (Figure 6.16). There appeared to be little or no effect on the coefficient of variation by the polymer volume fraction with increasing superficial liquid velocities (Figure 6.17).

Figures 6.18 and 6.19 illustrate the effects of superficial liquid velocity and the number of static mixer elements on the average bead diameter. As the liquid velocity increased, the average bead diameter decreased for all variations of the number of static mixer elements (Figure 6.18). The average bead diameter at a given liquid velocity was similar for 24 elements to 120 elements while the 12 element configuration produced bead diameters larger than the five other tested configurations. Figure 6.19 also shows that the average bead diameter reaches a minimum above 24 static mixer elements.

Figure 6.20 depicts the effect of superficial liquid velocity on the coefficient of variation for several static mixer element numbers. It appeared that liquid velocity did not affect the coefficient of variability for all tested configurations. The effect of the number of static mixer elements on the coefficient of variability was more pronounced (Figure 6.21). The coefficient of variation decreased with an increase of static mixer elements and reached a minimum of 45% at 60 elements and above. These results were consistent for superficial liquid velocities ranging between 3.6 cm/s and 17.8 cm/s.

It had been hypothesized that an increase in the static mixer diameter (D_s) would create heterogeneity of shear forces within the mixer, inducing an increase in the size dispersion as measured by the coefficient of variation.

WO 02/102961

54

PCT/CA02/00970

Concurrently, an increase in D_s would decrease the intensity of the shear forces thus increasing the mean bead diameter. Both of these effects were observed in the experimentation with the smallest diameter static mixer producing beads with the smallest average bead diameter (400 μm – 500 μm) and the smallest coefficient of variation (approximately 40%) or size dispersion.

The energy required to create an emulsion is proportional to the interfacial area created by the polymer and the oil phase. The smaller the bead size, the larger the energy required for formation. Berkman and Calabrese (1988) have shown that an increase in the average superficial liquid velocity (V_s) provokes an increase in the dissipated energy per unit mass of fluid, thus favoring a reduction in the bead size. An increase in the average superficial liquid velocity (tested between 3.6 cm/s and 17.8 cm/s) produced a decrease in the average bead size. Such a velocity increase results in a pressure differential between the static mixer inlet and outlet. This pressure differential is proportional to the dissipated energy per unit mass of liquid. An increase in velocity therefore induces an increase in the system's dissipated energy, which favors a reduction in bead size. The reduction in bead diameter, D_B , was observed as the superficial liquid velocities increased. Al Taweel and Walker (1983) have shown that a dynamic equilibrium is established between the formation of beads and the coalescence between beads for high velocities corresponding to significant turbulence levels. For constant static mixer diameter (D_s) and number of elements (N_e), the superficial velocity had little effect on the coefficient of variation. Velocity is therefore a parameter, which allows the manipulation and selection of the average bead diameter without significantly modifying the size dispersion.

Within the scope of this research, the carrageenan gel volume fraction (ϕ_g) had little effect on either the average bead diameter or the coefficient of variation, except for the lowest studied velocity of 3.6 cm/s where the average bead diameter decreased with a decrease in ϕ_g . Audet and Lacroix (1989) studied this parameter for the production of carrageenan beads in a two-phase dispersion system (batch stirred tank not continuous static mixer process) and they concluded that ϕ_g had no effect on the mean bead diameter for a polymer solution with a carrageenan concentration of 3% (w/v). The specific effect of the κ -carrageenan gel concentration on the bead size distribution was examined by Audet and Lacroix (1989) who showed that this parameter strongly influenced the size distribution. Increasing gel concentrations resulted in increasing average bead diameter (D_B) and coefficient of variation (COV). The noted effect was attributed to the increased viscosity of the gel at higher concentrations resulting in lower shear forces on the emulsion and thus larger beads. Although the effect of gel concentration on bead size was not investigated in this thesis, it could be used as another means of controlling bead size if necessary.

An increase in the number of mixing elements (N_e) increases the average residence time that a fluid element spends inside the static mixer, resulting in a more homogenous mixture and thus the formation of smaller and more tightly dispersed beads. In the experimentation, an equilibrium in the dispersion (measured by the coefficient of variation) was reached around 60 to 72 elements. Middleman (1974) has shown that 10 elements were sufficient to attain such an equilibrium in the case of emulsions with low viscosity (0.6 to 1.0 cP). The carrageenan solution used in these experiments [3% w/v] had an average viscosity of 200 cP and the oil's viscosity was 25 cP. Consequently, this higher viscosity required a longer residence time inside the mixer in order to reach pseudo homogeneity.

WO 02/102961

55

PCT/CA02/00970

18 AUG 2004 17:08:04

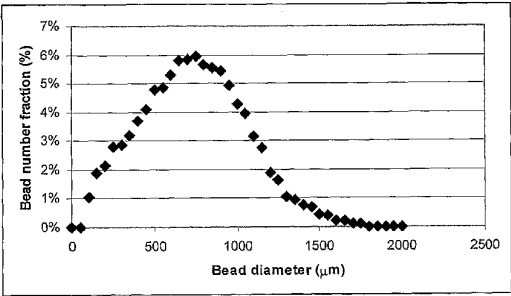


FIGURE 6.12. TYPICAL SIZE DISTRIBUTION OF BEADS PRODUCED USING THE STATIC MIXER PROCESS. THE PROCESS PARAMETERS IN THIS EXAMPLE WERE: $D_s = 12.7$ MM, $N_s = 60$, $V_{sl} = 10.5$ CM/S AND $\square_c = 0.25$.

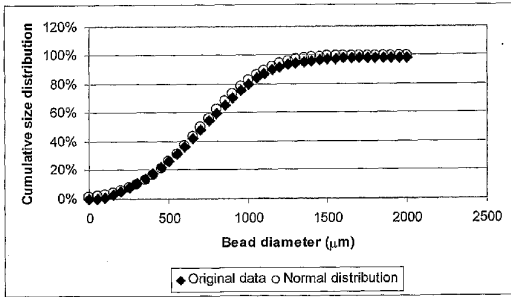


FIGURE 6.13. TYPICAL CUMULATIVE SIZE DISTRIBUTION OF BEADS PRODUCED USING THE STATIC MIXER PROCESS. THE PROCESS PARAMETERS IN THIS EXAMPLE WERE: $D_s = 12.7$ MM, $N_s = 60$, $V_{sl} = 10.5$ CM/S AND $\square_c = 0.25$.

WO 02/102961

56

PCT/CA02/00970

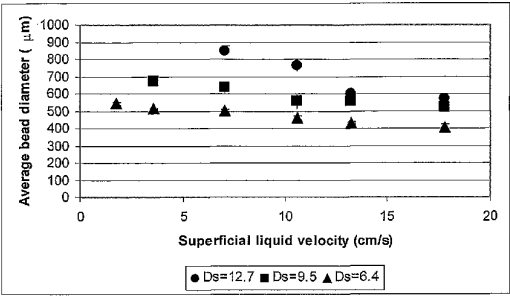


FIGURE 6.14. SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) VERSUS AVERAGE BEAD DIAMETER (μM). THREE DIFFERENT STATIC MIXER DIAMETERS WERE EVALUATED (D_s OF 12.7 MM, 9.5 MM AND 6.4 MM). THE NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s) WAS KEPT CONSTANT AT 48 AND THE POLYMER FRACTION (ϕ_c) WAS SET AT 0.25.

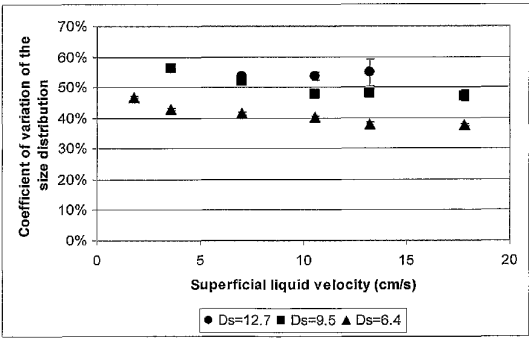


FIGURE 6.15. SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) VERSUS COEFFICIENT OF VARIATION OF THE BEAD DIAMETER (%). THREE DIFFERENT STATIC MIXER DIAMETERS WERE EVALUATED (D_s OF 12.7 MM, 9.5 MM AND 6.4 MM). THE NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s) WAS KEPT CONSTANT AT 48 AND THE POLYMER FRACTION (ϕ_c) WAS SET AT 0.25.

WO 02/102961

57

PCT/CA02/00970

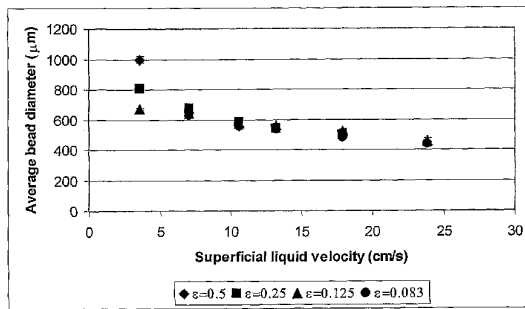


FIGURE 6.16. SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) VERSUS AVERAGE BEAD DIAMETER (μM). FOUR POLYMER FRACTIONS (ϵ OF 0.5, 0.25, 0.125 AND 0.083) WERE EVALUATED. THE NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s) WAS KEPT CONSTANT AT 48 AND THE STATIC MIXER DIAMETER (D_s) WAS SET AT 12.7 MM.

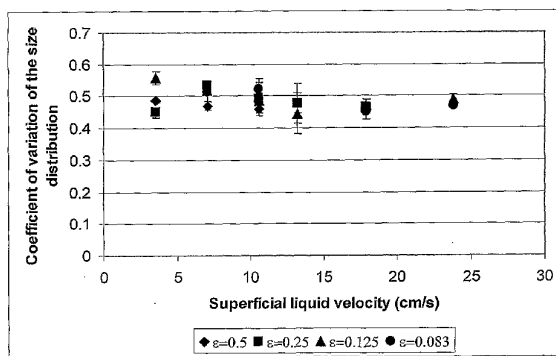


FIGURE 6.17. SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) VERSUS COEFFICIENT OF VARIATION OF THE BEAD DIAMETER (%). FOUR POLYMER FRACTIONS (ϵ OF 0.5, 0.25, 0.125 AND 0.083) WERE EVALUATED. THE NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s) WAS KEPT CONSTANT AT 48 AND THE STATIC MIXER DIAMETER (D_s) WAS SET AT 12.7 MM.

WO 02/102961

58

PCT/CA02/00970

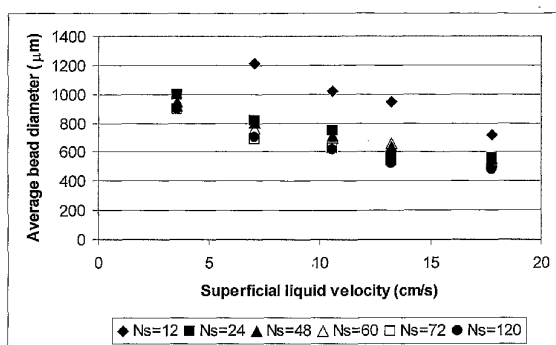


FIGURE 6.18. SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) VERSUS AVERAGE BEAD DIAMETER (μm). THE NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s) WAS VARIED TO 12, 24, 48, 60, 72 AND 120. THE POLYMER FRACTION (ϕ_c) WAS KEPT CONSTANT AT 0.25 AND THE STATIC MIXER DIAMETER (D_s) WAS SET AT 12.7 MM.

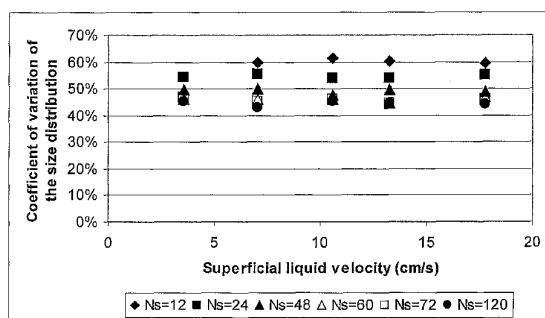


FIGURE 6.19. SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) VERSUS COEFFICIENT OF VARIATION OF THE BEAD DIAMETER (μm). THE NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s) WAS VARIED TO 12, 24, 48, 60, 72 AND 120. THE POLYMER FRACTION (ϕ_c) WAS KEPT CONSTANT AT 0.25 AND THE STATIC MIXER DIAMETER (D_s) WAS SET AT 12.7 MM.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

59

PCT/CA02/00970

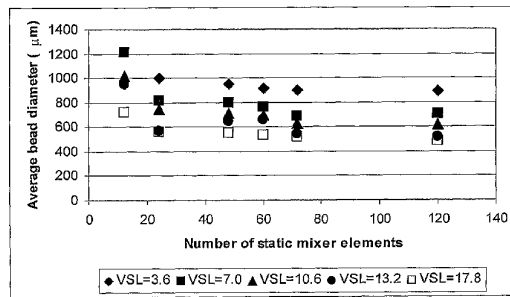


FIGURE 6.20. AVERAGE BEAD DIAMETER (μm) VERSUS NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s). SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) WAS VARIED TO 3.6, 7.0, 10.6, 13.2 AND 17.8. THE POLYMER FRACTION (ϕ_c) WAS KEPT CONSTANT AT 0.25 AND THE STATIC MIXER DIAMETER (D_s) WAS SET AT 12.7 MM.

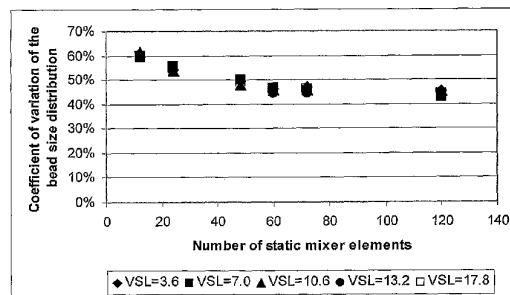


FIGURE 6.21. COEFFICIENT OF VARIATION OF THE BEAD DIAMETER (%) VERSUS NUMBER OF STATIC MIXER ELEMENTS (N_s). SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (CM/S) WAS VARIED BETWEEN 3.6 AND 17.8. THE POLYMER FRACTION (ϕ_c) WAS KEPT CONSTANT AT 0.25 AND THE STATIC MIXER DIAMETER (D_s) WAS SET AT 12.7 MM.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

60

PCT/CA02/00970

6.2.1.2 Bead Production Process: κ -Carrageenan Bead Characteristics

From the data described in the previous section, it was possible to select bead production process parameters to produce beads with the desired characteristics for the fermentation trials. To minimize the coefficient of variation for a particular static mixer diameter, 60 mixing elements were chosen to create the oil-gel dispersion. Beads with an average diameter of approximately one mm were selected to minimize external mass transfer and to facilitate separation by mechanical means from the fermenting liquid. To achieve this, the largest static mixer tested (12.7 mm) and the lowest tested velocity (3.6 cm/s) were selected. Since the polymer fraction had little effect on the coefficient of variation, a 50/50 ratio ($\square = 0.5$) of gel to oil was employed in order to maximize bead productivity.

Several batches of gel beads, with LCC3021 yeast entrapped, were produced in the laboratory using the process described in Section 5.2 with $D_s = 12.7$ mm, $N_s = 60$, $V_{SL} = 3.9$ cm/s and $\square_c = 0.5$. The resultant beads (FIG. 11) were passed through a series of sieves to remove beads larger than 2.0 mm and those smaller than 0.5 mm. The resulting particle size distribution is presented in Figure 6.23. Figure 6.24 illustrates the cumulative size distribution of these beads. This was the typical distribution employed throughout the 50-L gas-lift fermentation trials.

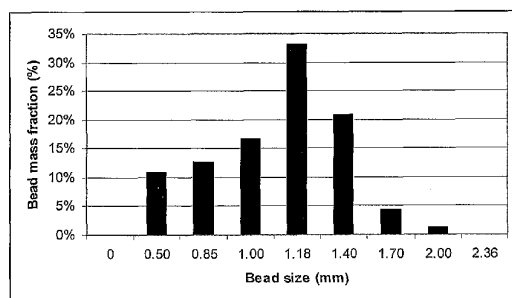


FIGURE 6.23. BEAD SIZE DISTRIBUTION OF κ -CARRAGEENAN GEL BEADS UTILIZED IN THE CONTINUOUS FERMENTATION TRIALS WITHIN THE 50L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR.

WO 02/102961

61

PCT/CA02/00970

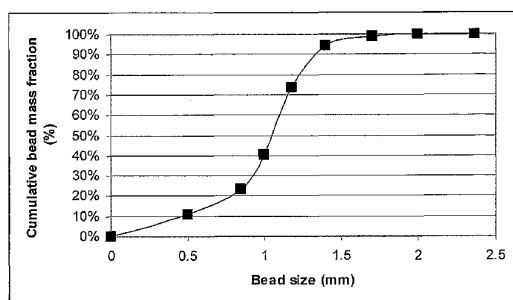


FIGURE 6.24. CUMULATIVE BEAD SIZE DISTRIBUTION OF K-CARRAGEENAN GEL BEADS UTILIZED IN THE CONTINUOUS FERMENTATION TRIALS WITHIN THE 50L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR.

6.2.1.3 Limitations of the Bead Process With Respect to Industrial Scale Application

A process producing 10 L of beads per hour, per static mixer, was developed and implemented at a pilot plant level. Several aspects of this process require further development and/or optimization before industrial scale bead production can be considered. An increase in volumetric productivity of the system is necessary in order to supply the volume of immobilized cells required to feed a large-scale bioreactor. For example, a 2000-hL gas-lift draft tube bioreactor would require approximately 800 hL of beads. To achieve such volumes, an increase in both the flows of gel and oil are necessary. The data suggest that the resulting increased velocity using the static mixers of 6.4 mm to 12.7 mm diameters would induce the formation of beads too small to be used in the fermentation system. It would therefore be necessary to increase the diameter of the static mixers, thus increasing the average bead diameter. However, the use of static mixers with a larger diameter will also increase the bead size dispersion, producing a larger percentage of beads outside the desired range.

Another alternative would be the implementation of a system using static mixers of medium size (12.7 mm) placed in parallel. With a ten static mixer system, productivities reaching 100 L/h are conceivable. For the 2000-hL industrial example, the process would run continuously for 800 hours or approximately 34 days to produce the required volume of beads. Several systems could be implemented to reduce the production time but this would add yet another level of complexity. The production time could become less of an issue if it were possible to store the beads for extended periods of time while retaining yeast viability. It is conceivable that a process for drying the beads or storing the beads in a vacuum-sealed container could be developed.

Poncelet and co-workers (1993) have published work indicating that the type of static mixer used to create the dispersion must be considered. With their proposed system using another type of static mixer, as opposed to the

WO 02/102961

62

PCT/CA02/00970

Kenics-type used in this research, it may be possible to utilize a larger diameter mixer without compromising the size distribution of the beads (maintaining a low coefficient of variation).

Additional concerns with the existing pilot process include operating the system at 40 °C and the use of vegetable oil and potassium chloride solutions for bead production. Due to the high production temperature, both heating and cooling systems are required in the process. The potential thermal shock that the yeast cells are exposed to requires additional investigation so that an assessment can be made as to potential negative implications. In this study, immobilized cell beads with high yeast viabilities (above 90%) were produced but any other effects that the process may have caused on the yeast population were not investigated.

Because oil is used to produce the desired emulsion and consequently the formation of the beads, and since oil will act as a surfactant thereby suppressing foam formation, the residue of oil on the bead surface is an issue. Although this residue would help during the fermentation stage, any carryover into the final beer would be detrimental, as foam is desirable in finished products. The large volumes of potassium chloride solution utilized to separate the solid phase (beads) from the oil and the method of removing this saline solution from the bead slurry before the introduction of beads into the bioreactor requires attention. Otherwise it may be necessary to flush this solution from the reactor following the addition of beads to the reactor.

Since the immobilized cell beads are produced outside the bioreactor, aseptic techniques must be utilized throughout the bead formation process and sterility maintained until the beads are introduced into the bioreactor. The various transfer points between tanks provide opportunity for contamination and must be monitored due to the fact that the presence of a contaminant could result in its co-immobilization within the bead. As a result of diligence within the laboratory, it was possible to consistently produce aseptic beads. However, the environment within a plant setting may not be as hospitable as the laboratory, therefore requiring much stricter control.

6.2.2 Flocculent Yeast Cells

One of the most natural form of immobilization is the self-aggregation of microorganism into flocs of cells. Calleja and Johnson (1977) have proposed three possible reasons for cells to come in contact with each other to form aggregates, with all distinctive bonding properties. The first involves cells of different sexes being attracted to each other by the release of pheromones (α and a-factors). This type of bonding is temporary and involves protein-protein bonding between α and a-agglutinins anchored in the complementary cell walls.

Cells may also aggregate through their failure to separate from the mother cell during the budding process. This failure may be inherent to the particular yeast strain or can be caused by nutrient deprivation or mutation of a number of genes. This phenomenon is referred to as chain-formation and not flocculation. The bonds between these cells can be irreversibly destroyed by mechanical shear (Stratford, 1996).

The third scenario is more commonly known as flocculation. Stewart and Russell (1981) have defined flocculation as a reversible "phenomenon wherein yeast cells adhere in clumps and either sediment rapidly from the medium in which they are suspended or rise to the medium's surface". Extensive evidence indicates that flocculation is genetically controlled and the mechanism of flocculation relies on selected molecules acting as bridges between adjacent cell walls. More specifically, it is thought that specific lectins are bound to the β -mannans of the adjoining cells in the presence of Ca^{2+} ions (Calleja and Johnson, 1977). This protein/carbohydrate bonding was found to be reversibly inhibited by chelating agents or by specific sugars.

WO 02/102961

63

PCT/CA02/00970

FIG. 12 depicts three possible yeast cell configurations, namely non-flocculent yeast, chain-forming yeast and flocculent yeast. In the case of the chain-forming yeast, although the cells have aggregated, it is not considered as a type of flocculation since these cells were never single to start with and flocculation implies single cells coming together to form a mass because of favorable environmental conditions (Ca^{2+} ions and low levels of inhibiting sugars). In the case of flocculent cells, the specific size of the floc may be dependent on cell genetics as well as on the hydrodynamic conditions to which the cell is exposed (shear environment).

FIG. 13 and FIG. 14 highlight two Labatt lager yeast strains with varying degrees of flocculation. The medium flocculent yeast strain, LCC3021, is presented in FIG. 13. In the presence of calcium ions, this strain will form 0.5 mm to 1.0 mm aggregates once glucose has been depleted from the liquid medium. FIG. 14 is a picture of the superflocculent yeast strain, LCC290, which will form flocs larger than 1 mm in size and under low shear environment will aggregate to clumps measuring up to 5 mm in diameter. Under moderately agitated conditions, the floc diameter of LCC290 will be between 1 and 2 mm.

Several measurement methods have been proposed for the assessment of yeast flocculation (Speers & Ritcey, 1995; Akiyama-Jibiki et al., 1997; Teixeira et al., 1991; Stewart & Russell, 2000). In "Brewer's Yeast" (Stewart & Russell, 2000), it has been proposed that yeast flocculation methods can be subdivided into three categories, namely sedimentation methods, static fermentation methods and direct observation of floc formation in growth medium.

The sedimentation method first described by Burns in 1937 was modified by Helm and colleagues in 1953 and is currently part of the standard methods of analysis recognized by the Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992). This technique is referred to as an in vitro technique as the yeast's settling characteristics are assessed in a calcium-sulfate buffer and not in the actual fermentation medium. The static fermentation method (also known as the Gilliland method) involves growing the yeast in hopped wort and measuring its flocculation characteristics in vivo. Both these methods involve measurements of the absorbance of settled yeast samples vs. yeast samples that have been deflocculated using a UV/Visible spectrophotometer.

Stewart and Russell (2000) present a measurement method for yeast flocculation by visually describing the level of flocculation that occurs in samples of yeast grown in 20 mL screw capped glass bottles. To express the degree of flocculation, they used a subjective measure, for example: 5 – extremely flocculent, 4 – very flocculent; 3 – moderately flocculent, 2 – weakly flocculent, 1 – rough and 0 – non-flocculent. The superflocculent yeast strain, LCC290 received a classification of 4 – very flocculent whereas the LCC3021 yeast strain was classified as 3 – moderately flocculent.

Flocculence is an important characteristic in the brewing industry as the yeast's natural tendency to either sediment or rise to the surface is commonly used as a separation method for this yeast from the fermenting liquid. However, a yeast strain that flocculates before the fermentation has completed is undesirable since the liquid will not have reached its ideal alcohol and residual sugar level. In continuous fermentation and in particular, gas-lift draft tube continuous fermentation, flocculent yeast act as the immobilization matrix. Their tendency to settle is compensated for by the injection of the sparging gas, which keeps them in suspension. With such a system, the fear of under-fermenting the liquid medium is eliminated since the solid particles are continuously circulated and kept in intimate contact with the fermenting liquid.

WO 02/102961

64

PCT/CA02/00970

In section 6.2.2.1, the settling properties and the fermentation performance of the superflocculent yeast, LCC290, were characterized. The interest was in identifying the onset of flocculation for this particular yeast strain. In addition, the settling velocity of the yeast was determined in order to provide valuable information that could be used for the future in the design of yeast settling vessels.

6.2.2.1 Characterization of Superflocculent Yeast, LCC290

Before performing continuous fermentations with the superflocculent yeast LCC290 within the gas-lift draft tube bioreactor, it was decided to characterize the yeast in lab scale, shake flask fermentations. Figure 6.28 shows the evolution of the yeast population over time. As expected, the concentration increased sharply in the first 48 hours then leveled off with a slight decrease at the end of fermentation. In the first 48 hours, there were enough nutrients and oxygen present in the wort to allow for yeast growth. However, as the yeast continues to consume carbohydrates in the absence of oxygen, it will not reproduce but rather enter into its anaerobic fermentative phase. Once the carbohydrate supply was depleted, a small population of yeast began to die. This phenomenon is depicted in Figure 6.29, where cell viability decreased from approximately 97 % to just above 90 %.

Figure 6.30 shows the consumption of carbohydrates over the course of fermentation. The yeast cells first consumed the simple sugars glucose and fructose then sequentially took up maltose and maltotriose. Brewing yeast cannot, however, metabolize either maltotetraose or the longer chain polysaccharides (poly 1 & 2). As the overall carbohydrate concentration decreased (represented by specific gravity curve in Figure 6.31), the ethanol concentration increased proportionately. At approximately 37 hours into the fermentation, ethanol and carbohydrate concentrations were equal.

From a growth and carbohydrate metabolism perspective, it appeared that the superflocculent yeast LCC290 behaved, as would the industrial yeast strain LCC3021. The fermentation appeared to reach completion when the liquid specific gravity reached approximately 2.7 °P. It is common for flocculent yeast strains to form large clumps (flocs) and settle out of solution before end-fermenting; this phenomenon is known in the brewing industry as a "hung" fermentation. In our batch trials, we were able to end ferment because the flasks were agitated therefore keeping the yeast in suspension and in close contact with the nutrient supply.

Another important characteristic that was investigated was the yeast's ability to flocculate. In particular, we were interested in establishing the speed, with which the yeast would settle, as well as get an indication of when this particular yeast strain would commence flocculation. Both of these characteristics are of importance for the continuous fermentation trials as they play a role in maintaining a healthy yeast population within the gas-lift fermenter. Figure 6.32 shows yeast-settling curves over the course of fermentation. Very little settling occurred in the sample tested at 24 hours into the fermentation. Flocculation is inhibited by the presence of certain sugars; glucose is a known inhibitor, hence flocculation will commence only once this inhibitor has been depleted. In the sample at 40 hours batch fermentation, the cells began to flocculate and settled out of solution when tested using the method described in section 4.7. Settling was very rapid for all tested intervals, except at 24 hours when no settling occurred. During the slowest settling trial, conducted at 40 hours, the yeast took 90 s to completely settle out of the test apparatus. At 71 hours, less than 50 s were required for settling.

WO 02/102961

65

PCT/CA02/00970

Researchers have proposed that settling rate is a function of solids concentration (Coe and Clevenger, 1916). Figure 6.33 plots the settling velocity of the solids at a given yeast cell concentration. The data points for this curve were generated using the method proposed by Kynch (1952) on the settling data collected at each fermentation interval. The results lie on approximately the same curve, confirming the same phenomenon that Coe and Clevenger (1916) had observed.

The results collected during the settling test indicated that the superflocculent yeast strain LCC290 will flocculate at liquid specific gravities of 6 °P and lower. This value can be used as a guide for continuous fermentations to indicate where the pseudo-steady-state liquid specific gravity should be kept if it is desired to keep the cells flocculated. Operating the reactor above 6 °P would risk destabilizing the flocculated cells and possibly lead to the washout of the immobilized yeast population. The settling characteristics of the superflocculent yeast indicate that the yeast population will settle out quite quickly if left stagnant. With a three-phase gas-lift draft tube bioreactor, it will be possible to keep these cells in circulation, however, in the case of a failure in the gas supply system, the cell population would settle out quickly and possibly necessitate auxiliary sparge gas to resuspend the solids. For post-fermentation processing, this rapid settling characteristic is advantageous as solids separation devices such as gravity settlers can be used for bulk solids removal. In the brewing industry, this would decrease the solids load on the centrifuging equipment and therefore allow for longer run times between centrifuge bowl discharges. Less beer losses would be expected and the level of off-flavors imparted to the beer by the centrifuge (although minimal) would be minimized because of the lower levels of yeast biomass passing through the centrifuge.

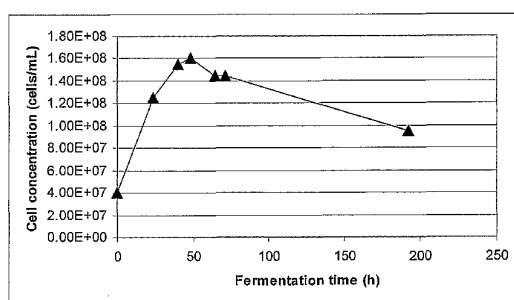


FIGURE 6.28 TOTAL YEAST CELL CONCENTRATION OF LCC290 AGITATED BATCH FERMENTATIONS VERSUS FERMENTATION TIME. FERMENTATION TEMPERATURE WAS KEPT AT 15 °C.

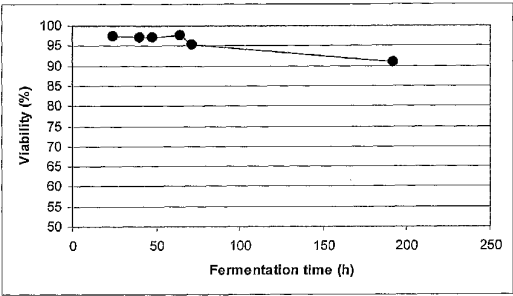


FIGURE 6.29 YEAST CELL VIABILITY AS MEASURED BY METHYLENE BLUE VERSUS FERMENTATION TIME.

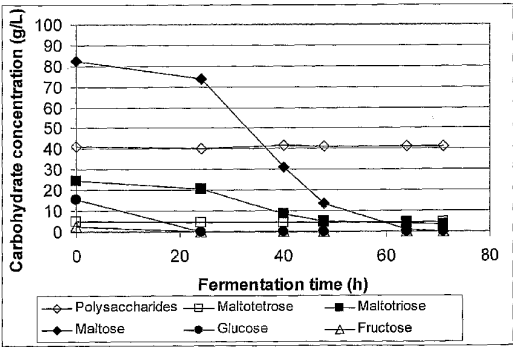


FIGURE 6.30 CARBOHYDRATE CONCENTRATION PROFILES VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC290 YEAST BATCH FERMENTATIONS.

WO 02/102961

67

PCT/CA02/00970

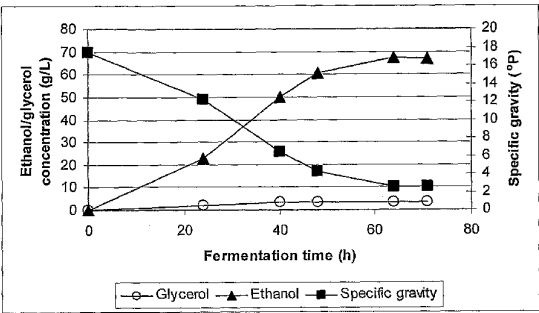


FIGURE 6.31 ETHANOL AND GLYCEROL CONCENTRATIONS AND LIQUID SPECIFIC GRAVITY VERSUS FERMENTATION TIME FOR LCC290 YEAST BATCH FERMENTATIONS.

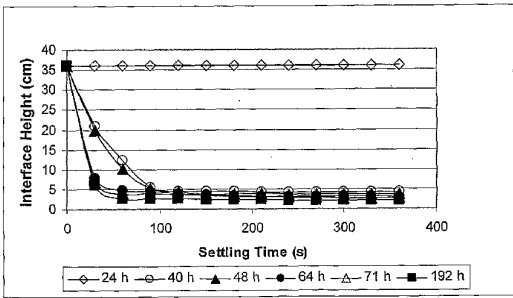


FIGURE 6.32 INTERFACE HEIGHT OF A YEAST SUSPENSION VERSUS SETTLING TIME. THE VALUES FOR THIS CHART WERE COLLECTED AT SEVERAL FERMENTATION INTERVALS.

WO 02/102961

68

PCT/CA02/00970

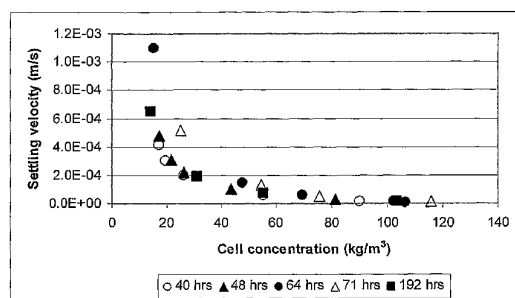


FIGURE 6.33 SETTLING VELOCITY OF A YEAST SUSPENSION VERSUS CELL CONCENTRATION. THE VALUES FOR THIS CHART WERE COLLECTED AT SEVERAL FERMENTATION INTERVALS.

6.3 ASSESSMENT OF GAS-LIFT TECHNOLOGY FOR CONTINUOUS FERMENTATION OF BEER

The first and most important goal of this thesis was to evaluate the feasibility of operating the 50-L pilot scale gas-lift bioreactor in continuous mode using κ -carrageenan gel beads to entrap *Saccharomyces carlsbergensis* cells (described in section 6.2.1). In addition, it was our desire to investigate whether a North American type lager beer of acceptable flavor quality could be produced with such a system. We also set out to determine the minimum residence time required for complete attenuation of the high gravity wort (17.5 °P) as well as establish an operating range for oxygen within the continuous fermentation system.

The minimum residence time where all wort sugars were consumed was 24 hours. This can be compared with a classical batch fermentation time of five to seven days. The dissolved oxygen concentration measured by the in-place Ingold oxygen probe within the bioreactor was close to zero regardless of the oxygen added to the sparging gas (ranged from 0 to 20% v/v). This indicated that the oxygen supplied in the wort was either consumed quickly by the yeast cells or was simply vented in the off-gas. The level of free cells in the overflow of beer was in the order of 10^8 cells per mL of green beer. The levels of the vicinal diketones, diacetyl and 2,3-pentanedione, as well as the level of acetaldehyde, decreased with decreasing oxygen proportions in the sparging gas (Figures 6.34 and 6.35). The measured esters (ethyl acetate and isoamyl acetate) and higher alcohols (propanol, isobutanol, isoamyl alcohol) did not appear to be affected by the change in oxygen supply (Figure 6.36).

Figure 6.37 compares various flavor-active compounds in two finished test beers produced with the continuous immobilized cell system to a control beer produced industrially (free cell batch fermentation). Some differences

WO 02/102961

69

PCT/CA02/00970

in esters (ethyl acetate, isoamyl acetate) and in higher alcohols (propanol) were consistently observed between the continuously fermented beer and the control, regardless of the level of oxygen supply. The taste of the finished beer produced with 2% oxygen was judged by a trained taste-panel to be relatively close to the control beer (industrial product). The beer produced with 20% oxygen, however, was judged unacceptable with signs of flavor oxidation and a "papery" and "winey" taste.

At pseudo-steady state, the pilot scale bioreactor was operated with a residence time of 24 hours over a 6-week period. The "green" beer had an acceptable flavor profile and no major defects (sulfury off-notes) were noted.

The amount of oxygen in the sparging gas proved to be a critical element in this experimentation. Beers produced with 2 to 5 % oxygen in the sparging gas gave the best taste profiles. This critical control point needs further attention with the focus on more accurate oxygen measurement techniques with measurements performed on a larger set of pre-fermentation and post-fermentation analytes.

In traditional batch primary fermentation, the wort is dosed with oxygen before being transferred into the fermenter. After inoculation of the medium, the dissolved oxygen concentration rapidly decreases as the yeast cells consume it (first 24 hours of fermentation where yeast growth occurs). The remainder of the fermentation is therefore carried out under mostly anaerobic conditions. The use of a continuous homogenous system for primary fermentation does not allow for this change of oxygen concentration over time. For this reason, it may be very difficult to attain a complete flavor match for beer produced using continuous and batch fermentations. Regardless of these differences, the bioreactor configuration tested in this initial assessment produced a beer with an acceptable flavor quality and analytical profile. By using a gas-lift bioreactor with relatively small-sized beads (~1 mm), it was possible to increase the volumetric bioreactor productivity by reducing the time for primary fermentation by several days. The level of biomass released in the exiting beer showed that the level of yeast growth in the immobilized cell bioreactor was equivalent to that of free cell batch fermentation under similar conditions. These observations confirm the reliance of flavor formation on the level of yeast growth. This could explain the failure of previous attempts to produce acceptable beer with restricted growth immobilized cell systems. The supply of a controlled gas mixture can be a powerful tool in the fine adjustment of beer organoleptic properties in continuous immobilized cell fermentations.

The high level of diacetyl in the exiting liquid was also observed by other researchers (Virkajarvi & Pohjala, 1999; Kronlof et al., 2000). In North American lager type beers, the target level of diacetyl is 30 $\mu\text{g/L}$ as compared to the 400-800 $\mu\text{g/L}$ levels in the exiting continuous fermentation liquid. The use of traditional aging technology (cold aging at 2 °C for 14 days) lowered diacetyl to the desired range but to the detriment of overall process productivity. The use of the rapid secondary fermentation technology reported in Chapter 2 would help reduce diacetyl without significantly lowering productivity (2-hour process). The additional costs, however, may be prohibitive and all brewers may not want to subject their beer to high temperatures (80 °C to 90 °C).

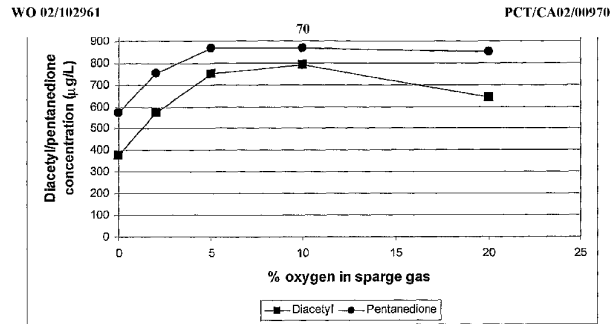


FIGURE 6.34 VICINAL DIKETONES CONCENTRATION VERSUS PERCENT OF OXYGEN IN THE SPARGE GAS. THE FERMENTATIONS WERE CARRIED OUT IN THE 50-L GAS-LIFT SYSTEM LOADED WITH 40% (v/v) CARRAGEENAN GEL BEADS. THE TOTAL SPARGE GAS RATE WAS KEPT CONSTANT AT 6.4 SCFH. THE RESIDENCE TIME WAS 24 HOURS.

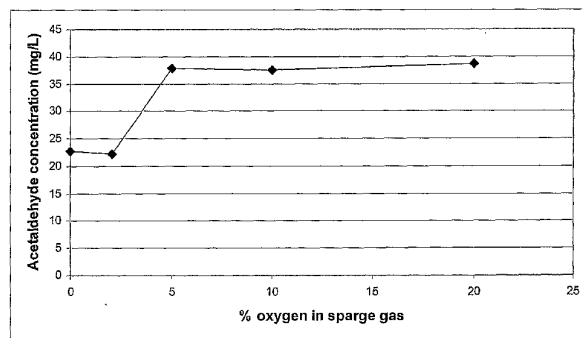


FIGURE 6.35. ACETALDEHYDE CONCENTRATION VERSUS PERCENT OXYGEN IN THE SPARGE GAS. THE FERMENTATIONS WERE CARRIED OUT IN THE 50-L GAS-LIFT SYSTEM LOADED WITH 40% (v/v) CARRAGEENAN GEL BEADS. THE TOTAL SPARGE RATE WAS KEPT CONSTANT AT 6.4 SCFH. THE RESIDENCE TIME WAS 24 HOURS.

WO 02/102961

71

PCT/CA02/00970

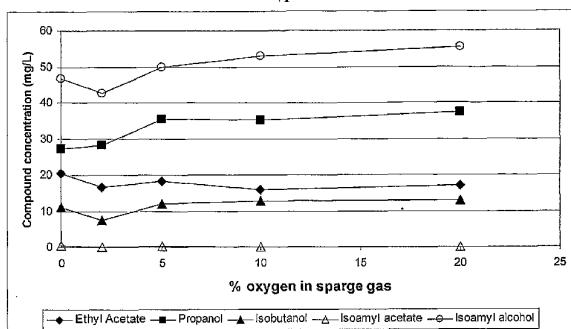


FIGURE 6.36 ESTERS AND FUSEL ALCOHOLS CONCENTRATION VERSUS PERCENT OXYGEN IN THE SPARGE GAS. THE FERMENTATIONS WERE CARRIED OUT IN THE 50-L GAS-LIFT SYSTEM LOADED WITH 40% (v/v) CARRAGEENAN GEL BEADS. THE TOTAL SPARGE RATE WAS KEPT CONSTANT AT 6.4 SCFH. THE RESIDENCE TIME WAS 24 HOURS.

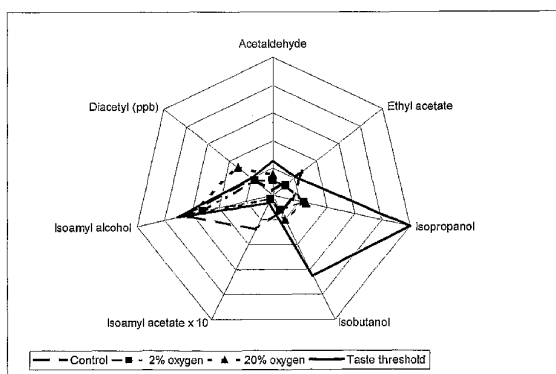


FIGURE 6.37. COMPARISON OF FINISHED PRODUCT PRODUCED WITH 2% OXYGEN AND 20 % OXYGEN IN THE SPARGE GAS VERSUS INDUSTRIALLY PRODUCED BEER AND TASTE THRESHOLDS. FOR THE CONTINUOUS FERMENTATION PRODUCTS, THE FERMENTATIONS WERE CARRIED OUT IN THE 50-L GAS-LIFT SYSTEM LOADED WITH 40% (v/v) CARRAGEENAN GEL BEADS. THE TOTAL SPARGE RATE WAS KEPT CONSTANT AT 6.4 SCFH. THE RESIDENCE TIME WAS 24 HOURS.

WO 02/102961

72

PCT/CA02/00970

6.4 MIXING AND CIRCULATION RATES OF FERMENTATIONS WITHIN A THREE-PHASE GAS-LIFT
DRAFT TUBE BIOREACTOR

Mixing experiments were conducted using the acid injection method outlined in section 4.8. The goals of this phase of experimentation were twofold. We wanted to first assess whether the gas-lift system was well mixed by calculating the liquid circulation rate and the resulting mixing time for a number of immobilization carriers at different superficial fluidizing gas velocities. The distinction of these trials from those reported in literature was that the entire experimentation was conducted on actual fermentation media with active yeast cells rather than on model solutions (water-solid-gas systems). These mixing experiments were also geared towards calculating superficial liquid velocities, which could be used for the future scale-up of the pilot system.

6.4.1 Probe Calibration

The pH probe utilized in the mixing studies was calibrated using the method described in section 4.8. The 4-20 mA signal emitted from the pH probe was passed across a 250 Ohm resistor and transformed into a 1 - 5 Volt signal, which could be recorded by the data acquisition card (DAC). The pH probe was immersed sequentially into a series of buffers as follows: pH of 4.6 buffer, pH of 4.0 buffer, pH 5.0 buffer, pH of 6.0 buffer and finally into pH of 7.0 buffer (Beckman certified standards, Cole Parmer). Figure 6.38 presents the data collected by the acquisition system for the Ingold pH probe's response to the 5 standard pH solutions. Figure 6.39 is the pH probe calibration curve plotting the actual pH value versus the measured signal voltage. The best-fit calibration curve for this system (coefficient of correlation of 0.9996) was defined by the following equation:

$$\text{pH} = 3.68 * \text{Voltage} - 3.53 \quad (6.1)$$

The collected mixing data was transformed using equation 6.1 to reflect actual pH values as measured inside the gas-lift bioreactor.

The response time of the pH probe to a change in pH was also measured. Figure 6.40 to Figure 6.43 depict the typical response of the pH probe to four different step changes in pH, namely 0.6, 1.2, 2.3 and 3.4 units. The original data was fitted to a pulse function using the built-in capabilities of TableCurve 2D (Jandel Scientific) data plotting and analysis software. The resulting curve fits had coefficients of correlation greater than 0.994. From these curves, the time for the probe to respond to 98 % of the step change (response time) was calculated and then plotted versus pH step change (Figure 6.44). Response time declined with pH step change in the ranges tested. For the smallest step change of 0.6, the pH probe response time was ~ 6.4 seconds. The response time decreased to about 4.2 seconds for a pH step change of 3.4.

This type of probe characterization is important, especially when the system is being used for the evaluation of mixing time and circulation rate. The probe should have a low response time for it to reflect changes in the medium it is measuring. In particular, the pH probe response time must be lower than the circulation rate within the reactor if it is to accurately be used in such measurement. A quasi-instantaneous response is however not necessary since a slight lag in response will simply be reflected in consecutive circulation rate measurements and therefore nullified.

WO 02/102961

73

PCT/CA02/00970

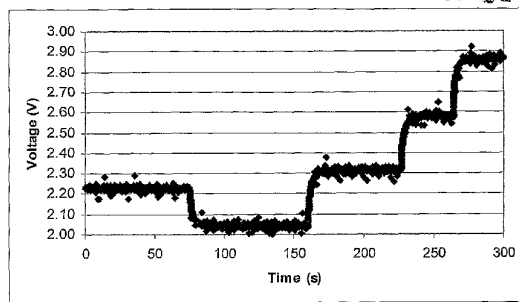


FIGURE 6.38 ORIGINAL DATA ACQUIRED BY THE DATA ACQUISITION SYSTEM TO THE INGOLD PH PROBE RESPONSE TO VARIOUS BUFFER SOLUTIONS VERSUS TIME. THE ACQUISITION FREQUENCY WAS 50 HZ FOR A TOTAL OF 15000 POINTS.

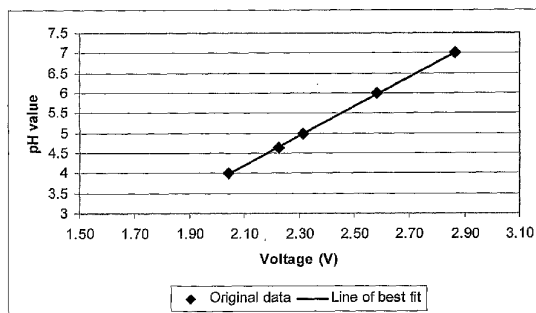


FIGURE 6.39 PH PROBE CALIBRATION CURVE PLOTTING PH VERSUS MEASURED VOLTAGE (V). THE LINE OF BEST FIT OR CALIBRATION LINE HAS THE FOLLOWING EQUATION: $\text{pH} = 3.68 \times \text{VOLTAGE} - 3.53$ WITH A COEFFICIENT OF CORRELATION OF 0.9996, (N=2500)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

74

PCT/CA02/00970

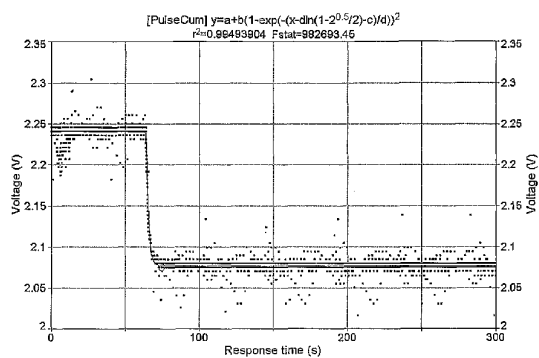


FIGURE 6.40 TYPICAL DATA OF pH PROBE RESPONSE TIME TO A pH STEP CHANGE OF -0.6 . THE RESPONSE WAS FITTED USING TABLECURVE SOFTWARE. THE BEST-FIT PULSE FUNCTION HAD A COEFFICIENT OF CORRELATION OF 0.995.

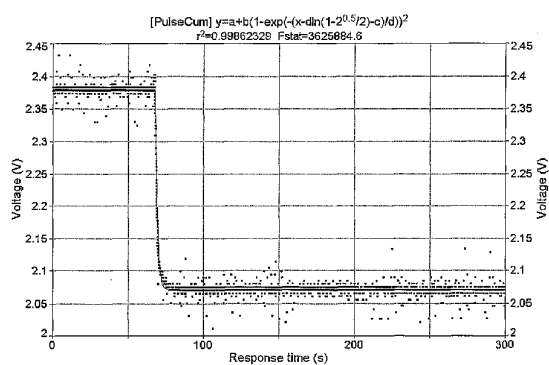


FIGURE 6.41 TYPICAL DATA OF pH PROBE RESPONSE TIME TO A pH STEP CHANGE OF -1.2 . THE RESPONSE WAS FITTED USING TABLECURVE SOFTWARE. THE BEST-FIT PULSE FUNCTION HAD A COEFFICIENT OF CORRELATION OF 0.999.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

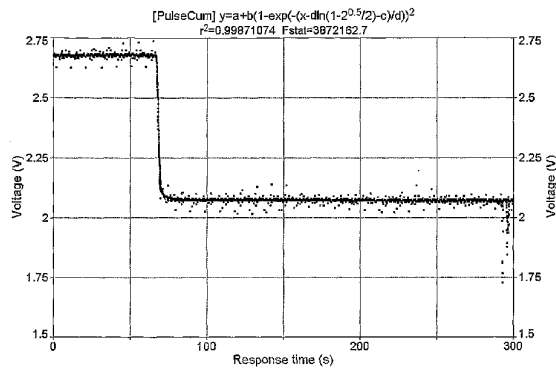


FIGURE 6.42 TYPICAL DATA OF PH PROBE RESPONSE TIME TO A PH STEP CHANGE OF ~2.3. THE RESPONSE WAS FITTED USING TABLECURVE SOFTWARE. THE BEST-FIT PULSE FUNCTION HAD A COEFFICIENT OF CORRELATION OF 0.999.

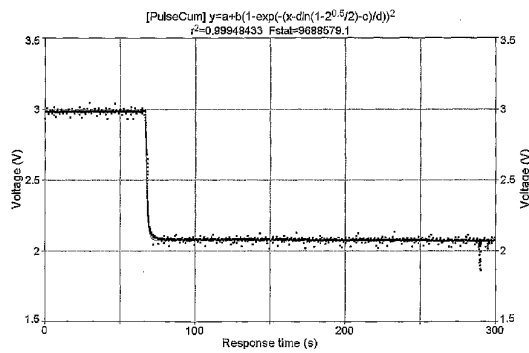


FIGURE 6.43 TYPICAL DATA OF PH PROBE RESPONSE TIME TO A PH STEP CHANGE OF ~3.4. THE RESPONSE WAS FITTED USING TABLECURVE SOFTWARE. THE BEST-FIT PULSE FUNCTION HAD A COEFFICIENT OF CORRELATION OF 0.999.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

76

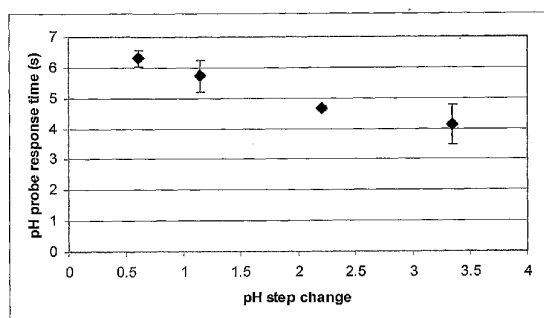


FIGURE 6.44 INGOLD pH PROBE RESPONSE TIME TO A STEP CHANGE. (N = 3) THE PROBES WAS IMMERSSED IN THE HIGHER pH BUFFER THEN IMMEDIATELY SUBJECTED TO THE LOWER pH BUFFER OF 4.0. THE LINE OF BEST FIT FOR EACH RESPONSE CURVE WAS UTILIZED TO CALCULATE THE TIME NECESSARY FOR THE PROBE TO REACH 98% OF THE STEP CHANGE.

6.4.2 Mixing Time and Circulation Rates

Mixing time and circulation rate experiments were performed on three types of immobilized cell fermentations. The experimentation was carried out inside the 50-L pilot scale draft tube bioreactor on a model water solution containing no solids and then on fermentation broth with a specific gravity of 2.7 °P containing either □-carrageenan gel beads, superflocculent LCC290 yeast or medium flocculent LCC3021 yeast. Figures 6.45 and 6.46 are sample depictions of the raw data collected using the pH probe system after the injection of an acid pulse (method described in section 4.8). Figure 6.45 illustrates the pH probe response to an acid injection into a water solution containing no solids, while figure 6.46 is the response to the acid injection into a fermentation broth containing the highly flocculent yeast, LCC290. The signals were fitted to a decaying sinusoidal curve and coefficients of correlation of 0.96 and 0.90, respectively, were calculated for the corresponding equations. The fitting parameters "b" and "c" on the charts correspond to the "a" and "□" values described in the decaying sinusoidal equation (3.1). These numerical values were used in equations 3.2 and 3.3 to calculate the circulation rate and the mixing time for the given system. Appendix B contains the remaining mixing data and curve fits to all the experimentation.

Figures 6.47 and 6.48 are mixing time and circulation rate graphs for an acid injection into a water solution containing no solids. Figures 6.49 and 6.50 are the corresponding graphs for the mixing experiments using the highly flocculent yeast LCC290 while the results from the □-carrageenan mixing tests are presented in Figures 6.51 and 6.52. Finally, the mixing time and circulation time of the medium flocculent yeast LCC3021

WO 02/102961

77

PCT/CA02/00970

are shown in Figures 6.53 and 6.54. Regardless of the type of solid tested, both mixing time and circulation rate decreased with corresponding increases in superficial gas velocity. The relationship between circulation rate and superficial liquid velocity followed equation 3.11 proposed by Kennard and Janekah (1991) for all four tested systems. The mixing time followed the relationship in equation 3.11 for the water/no solids system and the κ -carrageenan gel bead system. Both systems with flocculent yeast as the immobilization matrix did not show a strong correlation to the theoretical model of Kennard and Janekah. The LCC290 and the LCC3021 systems had initial mixing times (until the superficial gas velocity exceeded 4 mm/s) lower than predicted by the model. The rate of decrease in the mixing time, however, slowed down at superficial gas velocities greater than 4 mm/s while the model lower values. Table 6.1 provides the derived equations for circulation time and mixing time as they relate to superficial gas velocity.

Figure 6.55 illustrates the mixing time versus superficial gas velocity relationship for all four systems. The water/no solids scenario demonstrated the highest time for 98 % mixing of a pH pulse (~220 seconds at V_{sg} of 3 mm/s) and the LCC290 system showed the best capacity to minimize the effect of a pulse of acid in the system (~110 seconds at V_{sg} of 3 mm/s). The values for the LCC3021 and the κ -carrageenan system were between the water/no solids and the LCC290 systems. Solids within the gas-lift bioreactor help with the dispersion of liquid phase fluid elements by stimulating the formation of eddies and promoting co-axial mixing. The superflocculent yeast LCC290, although at the same solids loading (16 % w/v) as the medium flocculent yeast LCC3021, allowed for quicker mixing times at all tested superficial gas velocities.

Figure 6.56 depicts the circulation time versus superficial gas velocity for all four tested systems. At a superficial gas velocity of 2 mm/s, circulation time ranged between 28 seconds and 35 seconds with the water/no solids system having the quickest circulation rate and the LCC290 system displaying the slowest circulation rate. At the higher gas velocities, the difference between the 4 systems was reduced to approximately 3 seconds. At all tested velocities, however, the LCC290 system demonstrated slightly slower circulation rates while the water/no solids system had the fastest circulation rates.

Figure 6.57 illustrates the relationship between superficial gas velocity and superficial liquid velocity. Equation 3.7 proposed by Livingston and Zhang (1993) was utilized to calculate the superficial liquid velocity for a given circulation rate and solid type. Superficial liquid velocity increased with corresponding increases in superficial gas velocity. The LCC3021 and the water/no solids systems had similar trends, while the LCC290 and the κ -carrageenan systems showed some similarity. The model equation suggested by Kennard and Janekah was fit to the superficial liquid velocity versus superficial gas velocity curves in Figure 6.57. Figure 6.58 plots the experimentally calculated superficial liquid velocity versus the theoretically calculated superficial liquid velocity using equation 3.10. All four systems fit the proposed equation as indicated by the linear function with slope of 1 and origin at $y = 0$. Table 6.1 lists the correlations that were derived for the systems that were tested in this research work.

WO 02/102961

78

PCT/CA02/00970

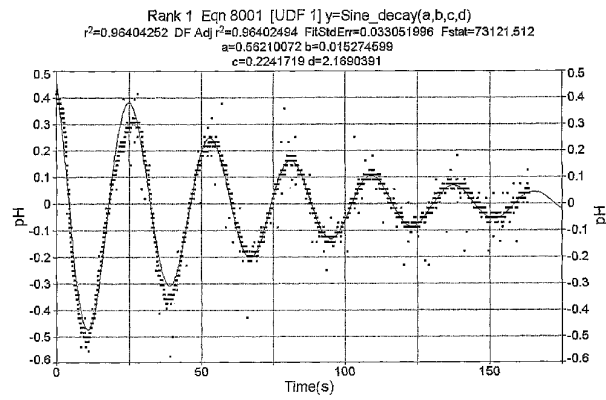


FIGURE 6.45 pH PROBE RESPONSE DATA WITHIN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A WATER SOLUTION CONTAINING NO SOLIDS. THE SUPERFICIAL GAS VELOCITY WAS SET AT 1.94 MM/S. THE ORIGINAL DATA WAS FITTED TO A DECAYING SINUSOIDAL CURVE. THE COEFFICIENT OF CORRELATION WAS 0.96.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

79

PCT/CA02/00970

19 AUG 2002 19:08:02

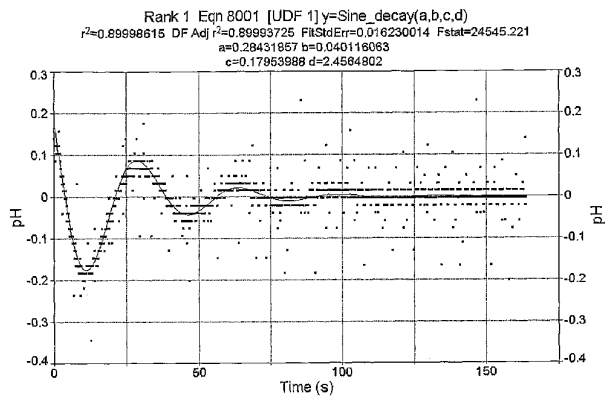


FIGURE 6.46 pH PROBE RESPONSE DATA WITHIN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING THE HIGHLY FLOCCULENT YEAST, LCC290. THE SUPERFICIAL GAS VELOCITY WAS SET AT 1.94 MM/S. THE ORIGINAL DATA WAS FITTED TO A DECAYING SINUSOIDAL CURVE. THE COEFFICIENT OF CORRELATION WAS 0.90.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

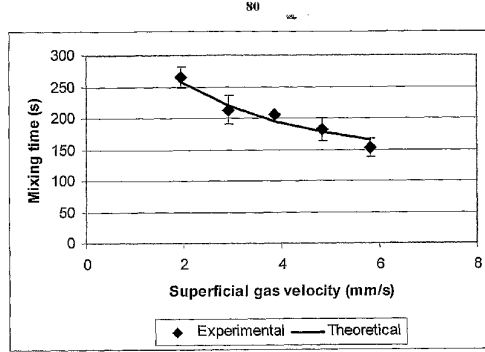


FIGURE 6.47 MIXING TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A WATER SOLUTION CONTAINING NO SOLIDS. MIXING TIME CORRESPONDS TO THE TIME NECESSARY FOR 98% OF THE STEP CHANGE TO BE NULLIFIED. (N = 3)

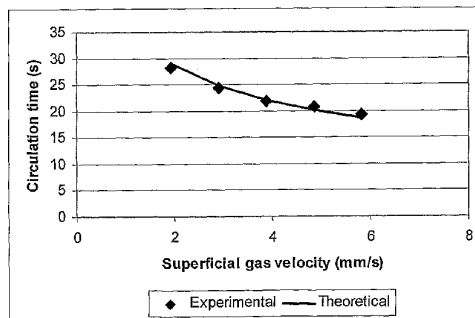


FIGURE 6.48 CIRCULATION TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A WATER SOLUTION CONTAINING NO SOLIDS. (N = 3)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

81

PCT/CA02/00970

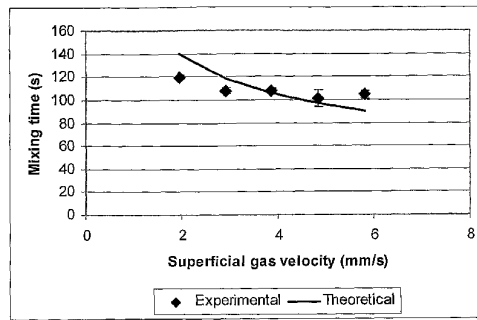


FIGURE 6.49 MIXING TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING THE HIGHLY FLOCCULENT YEAST, LCC290 (FLOC SIZE > 1.0 MM). MIXING TIME CORRESPONDS TO THE TIME NECESSARY FOR 98% OF THE STEP CHANGE TO BE NULLIFIED. (N = 3)

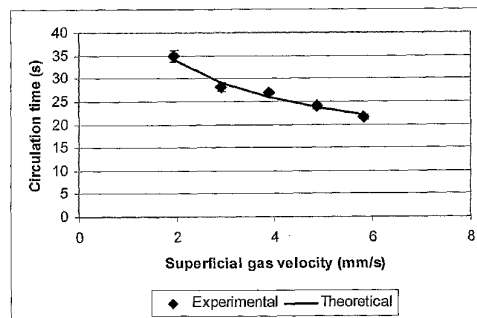


FIGURE 6.50 CIRCULATION TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING THE HIGHLY FLOCCULENT YEAST, LCC290 (FLOC SIZE > 1.0 MM). (N = 3)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

82

PCT/CA02/00970

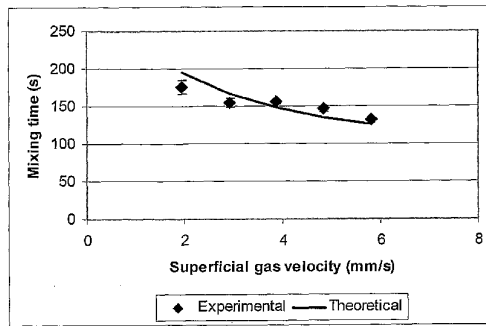


FIGURE 6.51 MIXING TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING YEAST, LCC3021, IMMOBILIZED WITHIN $\square$ -CARRAGEENAN GEL BEADS (BEAD SIZE 1-2 MM). MIXING TIME CORRESPONDS TO THE TIME NECESSARY FOR 98% OF THE STEP CHANGE TO BE NULLIFIED. (N=3)

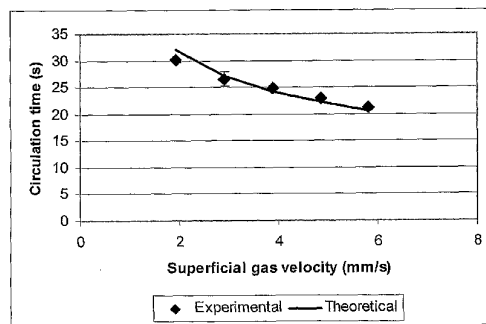


FIGURE 6.52 CIRCULATION TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING YEAST, LCC3021, IMMOBILIZED WITHIN $\square$ -CARRAGEENAN GEL BEADS (BEAD SIZE 1-2 MM). (N=3)

WO 02/102961

83

PCT/CA02/00970

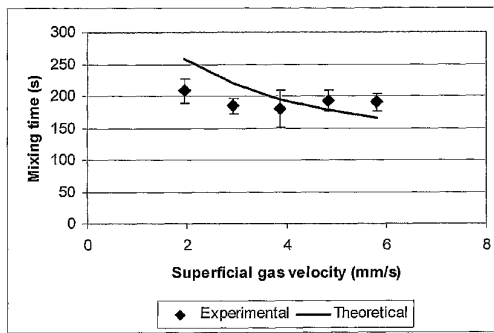


FIGURE 6.53 MIXING TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING THE MEDIUM FLOCCULENT YEAST, LCC3021 (FLOC SIZE < 0.5 MM). MIXING TIME CORRESPONDS TO THE TIME NECESSARY FOR 98% OF THE STEP CHANGE TO BE NULLIFIED. (N = 3)

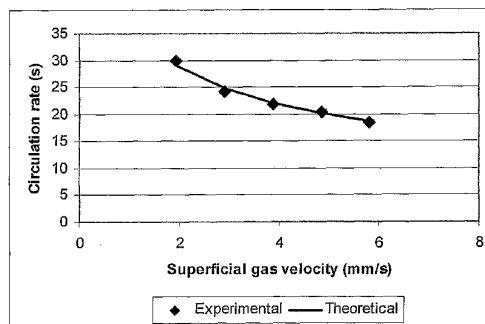


FIGURE 6.54 CIRCULATION TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING THE MEDIUM FLOCCULENT YEAST, LCC3021 (FLOC SIZE < 0.5 MM). (N = 3)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

84

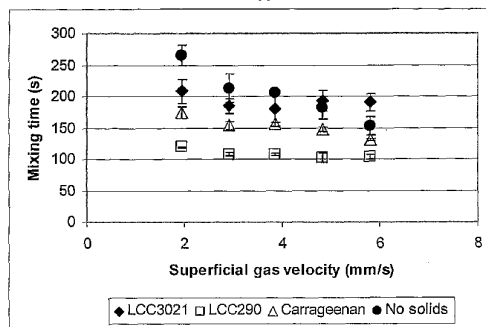


FIGURE 6.55 MIXING TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING DIFFERENT SOLIDS. MIXING TIME CORRESPONDS TO THE TIME NECESSARY FOR 98% OF THE STEP CHANGE TO BE NULLIFIED. (N = 3)

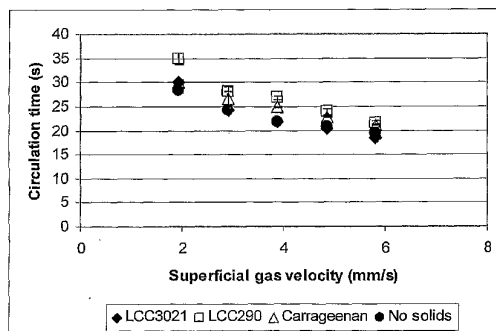


FIGURE 6.56 CIRCULATION TIME VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY IN A 50 L GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR. AN ACID PULSE WAS INJECTED INTO A FERMENTATION MEDIUM CONTAINING DIFFERENT SOLIDS. (N = 3)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

85

PCT/CA02/00970

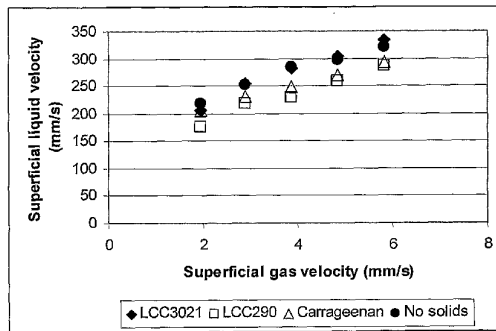


FIGURE 6.57 SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (MM/S) VERSUS SUPERFICIAL GAS VELOCITY (MM/S) FOR THE FOUR TESTED SYSTEMS—LCC3021 YEAST, LCC 290 YEAST, CARRAGEENAN GEL BEADS AND WATER/NO SOLIDS SYSTEM. THE TESTING WAS CONDUCTED INSIDE THE 50-L PILOT SCALE GAS-LIFT DRAFT TUBE BIOREACTOR.

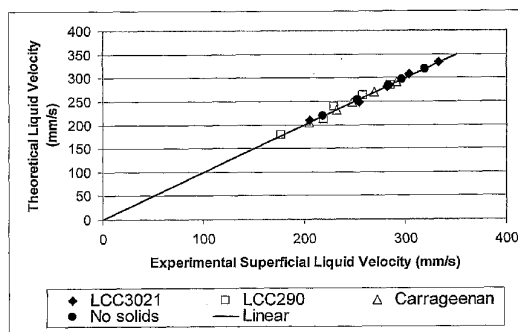


FIGURE 6.58 THEORETICAL SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (MM/S) VERSUS EXPERIMENTAL SUPERFICIAL LIQUID VELOCITY (MM/S) FOR THE FOUR TESTED SYSTEMS. THE THEORETICAL VALUE WAS CALCULATED USING THE FOLLOWING RELATIONSHIP AS PROPOSED BY KENNARD AND JANEKAH (1991): $V_{sl} \propto V_{sg}^N$. THE LINEAR LINE HAS A SLOPE OF 1 AND A Y-INTERCEPT OF 0.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

86

PCT/CA02/00970

Table 6.1 Summary of Calculated Correlations for Mixing Time, Circulation Rate and Superficial Liquid Velocity for the Four Tested Systems

	Mixing Time	Circulation Rate	Superficial Liquid Velocity
Water/no solids	$t_m = 336.04 V_{SG}^{-0.3}$	$t_c = 37.94 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 189.06 V_{SG}^{0.283}$
LCC290 yeast	$t_m = 181.55 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 44.67 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 134.75 V_{SG}^{0.419}$
□-Carrageenan gel	$t_m = 254.68 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 41.73 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 171.92 V_{SG}^{0.283}$
LCC3021 yeast	$t_m = 322.07 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 37.90 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 158.12 V_{SG}^{0.427}$

For the superficial liquid correlation, Kennard and Janekah (1991) proposed an exponent of 0.41 in distilled water and 0.64 when the solution contained carboxymethyl cellulose and ethanol. The LCC290 and the LCC3021 systems had exponents of 0.419 and 0.427 respectively, while the □-carrageenan system and the water/no solids systems had an exponent of 0.283.

A basic assumption of gas-lift draft tube technology is that the system can deliver adequate mixing so that the fluid element exiting the reactor is completely mixed. In the operation of the 50-L pilot scale systems as continuous fermenters, fresh nutrient medium was injected at the bottom of the reactor at a flowrate of 36 mL per minute into a total reactor volume of 50 L. This represents approximately a 1000-fold dilution in feed components. With the mixing characteristics calculated for the LCC290 yeast system, a fluid element is mixed in about 3 reactor circulation loops, while 10 reactor circulation loops are necessary for the water/no solids scenario. In addition, the residence time (24 hours) is approximately 1000 greater than the mixing time (180 seconds). The rapid mixing coupled with the dilution of nutrients within the system and the large difference in mixing time versus residence time strongly suggest an adequately mixed system. The original premise for using a gas-lift bioreactor was that it provided an ideally mixed environment for beer fermentation. The results of the mixing studies performed on all three fermentation carriers support this premise.

6.5 EVALUATION OF SEVERAL IMMOBILIZATION METHODS FOR CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITHIN A GAS-LIFT SYSTEM

Continuous fermentations were performed in the 50-L pilot scale gas-lift draft tube bioreactor utilizing three types of immobilization carrier – □-carrageenan gel beads, superflocculent LCC290 yeast and medium flocculent LCC3021 yeast. All fermentations were initially pitched with the same level of yeast inoculum (4 g/L) and industrial lager wort was used as the nutrient medium. The fermentations were started up in batch to allow for the rapid reduction of wort sugars, as well as to promote yeast growth within the fermenter. In the case of the flocculent yeast, this batch phase allowed for the formation of yeast flocs, which could then be retained within the bioreactor once a continuous feed was started. Once the diacetyl level in the fermentation liquid had

dropped to below 30 □g/L, continuous wort feed was started. The following sections describe in more detail the fermentation analyses resulting from these three types of immobilization matrices.

6.5.1 Use of □-carrageenan Gel Beads: Entrapment

The use of □-carrageenan gel beads as an immobilization matrix aided in the feasibility assessment of gas-lift technology for continuous primary fermentation of beer (section 6.3). It was still necessary to assess whether such a system could be operated for extended periods of time (up to 2 months) without experiencing major operational difficulties, including fermentation instability and contamination. The operational parameters for this fermentation trial are depicted in Figure 6.59. The carbon dioxide superficial gas velocity was set at 5.5 mm/s while 0.9 mm/s of air were introduced to the reactor in this sparge gas. The oxygenation rate was therefore set at 3 % of the total sparge gas to coincide with the results in section 6.3, which indicated the production of the preferred beer when 2-5 % oxygen was introduced to the system. The fermentation temperature was controlled at 15 °C. Some fluctuations can be seen in the data and they relate to the nature of the control loop that was utilized.

Figure 6.60 represents the evolution of the free yeast cell population over time, as well as the yeast's viability. Viability remained relatively high throughout the 2-month fermentation with a temporary decrease measured around 200 hours. This corresponds to the point just prior to the start of the continuous wort feed. In batch fermentation, it is common for viability to decrease at the end of fermentation since the cells are deprived of nutrients. Once the continuous wort feed was started, viability climbed back above 90 %. The free yeast cell population was low during the first 400 hours of fermentation and then, over the next 300 hours, it increased about tenfold from ~ 100 million cells per mL to ~ 1.5 billion cells per mL. Once at this maximum concentration, the free cell yeast population maintained this pseudo-steady state value for the remainder of the fermentation period.

The sudden increase in free yeast concentration is probably linked to the immobilized yeast cell population. At the start of the fermentation, the yeast entrapped in the gel will grow inside the gel until all available space has been taken up. Once the gel beads are filled with yeast, the expanding population will overflow into the liquid medium. Our results seem to indicate that during the first 400 hours, the immobilized yeast grew within the gel and, at ~700 hours, the yeast had no more room to grow within the bead therefore started releasing larger quantities of cells into the fermentation broth.

This instability in the yeast population is reflected in the ethanol and specific gravity profiles (Figure 6.61). During the initial 200 hours of fermentation, it was expected that the ethanol would increase over time and that the specific gravity would decrease following traditional batch kinetics. Between 200 and 600 hours, ethanol reached a plateau of 45 g/L and the specific gravity remained at ~ 6 °P. This result was not expected as an end-fermented liquid would have a specific gravity of ~ 2.5 to 2.7 °P. At about 600 hours, when the free yeast population had just about reached its maximum, the ethanol level increased to about 70 g/L and the wort's specific gravity fell to about 2.2 °P. A closer look at the specific carbohydrate profiles over time (Figure 6.62) indicates that the maltose concentration did not level off until approximately 600 hours into the process. The other sugars were reduced as expected.

WO 02/102961

88

PCT/CA02/00970

Two other key analytes – diacetyl and 2,3-pentanedione – were monitored throughout the 2-month continuous run (Figure 6.63). The low points at approximately 180 hours correspond to the end of the batch start-up phase. Once the continuous feed was started, both diacetyl and 2,3-pentanedione increased rapidly to about 500 $\square$ g/L and 400 $\square$ g/L respectively. This initial increase was expected since the fresh nutrient supply would stimulate yeast growth and therefore increase the levels of overflow metabolites, yielding diacetyl and 2,3-pentanedione. Throughout the fermentation run, 2,3-pentanedione levels remained above 400 $\square$ g/L while diacetyl concentrations dropped from 500 $\square$ g/L to 275 $\square$ g/L midway through the continuous fermentation run. This point also coincided with the diacetyl level dropping below the 2,3-pentanedione level as was observed in the feasibility assessment reported in section 6.3.

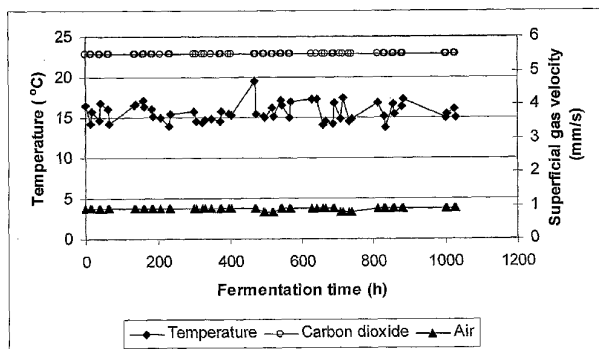


FIGURE 6.59 OPERATING PARAMETER FOR THE CARRAGEENAN IMMOBILIZED FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

WO 02/102961

89

PCT/CA02/00970

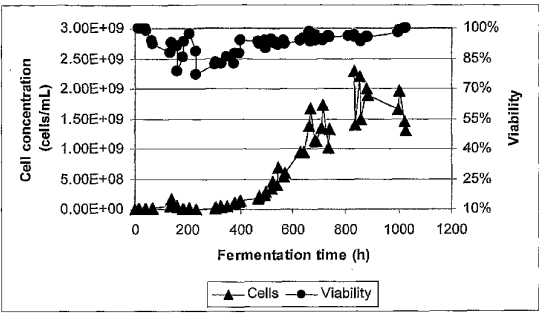


FIGURE 6.60 TOTAL YEAST CELL CONCENTRATION AND VIABILITY OF THE κ -CARRAGEENAN IMMOBILIZED YEAST VERSUS FERMENTATION TIME.

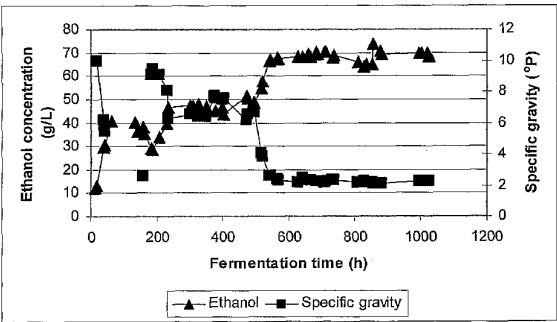


FIGURE 6.61 ETHANOL CONCENTRATION AND SPECIFIC GRAVITY OF CARRAGEENAN IMMOBILIZED YEAST CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

WO 02/102961

90

PCT/CA02/00970

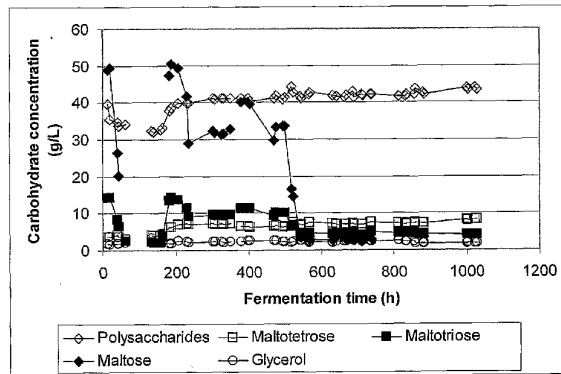


FIGURE 6.62 CARBOHYDRATES PROFILE OF CARRAGEENAN IMMOBILIZED YEAST CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

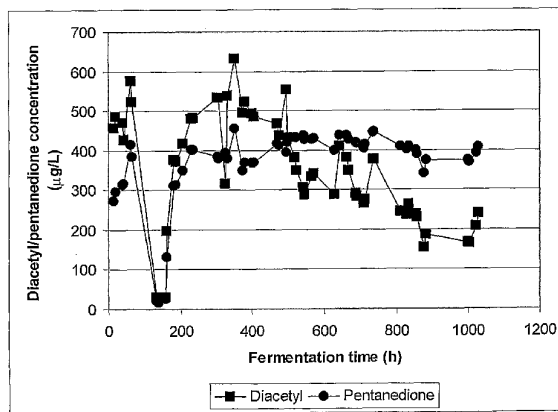


FIGURE 6.63 VICINAL DIKETONES CONCENTRATION OF CARRAGEENAN IMMOBILIZED CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

6.5.2 Use of a Superfloculent Yeast Strain: Self-Flocculation

Continuous fermentations using the 50-L pilot scale gas-lift bioreactor loaded with LCC290 superfloculent yeast were performed over a 3-month period. The CO₂ sparging gas was set at ~2.5 mm/s while air was introduced at ~0.4 mm/s in order to promote some yeast growth (this corresponds to a total of 1.51 L of gas per minute being introduced with 3 % being oxygen). The fermentation temperature in the reactor was maintained at ~15 °C throughout the entire run. An interruption in the power supply forced us to reduce the temperature of the fermenter to 4 °C for a period of three days (about 1700 hours into the fermentation) (Figure 6.64). This cool down of the reactor was performed in order to slow down yeast metabolism, and maintain yeast viability during the power interruption. This unexpected event provided an opportunity to assess the resilience of the system to events that could be common in industrial situations. Once the electricity was restored, the reactor temperature was readjusted to 15 °C and the fermentation proceeded for another 30 days.

Once the batch start-up phase was completed (~180 hours), wort was continuously supplied to the system at a flowrate of 2.16 L per hour, thus providing a 24-hour residence time based on a reactor working volume of 50 L. After the initial batch period, the cell concentration increased, reaching 3 billion cells/mL at about 750 hours into the fermentation (Figure 6.65). This yeast mass then decreased to approximately 1 billion cells per mL at around 1000 hours and remained at this level until the end of the fermentation. Yeast viability was at above 90 % throughout the fermentation run (Figure 6.65).

The ethanol concentration and the fermentation broth specific gravity reached pseudo-steady state shortly after the continuous feed was started (Figure 6.66). Ethanol concentration rose to approximately 70 g/L and the liquid specific gravity was ~2.3 °P for the remainder of the fermentation. The carbohydrate profiles in Figure 6.67 confirm this pseudo-steady state at approximately 270 hours into the continuous fermentation run. The polysaccharide concentration dropped from ~42 g/L to ~33 g/L at about 1400 hours into the fermentation. This result was due to a variation in wort batches. Since lager yeast cannot consume these polysaccharides, this anomaly in wort nutrient had no marked effect on the performance of the primary fermentation vessel. This difference in the unfermentable sugar portion would be detected by trained taste panelists who would notice that the product had a "thin" body.

The diacetyl and 2,3-pentanedione concentrations over time are presented in Figure 6.68. As with the □-carrageenan continuous fermentations, the diacetyl and 2,3-pentanedione levels rose as soon as the continuous wort feed was started. Diacetyl reached approximately 375 □g/L while the 2,3-pentanedione concentration was approximately 600 □g/L. These concentration levels were maintained throughout the fermentation run until the interruption in power at ~1700 hours. Since the liquid sat in batch for 3 days without further yeast metabolism (due to lack of nutrient supply), the levels of vicinal diketones were reduced. Once the wort feed was restarted, both diacetyl and 2,3-pentanedione returned to their pseudo-steady state values.

WO 02/102961

92

PCT/CA02/00970

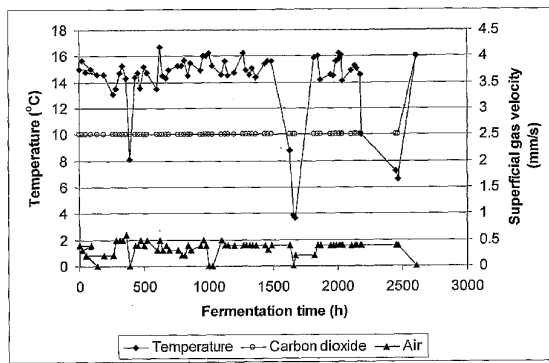


FIGURE 6.64 OPERATING PARAMETER FOR THE LCC290 FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

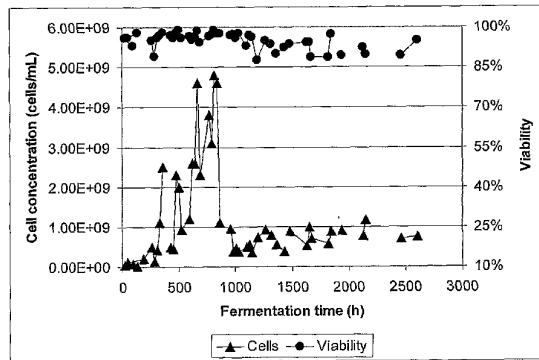


FIGURE 6.65 TOTAL YEAST CELL CONCENTRATION AND VIABILITY OF LCC290 YEAST VERSUS FERMENTATION TIME.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

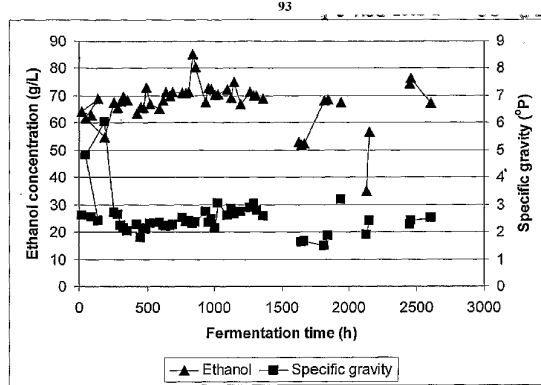


FIGURE 6.66 ETHANOL CONCENTRATION AND SPECIFIC GRAVITY OF LCC290 YEAST CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

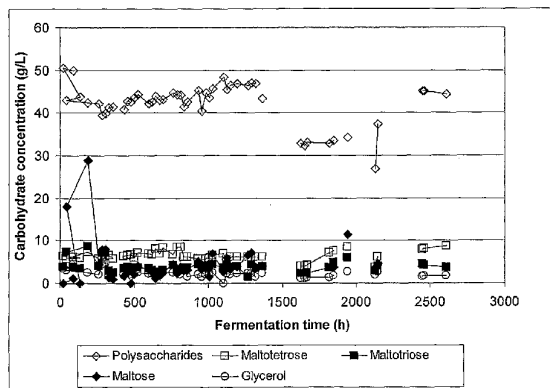


FIGURE 6.67 CARBOHYDRATES PROFILE OF LCC290 YEAST CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

WO 02/102961

94

PCT/CA02/00970

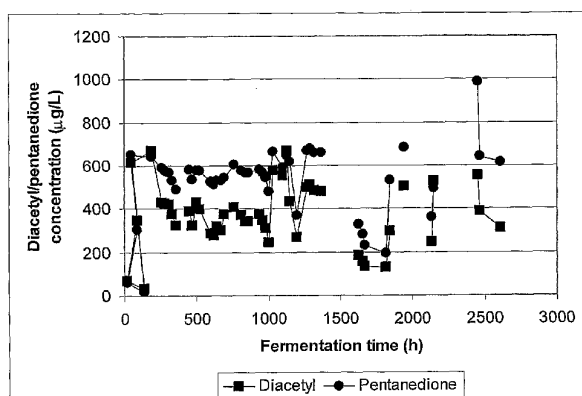


FIGURE 6.68 VICINAL DIKETONES CONCENTRATION OF LCC290 CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

6.5.3 Use of a Medium Flocculent Yeast: Self-Flocculation

Several fermentation runs were performed using the medium flocculent yeast strain LLC3021, as the immobilization matrix within the 50-L pilot scale gas-lift bioreactor. As with the two previous modes of immobilization, the initial yeast concentration was set at 4 g/L. This yeast was pitched into industrial lager wort (described in section 4.2) and allowed to ferment in batch until all the fermentable sugars were consumed and the diacetyl level had dropped to below 30 μg/L. The fermentation temperature was controlled at 15 °C and the sparge gas rate was the controlled at the same level as the LCC290 fermentation (superficial carbon dioxide gas velocity of ~2.5 mm/s and ~0.4 mm/s air resulting in approximately 3 % oxygen in the total sparge gas) (Figure 6.69).

This initial batch stage allowed the yeast cells to flocculate and therefore be more easily retained within the gas-lift system. At the end of the batch startup, the wort feed rate was set at 2.16 L per hour, which corresponded to a residence time of ~24 hours based on a reactor working volume of 50 liters. The yeast population (Figure 6.70) increased to about 1 billion cells per milliliter and remained at this level for just over 1000 hours (between 500 and 1500 hours into the continuous fermentation run). The yeast population doubled suddenly at ~1500 hours into the fermentation and then leveled off at 2 billion cells/mL. This change in yeast

WO 02/102961

95

PCT/CA02/00970

population was unexpected. The yeast viability throughout the fermentation run was maintained at above 90 % (Figure 6.70).

Figure 6.71 presents the data for ethanol concentration and fermentation broth specific gravity over the 3-month continuous run. Shortly after the batch startup (180 hours), the ethanol concentration leveled off at 70 g/L and the specific gravity reached a minimum of ~ 2.2 °P. The sudden increase in yeast population discussed above was not reflected in a decrease in ethanol concentration. The most logical explanation for this yeast population increase is that a larger portion of the overall yeast population entered into growth phase, producing this doubling in yeast concentration. A decrease in ethanol concentration would have been expected to coincide with the increase in yeast concentration but this was clearly not the case since ethanol remained at its pseudo-steady state value of 70 g/L throughout the continuous run. The carbohydrate concentration profiles versus fermentation time (Figure 6.72) revealed the same conclusion as the ethanol and specific gravity curves. This run had reached its pseudo-steady state at approximately 250 hours into the continuous fermentation.

Figure 6.73 provides the diacetyl and 2,3-pentanedione concentration curves versus continuous fermentation time. Like the κ -carrageenan gel and LCC290 vicinal diketone results, the diacetyl and 2,3-pentanedione concentration increased following the batch startup phase to reach pseudo-steady state values of ~ 225 □g/L and 400 □g/L respectively.

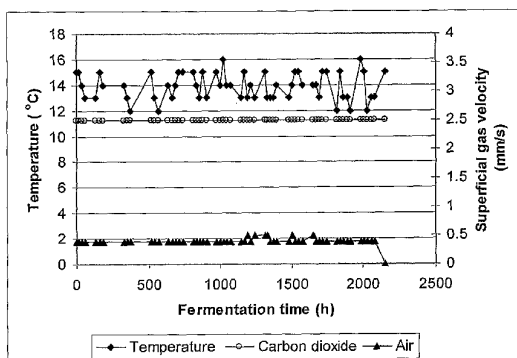


FIGURE 6.69 OPERATING PARAMETER FOR THE LCC3021 FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

WO 02/102961

96

PCT/CA02/00970

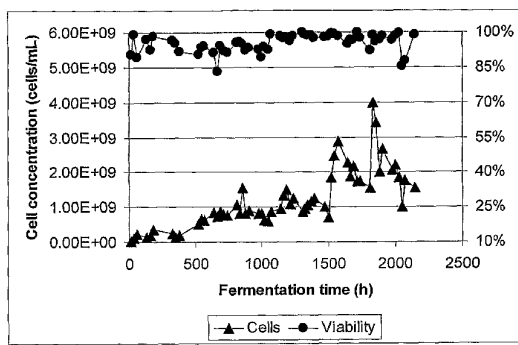


FIGURE 6.70 TOTAL YEAST CELL CONCENTRATION AND VIABILITY OF LCC3021 YEAST VERSUS FERMENTATION TIME.

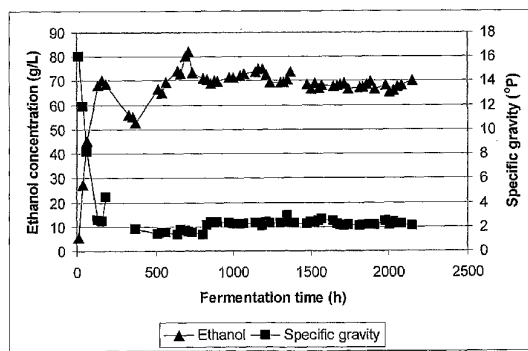


FIGURE 6.71 ETHANOL CONCENTRATION AND SPECIFIC GRAVITY OF LCC3021 YEAST CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

97

PCT/CA02/00970

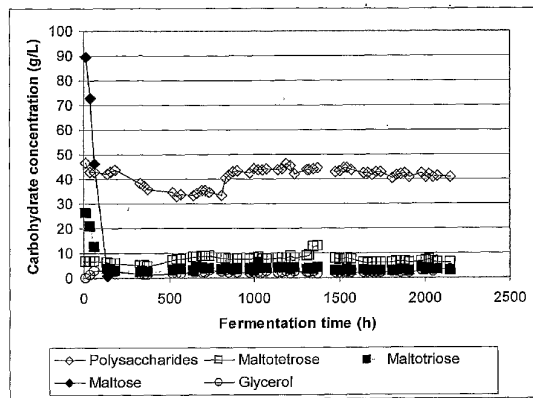


FIGURE 6.72 CARBOHYDRATES PROFILE OF LCC3021 YEAST CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

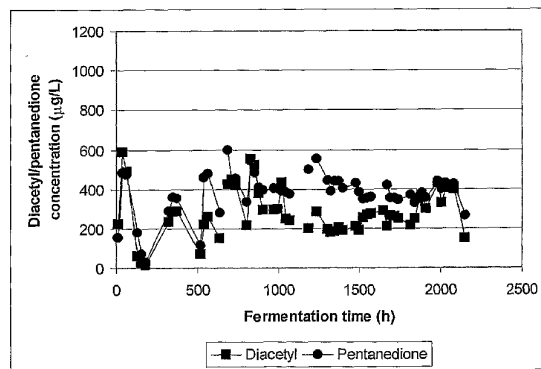


FIGURE 6.73 VICINAL DIKETONES CONCENTRATION OF LCC3021 CONTINUOUS FERMENTATION VERSUS FERMENTATION TIME.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

6.5.4 Comparison of the various carriers

In sections 6.5.1 to 6.5.3, the fermentation performances of $\square$ -carrageenan gel beads, LCC290 superflocculent yeast and LCC3021 medium flocculent yeast as immobilization matrices were presented. All three carriers were deemed suitable for continuous primary fermentation within the 50-L pilot scale gas-lift draft tube bioreactor. Liquid residence times of 24 hours were achieved in all three cases. The fermentation runs using LCC290 superflocculent yeast reached a pseudo-steady state much quicker than the LCC3021 medium flocculent yeast and $\square$ -carrageenan immobilized cell systems. The LCC290 fermentation reached its maximum ethanol concentration of 70 g/L at about 250 hours into the run. The LCC3021 run hit its steady state ethanol concentration of 70 g/L at ~600 hours. During the $\square$ -carrageenan continuous fermentation, ethanol leveled off at two separate points over the course of the run. First, ethanol hit 45 g/L between 200 and 500 hours and then rose to 70 g/L at about 575 hours and remained at that concentration until the end of the trial.

The three fermentation systems seemed to reach a maximum free yeast cell concentration of ~1 billion cells per milliliter. The inconsistency in yeast concentration impacted negatively on the $\square$ -carrageenan system's ethanol productivity (lower initial pseudo-steady state ethanol concentration as compared to LCC290 yeast system). The yeast concentration peaked at different time intervals in each system. For the LCC290 run, ethanol reached its maximum between 500 and 1000 hours into the continuous fermentation, while the LCC3021 fermentation had a maximum cell count between 1500 and 2000 hours into its continuous run. The $\square$ -carrageenan immobilized system reached a maximum cell concentration between 700 and 1000 hour of continuous operation.

The pseudo-steady state concentrations of diacetyl and 2,3-pentanedione in the three types of immobilized cell fermentation – LCC290 superflocculent yeast, LCC3021 medium flocculent yeast and $\square$ -carrageenan immobilized yeast – were dissimilar. For the LCC290 fermentation, diacetyl settled at 375 $\square$ /g/L while the level in the LCC3021 fermentation was leveled off at about 225 $\square$ /g/L. In the case of the $\square$ -carrageenan fermentation, the diacetyl concentration hit 500 $\square$ /g/L, and midway into the continuous run, the level decreased gradually to about 200 $\square$ /g/L in a 500 hour time frame. The 2,3-pentanedione concentration mirrored the diacetyl concentration in all three runs with concentrations of 2,3-pentanedione higher than diacetyl throughout the LCC290 and LCC3021 fermentations. The $\square$ -carrageenan run exhibited a different pattern, with diacetyl levels higher than 2,3-pentanedione during its first pseudo-steady state, after which time the diacetyl concentration dropped below the 2,3-pentanedione concentration. The yeast concentration data and the ethanol production data also suggest that two separate and unique pseudo-steady states were achieved during the $\square$ -carrageenan fermentations.

The task of comparing different fermentation systems and assessing which one has performed better can become complex when the merits of the system are based on more than one criterion. For example, if overall ethanol productivity alone was used as the measure of success, all three tested systems would rate equally well since the production of 70 g/L ethanol per 50 L of reactor volume over a 24-hour residence time was achieved in all cases.

The production of a saleable beer requires more than simple ethanol production. The proposed fermentation system should be evaluated on its ability to produce an acceptable beer (ethanol productivity and diacetyl levels among other things), on the potential incremental costs of the carrier, on the availability of the carrier, on the ease of operation of the system, on environmental issues such as disposal of the carrier, on the stability of the

WO 02/102961

99

PCT/CA02/00970

carrier, as well as the flexibility provided by the carrier system. In order to evaluate such a multifaceted scenario, the business world utilizes a dimensionless analysis process called the "Balanced Scorecard" (Kaplan and Norton, 1996). The first step involves the identification of criteria for which the system must be evaluated on. Each criterion is then given a rating on a scale of 1 to 5, with 1 being least favored and 5 being the most favored. At the end of the analysis, the score for each option is totaled and the alternative with the highest score is the best choice given the circumstances.

Table 6.2 presents the results of the Balanced Scorecard analysis performed on the immobilization carriers that were viewed as potential alternatives for use in the 50-L pilot scale gas-lift draft tube bioreactor for fermentation. A total of 6 carriers — Chitopearl® chitosan beads, Celite® diatomaceous earth beads, Siran® glass beads, □-carrageenan gel beads, medium flocculent LCC3021 yeast and superflocculent LCC290 yeast — were evaluated with the primary objective of producing a saleable beer. Each carrier system was rated using the aforementioned scale. Overall, the LCC290 superflocculent yeast performed best followed closely by the medium flocculent yeast, LCC3021. The four other carriers received scores between 16 and 20. Third preference was given to the □-carrageenan system because a saleable liquid was produced in the pilot unit. This carrier assessment strongly suggests that future focus on the development of continuous fermentation systems should be geared towards self-aggregation as the mode of immobilization. The availability (readily available), cost (low cost since no additional equipment is needed to operate), ease of operation (fits within existing plant operations) provided by such an alternative outweigh the potential instability of the yeast flocs in an agitated system. It may be possible to use the shear sensitivity of self-aggregate to control the floc size during the fermentation process, and possible achieve increase mass transfer and therefore achieve further increases in bioreactor volumetric productivity.

Table 6.2 Comparison of several immobilization carrier for primary fermentation of beer within a gas-lift bioreactor system

	Chitopearl®	Celite®	Siran®	Carrageenan	LCC3021	LCC290
Good beer	3	1	1	4	5	4
Cost	2	3	1	3	5	5
Availability	1	5	5	2	5	5
Ease of operation	3	1	1	3	4	5
Disposal/ environmental	4	3	4	2	3	3
Stability	4	1	1	3	2	3
Flexibility	3	3	3	1	2	5
TOTAL	20	17	16	18	26	30

6.6 Production of a North American type lager beer using Gas-lift Draft tube technology

The production of a clean tasting North American (NA) type lager beer poses many challenges to the brewer. NA type lager beers are characterized by a light color and a taste profile with low bitterness, low residual sugar (thin), no dominant flavor and therefore relatively no aftertaste. Because of these inherent properties, the brewer can mask very few flavor defects. High levels of diacetyl (buttery), acetaldehyde (green apple) as well as sulfury off-notes (burnt rubber, skunky, rotten eggs, cooked vegetables) are the most common flavor problems plaguing modern day brewers. Although bacterial contamination of the fermentation medium can also be a cause of these off-flavors in beer, improper control of the fermentation process more often yields higher than expected off-flavor levels.

Throughout the continuous fermentation trials conducted as part of this thesis, contamination levels in both the wort and the fermentation vessels were controlled through diligent practice of aseptic techniques. The fermentation trials with all three carrier types, which lasted for several months, showed no detectable levels of contaminants (monitored by methods reported in Chapter 4). Higher than desired levels of diacetyl (target less than 30 $\mu\text{g/L}$) and acetaldehyde (target less than 10 mg/L) plagued the products from the continuous primary fermentations but these levels were not due to bacterial infection. These findings do not differ from those reported in literature (Pajunen et al., 2000; Kronlof et al., 2000). A Belgian brewer turned their high levels of acetaldehyde in the beer from a continuous fermentation process into a selling feature and marketed the product as an apple-flavored ale (Andries et al., 1996b).

High levels of diacetyl following primary fermentation are also normal in the brewing industry. Some brewers have adopted a practice called "temperature free rise" following the completion of their primary fermentation in order to aid in the reduction of diacetyl. Others have opted to simply hold their products for longer periods of time during the aging process to achieve the reduction of the vicinal diketones (diacetyl and 2,3-pentanedione) to the desired levels. In another approach, several research groups developed the rapid aging technology discussed in Chapter 2 to deal with high diacetyl levels. Although this approach is very effective, it adds another level of complexity to the overall brewing process that some may find difficult to accept.

The economics of the rapid aging process are quite clear, however, in these early days of continuous processing in the brewing industry, it may be advisable to minimize technological complexity in order to facilitate the transition from traditional batch fermentation to continuous production. For this reason, it was decided to investigate the use of a batch hold following continuous primary fermentation within the 50-L pilot scale gas-lift systems to control the high levels of diacetyl in the finished beer. This additional processing step was not foreseen at the beginning of this Ph.D. program, however, it was necessary to implement such a measure in order to compare the beers produced continuously to batch control beers.

6.6.1 Use of Batch Hold Following Continuous Primary Fermentation

A critical parameter in determining the completion of primary fermentation is the diacetyl level in the end fermented liquid. The conversion of the diacetyl precursor, α -aceto lactate, into diacetyl is the rate-limiting step in the diacetyl pathway (Figure 3.5). This first reaction is chemical in nature and is highly dependent on temperature. If the "green" beer enters the cold aging process before the chemical conversion of α -aceto lactate to diacetyl has occurred, the resulting beer may have levels of diacetyl above the taste threshold of 20 $\mu\text{g/L}$, unless extended cold aging periods are used to allow the slow conversion of the precursor to occur. In all three continuous fermentations described in section 6.5, the diacetyl level exiting the reactor was above the desired target value of 30 $\mu\text{g/L}$ in the undiluted beer. If the liquid was filtered at this stage to remove the yeast, the diacetyl would remain high hence a warm batch period was employed to reduce the diacetyl value to below the acceptable limit.

The continuously fermented beer was collected and held in 40-L stainless steel beer vessels at 21 °C. Small samples (100 mL) were withdrawn regularly from the liquid and analyzed for diacetyl, ethanol, specific gravity, esters and fusel alcohols. Figure 6.74 shows the reduction of diacetyl versus warm hold time for one batch of beer fermented continuously with LCC290 yeast as the immobilization matrix. The warm hold period was effective at reducing the level of diacetyl from ~600 $\mu\text{g/L}$ to below 30 $\mu\text{g/L}$, what is considered in the brewing industry as the "pre-drop" limit.

In another test, the effect of agitation on the reduction of diacetyl during the hold period was investigated. A carbon dioxide sparge gas (0.14 m^3/h) was introduced through a 1.27 cm stainless steel tubing into the bottom of the beer collection vessel to keep the liquid agitated during the hold period. Figure 6.75 presents the results of this experiment. It appeared that the agitation provided by the CO_2 sparging had very little impact on the rate of reduction of diacetyl in this secondary holding tank. This result may be indicative of inadequate mixing provided by the CO_2 mixing gas therefore not increasing the reaction rate of the 1st chemical reaction (α -aceto lactate conversion into diacetyl) or not increasing the mass transfer rate for the 2nd reaction to occur more quickly (conversion of diacetyl to acetoin by yeast). It may also be possible that the non-agitated vessel had enough cells in suspension to further reduce diacetyl into the flavor inactive acetoin once the rate-limiting chemical conversion (1st step) had occurred.

The effects of this warm batch hold following continuous primary fermentation on the concentrations of esters and fusel alcohols and on the ethanol concentration and the specific gravity of the liquid are presented in Figures 6.76 and 6.77 respectively. From these results, it appeared that the warm hold period had little effect on the concentrations of acetaldehyde, ethyl acetate, propanol, isobutanol, isoamyl alcohol and isoamyl acetate (Figure 6.76). The specific gravity of the liquid in the holding vessel decreased from 2.7 °P to 2.0 °P in the first 12 hours of the hold period and then leveled off at this lower value. Ethanol concentration was steady at 70 mg/L throughout the 65-hour test period. These results indicated that the hold period would primarily affect the concentration of diacetyl and 2,3-pentanedione while the impact on esters, fusel alcohols and ethanol would be minimal.

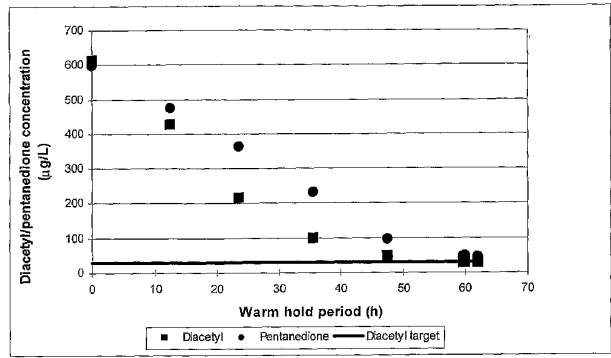


FIGURE 6.74 VICINAL DIKETONES CONCENTRATION VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST IN THE GAS-LIFT SYSTEM.

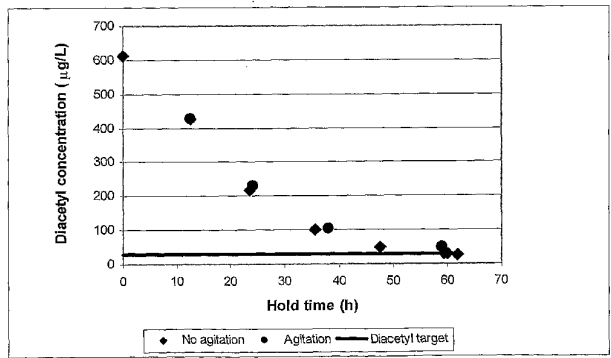


FIGURE 6.75 DIACETYL CONCENTRATION VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST IN THE GAS-LIFT SYSTEM. ONE SAMPLE WAS AGITATED BY SPARGING CARBON DIOXIDE GAS THROUGH IT WHILE THE OTHER SAMPLE WAS LEFT STATIC.

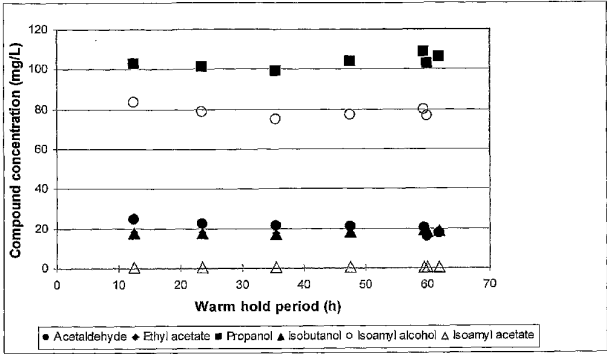


FIGURE 6.76 ESTER AND FUSEL ALCOHOL CONCENTRATIONS VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST IN THE GAS- LIFT SYSTEM.

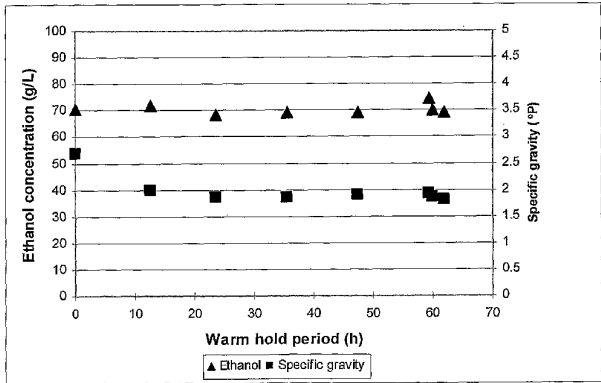


FIGURE 6.77 ETHANOL CONCENTRATION AND SPECIFIC GRAVITY VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST IN THE GAS- LIFT SYSTEM.

WO 02/102961

104

PCT/CA02/00970

The batch holding protocol was performed on liquid produced from the continuous fermentations in the 50-L gas-lift bioreactor using LCC290 superflocculent yeast, LCC3021 medium flocculent yeast or κ -carrageenan immobilized yeast. The diacetyl reduction profiles of these three test runs are presented in Figure 6.78. Diacetyl was successfully reduced to its target value of 30 $\square$ g/L in all three cases. The time that was necessary to achieve this reduction, however, varied in all three cases. In the LCC290 situation, the reduction from 600 $\square$ g/L to 30 $\square$ g/L was accomplished in approximately 48 hours whereas the LCC3021 fermentation and the κ -carrageenan fermentation only required ~24 hours and ~40 hours to reach this target value. It was postulated that this discrepancy was related to the initial starting value of diacetyl and not on the type of immobilization matrix utilized.

Figure 6.79 illustrates the same diacetyl results from Figure 6.78 with a time adjustment performed on the results from LCC3021 and κ -carrageenan fermentations. The original diacetyl reduction curves from the latter two fermentations were shifted so that their initial values fell on the diacetyl reduction curve generated by the LCC290 superflocculent yeast. With this transformation, the diacetyl reduction profile for all three systems seemed to fall on the same line. Using the TableCurve2D software, these results were curve fitted to a first order kinetic equation (Levenspiel, 1972) (Figure 6.80). It was calculated that the adjusted experimental data from Figure 6.79 fit the following equation:

$$[\text{Diacetyl}] = 648.54 e^{-0.0426 t} \quad (6.1)$$

with a correlation of coefficient of 0.96. This result strongly supports the theory that all three immobilization systems exhibited the same diacetyl reduction potential. The results should not be surprising since diacetyl reduction is often linked to yeast strain (Nakatani et al., 1984). The κ -carrageenan system immobilized the LCC3021 yeast within its gel structure and the LCC290 yeast was a selected variant of the LCC3021 strain.

Once the diacetyl level was below the target level of 30 $\square$ g/L, the resulting beers were aged in cold storage (2 °C) for 7 days before undergoing final product preparation (filtration, dilution, carbonation and packaging). Table 6.3 summarizes the analysis of the beers produced in the 50-L pilot scale systems with either LCC290 yeast, LCC3021 yeast or κ -carrageenan immobilized yeast as the immobilization matrices. Figure 6.81 is a radar graph of the esters and fusel alcohols of three beers produced continuously and of one control beer produced industrially in batch. As compared to the industrially produced batch liquid (control), the continuous liquids had lower esters (ethyl acetate, isoamyl acetate) and higher propanol and lower isobutanol, primary amyl alcohol, and isoamyl alcohol. The acetaldehyde levels in the continuous fermentation products were higher than the control liquid. The foaming level, initial chill haze, warm haze, dimethyl sulfide, sulfur dioxide, carbon dioxide and air levels were within specifications.

WO 02/102961

105

PCT/CA02/00970

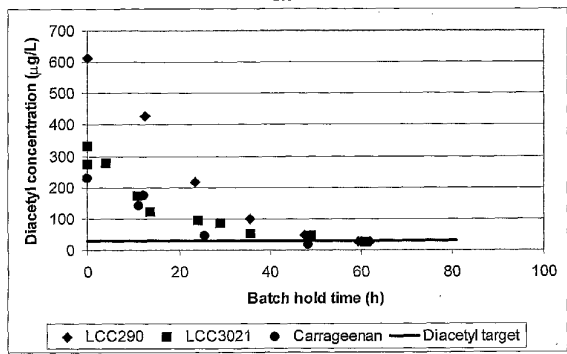


FIGURE 6.78 DIACETYL CONCENTRATION VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST, LCC3021 YEAST AND CARRAGEENAN GEL IMMOBILIZED YEAST IN THE GAS-LIFT SYSTEM.

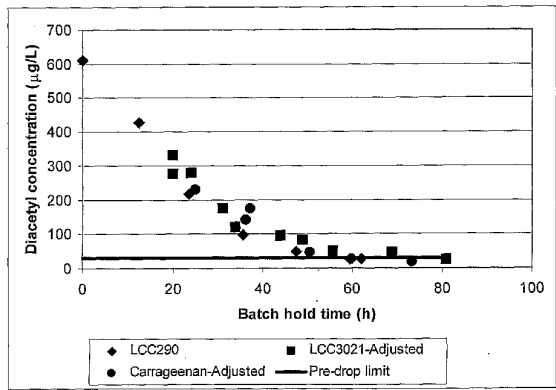


FIGURE 6.79 DIACETYL CONCENTRATION VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST, LCC3021 YEAST AND CARRAGEENAN GEL IMMOBILIZED YEAST IN THE GAS-LIFT SYSTEM. THE VALUES FOR LCC3021 FERMENTATION AND THE CARRAGEENAN FERMENTATION WERE ADJUSTED IN TIME TO HAVE THE SAME STARTING POINT AS THE LCC290 FERMENTATION.

WO 02/102961

106

PCT/CA02/00970

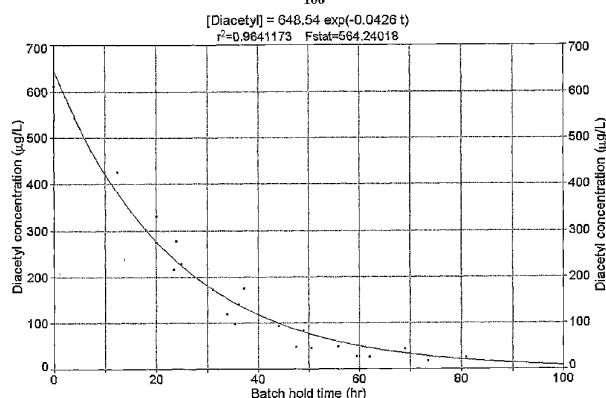


FIGURE 6.80 DIACETYL CONCENTRATION VERSUS WARM BATCH HOLD FOLLOWING CONTINUOUS PRIMARY FERMENTATION WITH LCC290 YEAST, LCC3021 YEAST AND CARRAGEENAN GEL IMMOBILIZED YEAST IN THE GAS-LIFT SYSTEM. THE VALUES FOR LCC3021 FERMENTATION AND THE CARRAGEENAN FERMENTATION WERE ADJUSTED IN TIME TO HAVE THE SAME STARTING POINT AS THE LCC290 FERMENTATION.

Several other parameters (apparent extract, real extract, calculated original extract, color, bitterness) that are intimately affected by the dilution of the product from its original ethanol concentration to the final value of 5.0 % v/v were different from the control because the continuous products required higher dilution with water to reach the desired ethanol value due to higher original ethanol concentrations (70 g/L versus 60 g/L in batch). Figure 6.82 is a radar graph of alcohol, diacetyl, pH, color and bitterness of the same liquids described above. The alcohol level, diacetyl and pH are well within target whereas the color and bitterness are out of specification. The lower color is related to the higher dilution that the continuous liquids underwent and this can be adjusted by increasing the color in the wort nutrient feed. The bitterness values are also subject to this same dilution error and would as well be adjusted in the wort feed.

WO 02/102961

107

PCT/CA02/00970

Table 6.3 Summary of analysis on beers produced using the gas-lift system.

Specification	Industrially batch fermented liquid	LCC290 continuously fermented liquid	LCC3021 continuously fermented liquid	Carrageenan continuously fermented liquid
Air (mL)	<1	0.40	0.35	0.35
Carbon dioxide (%)	2.75	2.90	2.81	2.73
Sulfur dioxide (mg/L)	<10	0	0	0
Dimethyl sulfide ($\square$ g/L)	<70	59	30	30
Bitterness (BU)	12.00	11.30	13.74	13.18
Colour (SRM)	3.20	2.20	2.10	2.30
pH	4.10	4.15	4.10	4.09
Diacetyl ($\square$ g/L)	<20	12	12	9
Alcohol (%v/v)	5.00	4.99	5.03	5.04
Alcohol (%w/w)	3.93	3.93	3.96	3.96
Apparent Extract ($^{\circ}$ P)	1.55	1.02	1.40	1.44
Real Extract ($^{\circ}$ P)	3.36	2.84	3.24	3.27
Calc. Original Extract ($^{\circ}$ P)	11.0	10.5	11.0	11.0
Warm Haze (FTU)	<200	45	50	47
Initial Chill Haze (FTU)	<100	43	51	54
Foam (s)	>170	167	187	175
Acetaldehyde (mg/L)	4.4 $\pm$ 1.3	10.0	21.9	11.6
Propanol (mg/L)	12.8 $\pm$ 6.8	57.6	51.7	84.3
Ethyl acetate (mg/L)	32.4 $\pm$ 4.3	11.0	10.6	8.7
Isobutanol (mg/L)	21.6 $\pm$ 3.4	10.6	8.3	8.9
Primary Amyl Alc (mg/L)	20.0 $\pm$ 2.3	15.2	9.4	6.4
Isoamyl alcohol (mg/L)	60.9 $\pm$ 8.6	48.0	40.9	46.5
Isoamyl acetate (mg/L)	2.5 $\pm$ 0.7	0.32	0.25	0.18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

108

PCT/CA02/00970

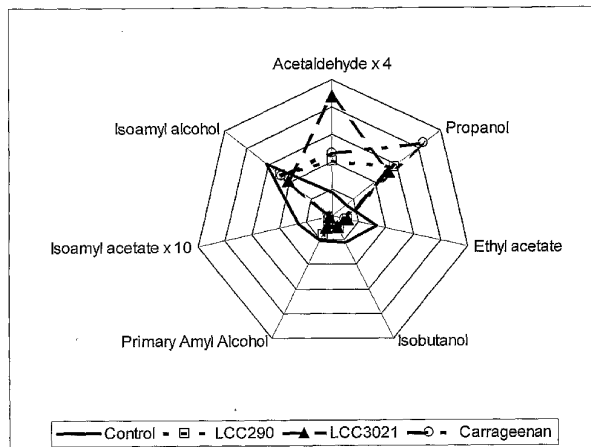


FIGURE 6.81 RADAR GRAPH OF BEERS FERMENTED CONTINUOUSLY IN THE GAS-LIFT SYSTEM USING EITHER LCC290 YEAST, LCC3021 YEAST OR LCC3021 YEAST IMMOBILIZED IN CARRAGEENAN GEL BEADS. THE ESTERS AND FUSEL ALCOHOLS OF THE FINISHED BEERS ARE REPRESENTED IN THIS GRAPH. ALL PRODUCTS WERE SUBJECTED TO A WARM BATCH HOLD FOLLOWING THE PRIMARY FERMENTATION STAGE.

WO 02/102961

109

PCT/CA02/00970

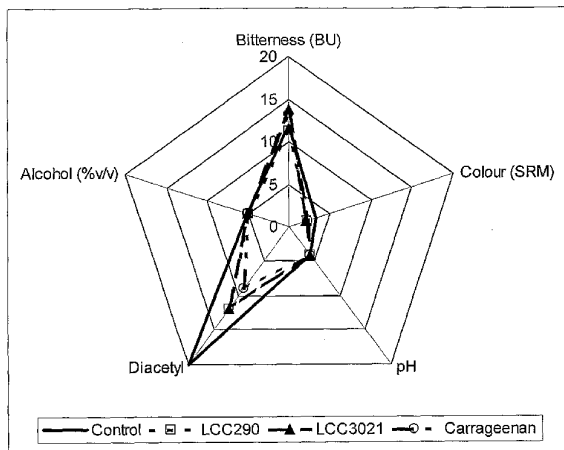


FIGURE 6.82 RADAR GRAPH OF BEERS FERMENTED CONTINUOUSLY IN THE GAS-LIFT SYSTEM USING EITHER LCC290 YEAST, LCC3021 YEAST OR LCC3021 YEAST IMMOBILIZED IN CARRAGEENAN GEL BEADS. THE ESTERS AND FUSEL ALCOHOLS OF THE FINISHED BEERS ARE REPRESENTED IN THIS GRAPH. ALL PRODUCTS WERE SUBJECTED TO A WARM BATCH HOLD FOLLOWING THE PRIMARY FERMENTATION STAGE.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

110

6.6.2 Selection of best sparge gas

Carbon dioxide is readily available in most breweries since it is a natural by-product of yeast fermentation. Breweries collect the evolved CO₂ and then scrub the gas stream to remove slight impurities that may have been carried over into the collection stream (typically sulfurous compounds). This purified stream is then compressed and stored as a liquid for future use in the brewery (99.95 % pure). The use of carbon dioxide as a sparge gas in continuous fermentation seemed like a logical choice from an operations point of view. The plant would be able to utilize their collection system and recover the CO₂ exiting the continuous fermenter. The use of other gases would only add another level of complexity to the existing plant operations.

However, for continuous fermentation to become a viable alternative to existing batch operations, it is necessary to produce a product that is a close match to existing brands. It is believed that by minimizing the biological/biochemical impacts that the yeast is exposed to during continuous fermentation, it may be possible to achieve such a product match. Carbon dioxide is known to adversely affect yeast metabolism during primary fermentation. This effect is magnified in tall cylindroconical vessels where the head pressure inherent to the system suppresses the free release of CO₂ from the liquid medium. These conditions tend to produce beers with lower esters and higher fusel alcohols. Successful attempts have been made to remove some of this CO₂ from the fermentation by periodically injecting an auxiliary gas stream into the bottom of the cylindroconical vessel. The effects of CO₂ inhibition appeared to have been reduced with the resulting products containing less fusel alcohols and higher ester levels.

Building on this knowledge, the use of nitrogen gas instead of carbon dioxide, as the sparge gas within the gas-lift system, was investigated. Several liquids fermented in the 50-L uplift reactors were collected and processed in the Labatt Experimental Brewery utilizing the following steps. After 14 hours of liquid collection from the reactor (24 hr residence time), the "green beer" was decanted from the yeast. This liquid was then subjected to a 48-hour room-temperature (21 °C) hold period, which allowed both diacetyl and acetaldehyde to reach Labatt specifications (diacetyl <30 □g/L and acetaldehyde <10 mg/L). This liquid was then cold aged for 7 days and then processed using standard industrial practices.

Table 6.4 compares the results of finished beers obtained from continuous fermentation with LCC290 yeast under CO₂ sparged and N₂ sparged systems to a standard industrially produced liquid (control). The nitrogen-sparged liquid compares favorably to the industrially produced liquid. Analyses indicated that there was twice as much 1-propanol in the liquid while the dimethyl sulfide concentration was approximately three times lower. Both color and bitterness values appeared to be higher than the industrial liquid as did the foaming potential as measured by the NIBEM test. The CO₂-sparged beer had lower esters (ethyl acetate, isoamyl acetate) and higher 1-propanol than did the nitrogen-sparged liquid. The ratios of esters (ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate) to fusel alcohol (1-propanol, isobutanol, isoamyl alcohol) were calculated for the control liquid, the nitrogen-sparged liquid and the CO₂-sparged liquid and were found to be 0.30, 0.27, 0.15 respectively.

Table 6.4 Summary of chemical analyses for several products fermented continuously using the gas-lift system loaded with LCC290 superflocculent yeast.

Analysis	Industrially batch fermented liquid	Nitrogen- sparged continuously fermented liquid	CO ₂ -sparged continuously fermented liquid
Acetaldehyde (mg/L)	2.53	3.68	4.80
Ethyl acetate (mg/L)	28.08	30.90	14.14
1-propanol (mg/L)	13.03	28.45	40.03
Isobutanol (mg/L)	17.15	17.89	7.01
Isoamyl acetate (mg/L)	2.57	2.06	0.69
Isoamyl alcohol (mg/L)	74.54	78.45	51.35
Ethyl hexanoate (mg/L)	0.140	0.180	0.074
Ethyl octanoate (mg/L)	0.110	0.280	0.059
Ethyl decanoate (mg/L)	0.0079	0.0630	0.0081
Diacetyl (□g/L)	6	9	10
2,3-pentanedione (□g/L)	4	5	14
Sulfur dioxide (mg/L)	1.3	1	0
Dimethyl sulfide (mg/L)	79	24	64
Bitterness (BU)	11.5	20.6	15.5
Color (SRM)	3.1	4.1	3.7
Foam (s)	176	210	195
FAN (mg/L)		92	84
pH	4.13	4.10	4.19
RE (°P)	3.38	4.08	3.601
COE (°P)	10.97	12.77	11.50
Alcohol (%v/v)	4.93	5.74	5.17

WO 02/102961

112

PCT/CA02/00970

Figure 6.83 is the radar graph representing the esters, fusel alcohols and acetaldehyde concentrations for the three liquids. The profile of the nitrogen-sparged liquid closely follows that of the control beer except for a higher propanol level. The CO₂-sparged fermentation exhibited much lower esters and fusel alcohol that did not match the control. In both continuous fermentation liquids, the diacetyl and acetaldehyde levels were below the Labatt specifications.

The findings suggested that nitrogen sparging increased the production of esters to similar levels as those of commercial beers, whereas carbon dioxide sparging produced liquids with relatively lower ester concentrations. These results suggest an altered yeast metabolism under the CO₂-sparged environment. The propanol levels, regardless of the sparging gas, were much higher in the continuously fermented beers than those measured in industrially fermented control beers. Although the propanol concentrations are well below the taste threshold of 100 mg/L, the noted differences may be an indicator of slightly altered metabolism occurring in continuous fermentation as compared to batch fermentation. It is also possible that the higher propanol level is due to the continuous supply of the amino acid threonine, which through the oxo-acid degradation pathway will yield propanol.

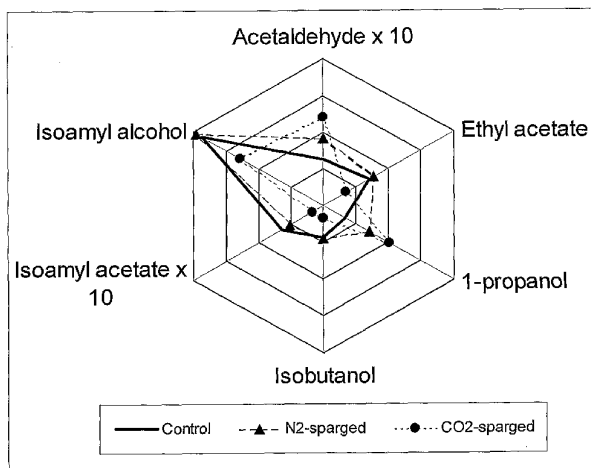


FIGURE 6.83 RADAR GRAPH COMPARING THE ESTERS AND FUSEL ALCOHOLS OF NITROGEN-SPARGED AND CO₂-SPARGED CONTINUOUS GAS-LIFT FERMENTATION LIQUIDS TO INDUSTRIALLY PRODUCED LIQUID.

CHAPTER 7.0 CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the research performed throughout this thesis. An acceptable beer with no major flavor defects can be produced using a 50-L pilot scale gas-lift draft tube bioreactor as the continuous primary fermentor when followed by a 2-day batch hold for the control of diacetyl. A minimum residence time of 24 hours or 1 reactor volume turnover per day is achievable for the fermentation of high gravity wort (17.5 °P) into an end-fermented broth (2.5 °P). The use of superflocculent yeast LCC290, medium flocculent yeast LCC3021 and κ -carrageenan immobilized yeast are all feasible carriers within the gas-lift system. The use of heavier pre-formed carriers such as Siran[®] glass beads and Celite[®] diatomaceous earth beads are not practical alternatives within a gas-lift draft tube system. A minimum of 2 months continuous operation in the case of κ -carrageenan gel beads and a minimum of 3 months continuous operation in the case of LCC290 and LCC3021 fermentations are achievable without experiencing any microbial contaminations or reactor performance instabilities. In addition, the continuous system was capable of handling potential and assumed variations in the industrial wort supply during the extended run periods.

Continuous fermentation using the superflocculent yeast LCC290 with nitrogen as the sparging gas, followed by a 2-day batch hold, produced the closest flavor match to an industrial control beer. The 2-day batch hold devised to deal with the high concentrations of diacetyl in the outlet liquid of the continuous primary fermentor was an effective, although not optimal, control mechanism. The diacetyl reduction capacity of the three tested continuous fermentation systems was very similar and, as previously suspected, this trait can be attributed to strain type. The batch hold period did not affect the concentrations of esters and fusel alcohols in the beer during the holding stage.

Utilizing 3% oxygen in the sparge gas provided adequate oxygen nutrient levels in the wort, resulting in the maintenance of a viable yeast population (above 90 %) throughout the fermentation runs while producing beers with an acceptable flavor profile. The continuous fermentations using LCC290 yeast and LCC3021 yeast as the immobilization matrices reached a pseudo-steady state more rapidly than the κ -carrageenan gel bead system. The instability of κ -carrageenan immobilized fermentations, possibly resulting from an increase in the immobilized yeast population, caused the fermentation of product below target levels. For ideal continuous production, this phenomenon is highly undesirable as the prolonged startup increases the time necessary to react and recommence following a catastrophic failure. A longer startup phase will also require a longer continuous run phase in order to become attractive.

The continuous gel bead production process produced the required quantities of beads for testing inside the pilot scale units. It is, however, necessary to further optimize the bead production process so as to produce beads with a tighter size distribution. The process also requires further investigation to determine its suitability at an industrial scale. Rather than the Kenics type investigated in this research, a new type of static mixer for which scale-up can be achieved by increasing diameter rather than solely on number of static mixers, must be found and tested for this option to become viable.

The acid pulse tracer technique utilized in this thesis allowed us to assess the mixing time and circulation rate within the 50-L pilot scale bioreactor during actual fermentations involving LCC290 superflocculent yeast, LCC3021 medium flocculent yeast and κ -carrageenan immobilized yeast. The mixing data was fit to a decaying sinusoidal function from which the mixing time and circulation rate were calculated.

WO 02/102961

114

PCT/CA02/00970

Rapid mixing is provided within the gas-lift draft tube system with mixing times calculated at less than 200 seconds for all three types of immobilization carriers. Mixing time decreased slightly with increases in superficial gas velocity in all three tested scenarios. At the all tested superficial gas velocities (2 mm/s to 6 mm/s), the LCC290 system showed the quickest mixing times (between 100 s and 120 s). The liquid circulation times were very similar for all three carrier types regardless of superficial gas velocity. They also decreased linearly with corresponding increases in gas velocity. Complete liquid mixing (98% response to a pulse) occurred within three to six reactor circulation cycles for all the tested immobilization carriers. These results confirmed that the tested 50-L pilot scale system provided adequate mixing for continuous fermentation. Poor mixing times would have been indicative of possible dead zones that would have been undesirable for beer fermentation.

This Ph.D. research work has clearly demonstrated the feasibility of pursuing a further scale-up of the production system designed, built and operated in the Labatt Experimental Brewery. The use of a gas-lift draft tube bioreactor with LCC290 superflocculent yeast and nitrogen as the sparging gas, followed by a 2-day batch hold at 21 °C, is recommended as the system of choice.

Detailed Description - Part 2:

CHAPTER 4. MATERIALS AND METHODS

4.1 Yeast Strain and Characteristics

A lager brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Labatt Culture Collection (LCC) 3021, was used throughout this work. *Saccharomyces cerevisiae* is synonymous with *Saccharomyces uvarum* Beijerinck var. *carlsbergensis* Kudryavtsev, 1960 (Kurtzman, 1998). At 37°C LCC 3021 will not grow. This helps to distinguish LCC 3021 lager yeast from most ale yeast, which will grow at 37°C and higher temperatures. LCC 3021 is a bottom fermenting strain, as are most lager yeast, but there are exceptions. As well, this strain will ferment glucose, galactose, sucrose, maltose, raffinose, and melibiose, but not starches. The ability to ferment melibiose is one tool used by taxonomists to distinguish it from ale yeast.

As with most brewing strains, LCC 3021 is polyploid and reproduces by mitotic division. Under normal brewing conditions lager yeast does not reproduce by meiosis. This has the advantage of making the brewing strain genetically stable because crossover of genetic material is less likely (Kreger-van Rij, 1984).

4.2 Preparation of Yeast Inoculum

Yeast was taken from a vial cryogenically preserved in a -80°C freezer and streaked on Peptone Yeast-Extract Nutrient (PYN) agar (peptone, 3.5 g/L; yeast extract, 3.0 g/L; KH_2PO_4 , 2.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/L; glucose, 20.0 g/L; agar, 20.0 g/L in dH_2O) growth medium to obtain well-separated colonies. A sterile loop consisting of several colonies was taken from the 3-4 day old plate of growing yeast, and these colonies were inoculated into a 10 mL volume of wort in a test tube. This was allowed to grow at 21°C overnight, thus the term "overnight culture", and then was added to a larger volume of wort, usually 200 mL, to increase yeast biomass. In consecutive days, this mixture was added to another larger volume of wort, and so on,

WO 02/102961

115

PCT/CA02/00970

until the desired amount of yeast biomass was propagated. Generally one expects to produce approximately 20 g of lager yeast per litre of wort. To prepare for yeast inoculation, the culture was centrifuged at 4°C and 1.0×10^6 rpm (radius = 0.06 m) for 10 min. After centrifuging, the liquid was decanted and the appropriate wet weight of yeast was obtained from the pellet for pitching.

4.3 Wort Fermentation Medium

Labatt Breweries of Canada supplied brewery wort with a specific gravity of 17.5°P. The concentration of fermentable carbohydrates, specific gravity, and free amino nitrogen in the brewer's wort used for the fermentations throughout this work is given in Appendix A2.1. Additional detail on the wort composition is given by Dale et al., 1986, Hoekstra, 1975, Hough et al., 1982, Klopper, 1974, and Taylor, 1989.

Batch Fermentations: Wort was heated in an autoclave for 45 min at 100°C and then cooled, before inoculation with immobilized cell beads or freely suspended yeast.

Continuous Fermentations: The wort used for the continuous fermentations was flash pasteurized (Fisher Plate Heat Exchanger, combi-flow Type Eurocal 5FH) prior to feeding into the gas lift bioreactor and this wort was monitored regularly for microbial contaminants, as described in section 4.6. If contamination was detected in the wort, it was immediately discarded and new wort was collected from the plant.

The flash pasteurizer was operated at a volumetric flow rate of $0.8 \text{ m}^3 / \text{hr}$. The unit had a tubular holding section where the wort was held at an average temperature of 85°C with a minimum temperature of 80°C. The volume of the holding section was $1.13 \times 10^{-2} \text{ m}^3$, giving a residence time in the holding section of 51 seconds. Following the heating step, the wort was rapidly cooled to a temperature of 2°C upon exiting the unit.

4.4 Immobilization Methodology

Kappa-carrageenan gel X-0909 was a generous gift from Copenhagen Pectin A/S. Kappa-carrageenan gel beads containing entrapped lager yeast cells were produced using the static mixer process, as described in detail by Neufeld et al. (1996), with initial cell loadings of $10^7 - 10^8$ cells/mL of gel, which are specified for each experiment. As illustrated in FIG. 15, the static mixer process is based on the formation of an emulsion between a non-aqueous continuous phase, vegetable oil (Mazola Corn Oil), and an aqueous dispersed phase, kappa-carrageenan (3% w/v) in KCl (0.2% w/v) solution, inoculated with yeast, using in-line polyacetal static mixers (Cole-Parmer Instrument Co., USA). In the heating section of the schematic, where the yeast was rapidly mixed with the carrageenan solution and the emulsion was formed, the temperature was 37°C. Gelation of the kappa-carrageenan droplets within the emulsion was induced with rapid cooling in an ice bath and subsequent hardening in a potassium chloride bath (22 g/L). A 24-element static mixer of 6.4 mm in diameter was used to create the mixture of yeast and carrageenan. A second 42 element mixer of 12.7 mm in diameter was used to create the emulsion. The beads used for the experiments in this work were $0.5 \text{ mm} < (\text{bead diameter}) < 2.0 \text{ mm}$.

4.5 Cumulative Particle Size Distribution of Kappa-Carrageenan Gel Beads

Containing Immobilized Yeast Cells

Kappa-carrageenan gel beads were randomly sampled from a 30-L production run of gel beads in order to calculate a particle size distribution on a mass wet-weight basis. Each sample was approximately 500 g wet

WO 02/102961

116

PCT/CA02/00970

weight. Sieving was used to determine the bead particle size distribution. The beads were passed through a series of sieves with grid sizes of 2.0, 1.7, 1.4, 1.18, 1.0, and 0.5 mm. A 4.5 L volume of 22 g/L KCl solution was used facilitate the sieving of each bead sample. The kappa-carrageenan gel beads were assumed to be perfectly spherical so that the sieve diameter was taken as the particle diameter. It was also assumed that the particle density was uniform and independent of particle size.

4.6 Yeast Cell Enumeration and Viability

Freely Suspended Yeast Viability and Cell Concentration: The American Society of Brewing Chemists International methylene blue staining technique (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992) was used to measure yeast cell viability. The stain measures whether a yeast population is viable or non-viable based on the ability of viable cells to oxidize the dye to its colourless form. Non-viable cells lack the ability to oxidize the stain and therefore stain blue. Fink-Kuhles buffered methylene blue was prepared by mixing 500 mL of Solution A (0.1 g methylene blue / 500 mL dH₂O) with 500 mL of Solution B (498.65 mL of 13.6 g KH₂PO₄ / 500 mL d H₂O mixed with 1.25 mL of 2.5 g Na₂HPO₄·12H₂O / 100 mL d H₂O) to give a final buffered methylene blue solution with a pH of 4.6.

The diluted yeast solution was mixed with the methylene blue solution in a test tube, to a suspension of approximately 100 yeast cells in a microscopic field. A small drop the well-mixed suspension was placed on a microscope slide and covered with a cover slip. Following one to five minutes of contact with the stain, the cells stained blue and the cells remaining colourless were enumerated. The percentage of viable cells was reported as a percentage of the total number of cells enumerated. Cell concentration was determined using a light microscope and a Hemacytometer (Hauser Scientific Company).

Immobilized Cell Viability and Cell Concentration: Gel beads were separated from the fermenting liquid by passing the mixture through a sterile sieve (500 μ m pore mesh size) and rinsing with 10 mL of distilled water. Gel beads, 1 mL, containing entrapped yeast were added to a sterile 50 mL specimen container containing 19 mL of distilled water. The beads were then disrupted using a Polytron® (Brinkmann Instruments) apparatus, to release the cells from the gel. Cell viability and concentration were then measured as described for the freely suspended cells.

4.7 Microbiological Analyses

Liquid Phase Analyses: Samples were taken from continuous fermentations at least once a week for microbiological analyses. The wort that was used for continuous fermentations was also tested for contamination prior to transferring it into the bioreactor. To test for the presence of both aerobic and anaerobic bacteria, samples were plated on Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories), with the addition of 10 mg/L of cycloheximide, and incubated at 28°C for 10 days. Plates that were tested for anaerobic bacterial contamination were placed in an anaerobic jar with an AnaeroGen® (Oxoid) packet, which takes up any oxygen remaining in the jar, creating an anaerobic environment. An anaerobic indicator (Oxoid), which turns pink in the presence of oxygen, was used to verify anaerobic conditions within the jar. Wild yeast contamination was tested by plating samples on yeast medium (YM agar, Difco Laboratories) plus CuSO₄ (0.4 g/L) incubated at 25°C for 7 days. Peptone Yeast-Extract Nutrient agar (PYN), described previously, was used to screen samples

WO 02/102961

117

PCT/CA02/00970

for non-lager yeast contaminants at 37°C for 7 days. The absence of yeast growth on PYN at 37°C indicated that no ale yeast or contaminants that grow at 37°C were present.

Gel Phase Analyses: An assay was developed in our laboratory to ensure that the immobilized cell beads to be used for fermentations were free of contaminating bacteria before being pitched into the bioreactor. The main concern was to avoid contamination with beer spoilage organisms such as *Pediococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. or wild yeast. A 3 mL volume of carrageenan gel beads was inoculated into 100 mL of several different selective liquid media described below and placed in 250 mL flasks at 25°C, and shaken at 100 rpm in an incubator shaker. NBB broth (Nachweis von Bierschädlichen Bakterien) (BBL cat # 98139, NBB Broth Base, 0.02 g/L cycloheximide) is a semi-selective medium which is used to test for beer spoilage bacteria, such as *Pediococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. Copper sulphate broth (16 g/L YM broth, Difco; 0.4 g/L CuSO₄) is a semi-selective medium to test for wild yeast contaminants. Finally, Standard Methods (STA) + cycloheximide broth (16 g/L "Standard Methods" broth, Difco; 0.02 g/L cycloheximide) is used to test for bacteria found in water, wastewater, dairy products, and foods (Power and McCuen, 1988). The selective media were chosen to detect and identify potential beer spoilage organisms within three days. Contaminated samples were indicated by turbidity within the sample and a presumptive identification of the contaminants was made.

Respiratory Deficient (RD) Yeast Cell Detection Methodology: Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) Overlay Technique: This method was used to distinguish respiratory deficient yeast from the rest of the population, and is based on the principle that TTC is a colourless salt that forms a red precipitate upon reduction. When TTC is overlayed onto yeast colonies growing on Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) agar (yeast extract, 10 g/L; Peptone, 20 g/L; Dextrose, 20 g/L; Agar, 20 g/L in dH₂O), respiratory sufficient yeast will reduce the TTC, and these colonies will become dark pink to red. However, respiratory deficient yeast do not reduce the dye and retain their original colour.

Cultures were serially diluted to a suitable concentration of microorganisms, ~100 cells/ 0.2 mL, for plating. The YPD plates were then incubated for approximately 3 days at 21°C until yeast colonies were visible in an aerobic environment. Each plate was then overlaid with 20 mL of 50°C TTC overlay agar. After cooling the individual solutions to 50°C, TTC overlay agar was made by mixing 1:1 Solution A (12.6 g/L NaH₂PO₄; 11.6 g/L Na₂HPO₄; 30.0 g/L agar in dH₂O, autoclaved at 121°C, 15 min) with Solution B (2.0 g/L 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in dH₂O, autoclaved at 121°C, 15 min). Plates were read after 3 hours of incubation at ambient temperature. Percent RD was reported as a percent of unstained colonies of the total number observed.

4.8 Scanning Electron Microscopy (SEM) of Yeast Immobilized in Kappa-Carrageenan Gel Beads
Kappa-carrageenan gel beads containing immobilized yeast were removed from the bioreactor through the sample port and placed in a 10 mL screw-cap glass vial, with the beads submerged in a small volume of fermentation broth. The vial was immediately covered in ice and transported in an insulated container to the SEM facility. Kappa-carrageenan gel beads containing immobilized yeast were fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde prepared in Sorensen's phosphate buffer, 0.07 M, pH 6.8 (Hayat, 1972). This was followed by post-fixing in 1% (w/v) osmium tetroxide, prepared in the same buffer, and dehydration through a graded series of alcohol solutions 50, 70, 80, 90, 95, 100% (v/v), at 15 min for each, and then 3 changes at 100%. Before critical point drying (Ladd Research Industries, Burlington, VT) through carbon dioxide, some beads were frozen in liquid

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

118

PCT/CA02/00970

nitrogen, fractured and collected into 100% alcohol. Freeze fracturing allows the internal face of the beads to be exposed with minimum distortion. Following critical point drying, the samples were sputter-coated (Polaron SC500 sputter coater, Fison Instruments, England) with 30 nm of gold/palladium and then scanned with a Hitachi S-4500 field emission scanning electron microscope (Nissei Sangyo, Tokyo, Japan).

4.9 Bioreactor Sampling Protocol

The bioreactor sample port (Scandi-Brew Type T Membrane Sample Valve) reservoir was filled with 70% (v/v) ethanol solution to maintain aseptic conditions around the opening between samplings. In order to take a sample, the plug was removed from the base of the ethanol reservoir, drained, and rinsed thoroughly with ethanol, prior to opening the port. Samples were collected into a crimp vial or a screw-cap jar and volumes varied from 5-60 mL, depending on the analysis required. In order to test for microbiological contamination, 10 mL of the fermentation liquid was vacuum-pumped through a sterile membrane filter unit. The membrane, 0.45 µm pore size, was placed on the appropriate selective medium, as described in Section 4.6.

For chemical analyses, 60 mL of sample was withdrawn through the septum from the 100 mL crimp-sealed vial and syringe-filtered through a Schleicher and Schull, FP-050, double-layer syringe filter system, 5 µm and 0.45 µm pore sizes. The required volume of sample was then dispensed into a 20 mL head space vial and crimped with a Teflon septum and aluminum cap. The required sample volumes are listed in Table 4.1.

Table 4.1. Sample volume requirements for various chemical analyses.

Sample	Volume (mL)
ethanol	5
short-chain diols	10
beer volatiles	12
vicinal diketones	5
carbohydrates/specific gravity/	12
free amino nitrogen/protein	12

4.10 Dissolved Oxygen Measurement

The Dr. Thiedig Digox 5 dissolved oxygen analyzer measures dissolved oxygen in the range of 0.001 - 19.99 mg/L in wort, fermenting wort and beer (Anon, 1998). Vilachá and Uhlir, (1985) tested many instruments for dissolved oxygen measurement in beer and found the Digox analyser to give trust-worthy, precise values. The electrochemical measurement method used by the Digox 5 is based on an amperometric three-electrode arrangement with a potentiometer. The measuring cell consists of a measuring electrode (cathode) and counter electrode (anode). These electrodes are exposed to the liquid in which the oxygen concentration is to be measured. A reaction at the measurement electrode occurs after fixing a defined measurement potential. At the large, silver, measurement electrode, molecules of oxygen are reduced to hydroxyl ions. Two water molecules react in equation 4.1, with one molecule of oxygen, while absorbing four electrons, giving four hydroxyl ions.

$$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^- \quad (4.1)$$

WO 02/102961

119

PCT/CA02/00970

The stainless steel anode absorbs the four electrons released at the cathode in order to ensure the flow of current. In equation 4.2, the measurement current, I , is directly proportional to the oxygen concentration, $C_{L,O}$:

$$I = K \times C_{L,O} \quad (4.2)$$

where the constant, K , is influenced by the Faraday constant, the number of electrons converted per molecule, the cathode surface area, and the width of the boundary layer at the surface of the measurement electrode.

A constant, characteristic, measurement potential is critical for the selectivity (for oxygen) and precision of the measurement. The measuring voltage is stabilized by the reference electrode, which is not burdened by current.

This, together with the potentiostat, which provides electronic feedback, provides a constant measurement potential. The surface of the measurement electrode is electrolytically connected to the reference electrode via a diaphragm.

The error, based on the measuring range of the final dissolved oxygen concentration, was $\pm 3\%$ (Anon, 1998).

The dissolved oxygen analyzer was calibrated using the Thiedig Active Calibration, in which the Digox 5 produced a defined oxygen quantity based on Faraday's Law (0.500 mg/L) and then cross-checked this with the measured values in the matrix. This allowed the instrument to be calibrated under the pressure, temperature and flow conditions corresponding to those of the measurement, within one min. Because the exchange of molecules in the sensor is a diffusion process, it is influenced by temperature, resulting in faster reaction rates and increases in the measured current. Therefore, the Digox 5 is also equipped with a sensor, which measures the temperature and automatically compensates for fluctuations.

The Digox 5 has some advantages over membrane-based oxygen sensors. Because the Digox uses no electrolyte, the sensitivity loss is relatively slow and only minor deposits on the measurement electrode occur. Also, the sensitivity can be determined at any time, by performing an active calibration. It is a simple procedure to clean the electrode and recalibrate the instrument. In most membrane-sensors, silver chloride is deposited on the cathode, and the electrolyte solutions changes, resulting in progressively lower readings. For this reason membranes and electrolytes are recommended to be changed every few weeks and then recalibrated, a lengthy and cumbersome task. Calibration of the membrane-based sensors is usually conducted in the lab at oxygen saturation levels, which could cause appreciable errors, especially in the wort and beer matrix at very low oxygen levels. Temperature will have a three-fold influence on membrane-based oxygen sensors: membrane permeability will change, the partial pressure of oxygen will change, and the solubility of oxygen in the electrolyte will change. Temperature compensation for these three factors in membrane-based sensors is difficult.

Dissolved Oxygen Measurement in the Wort During Storage: Flexible Tygon® food grade tubing (¼ inch i.d.) was aseptically connected to a sample port located near the top of the conical bases of the wort storage tanks, T-1 and T-2 (see section 4.2.1). A variable speed peristaltic pump provided volumetric flow rate of 1 l L/hr through the dissolved oxygen analyzer block. ((Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50)). Wort dissolved oxygen measurements were then recorded after 4-5 minutes.

Dissolved Oxygen Measurement in the Bioreactor: Prior to performing the dissolved oxygen measurements on the bioreactor, the Digox 5 analyser block was sanitized. The inlet of the sensor was connected to sterile, Tygon® Food Grade tubing (¼ inch i.d.). A 70% (v/v) ethanol solution was pumped through the analyzer at a volumetric flow rate of approximately 10 L/hr for 15 min. The dissolved oxygen analyzer was connected to a laboratory water tap and hot water (70°C) was passed through the sensor for a minimum of 2 hours. This

WO 02/102961

120

PCT/CA02/00970

methodology was used rather than steam sterilization because the analyzer block materials cannot tolerate temperatures of above 70°C. Following the two-hour sanitation period, the tubing at the inlet and outlet of the unit was clamped to maintain sterility within the analyzer. In a laminar flow hood, the freshly sterilized tubing was connected to the inlet and outlet of the analyzer. The free ends of the tubing were then aseptically clamped to the ¼" I.D. stainless steel ports on the bioreactor head plate and measurements were taken. When the ports on the bioreactor were not in use, they were sealed using a short length of sterilized Tygon® food grade tubing. Dissolved oxygen was measured on-line in the gas lift bioreactor by withdrawing liquid from the fermentation through a port situated on the bioreactor head plate. The fermentation liquid exited the bioreactor through a stainless steel filter (see section 4.1.2) connected to a ¼ inch stainless steel pipe which penetrated the bioreactor head plate. The liquid then flowed through flexible Tygon® food grade tubing (¼ inch i.d.), which was connected to a variable speed peristaltic pump (Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50), providing a volumetric flow rate of 11 L/hr through the dissolved oxygen analyzer block. The fermentation liquid was then recycled through a second quarter-inch stainless steel port, which penetrated the bioreactor head plate. Tygon® food grade tubing (Cole-Parmer, 1999) was used to connect the sensor to the bioreactor because of its supplier-specified low oxygen permeability of $30 \text{ cm}^3\text{mm}/(\text{s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{cmHg}) \times 10^{-10}$. The measurement was taken after 4-5 minutes of circulation.

4.11 Chemical Analyses

Calibrations were performed using the appropriate standard reagents. All reagents used for the analyses were >99% pure. Where necessary, subsequent purification via distillation was performed.

4.11.1 Ethanol

Ethanol concentration was determined using the internal standard gas chromatograph (GC) method of the Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992). Degassed samples were treated directly with isopropanol internal standard, 5% (v/v) and injected into a Perkin Elmer 8500 Gas Chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and a Dynatech autosampler. A Chromosorb 102, 80-100 mesh column was used with helium as the carrier gas. Chromatographic conditions: flow rate of 20 mL/min, injector temperature of 175°C, detector temperature of 250°C, and column temperature of 185°C.

4.11.2 Carbohydrate Summary

Glucose, fructose, maltose, DP3 (maltotriose), DP4 (maltotetraose), poly-1 (polysaccharide peak 1) and glycerol concentrations in fermentation samples were quantified using a Spectra-Physics (SP8100XR) high performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with a cation exchange column (Bio-Rad Aminex, HPLX-87K) and a refractive index detector (Spectra-Physics, SP6040XR). The mobile phase was potassium phosphate, dibasic, 0.01 M, and the system was equipped with a Spectra-Physics (SP8110) auto sampler. The instrument was operated with a backpressure of 800 psi. The flow rate of sample and eluent through the column was 0.6 mL/min, with a column temperature of 85°C and a detector temperature of 40°C. The injection volume was 10 µL.

WO 02/102961

121

PCT/CA02/00970

4.11.3 Specific Gravity

The specific gravity of the wort and fermentation medium is described in this study in terms of Real Extract (degree Plato, "P"), which is the accepted unit used in the brewing industry.

Fermentation samples were filtered as described in section 4.8 and vortexed prior to analysis with a digitalized density meter (Anton Paar DMA-58 Densitometer) to measure wort specific gravity (degree Plato). The fermentation samples were inserted into a glass u-tube, which oscillated electronically to determine the specific gravity, thus giving degree Plato indirectly.

Degree Plato refers to the numerical value of a percentage (w/v) sucrose solution in water at 20°C whose specific gravity is the same as the wort in question. Because the degree Plato scale and resulting tables relating solution specific gravity to solute concentrations are based on aqueous solution of sucrose, it is only an approximation of the amount of extract. Extract is a term referring to the total available soluble mass in a brewing material "as is", and /or potentially through processing (Hardwick, 1995) such as carbohydrates, proteins, tannins. Extract is still currently expressed in the brewing industry as specific gravity in degree Plato because of the lack of a more appropriate reference better related to the variability in compositions of worts of different origins.

4.11.4 Total Diacetyl

Total diacetyl (2,3-butanedione) in beer and fermentation samples was measured using a headspace analyte sampling technique, followed by capillary GC separation (Hewlett-Packard 5890) and electron capture detection (ECD) based on the method of the Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992). The method refers to "total diacetyl" because the method measures the amount of diacetyl and its precursor, alpha-acetolactate. The carrier gas was 5% methane in argon at 1.0 mL/min and a J & W DB-Wax column was used. The split ratio was 2:1 and the auxiliary gas was helium at 60 mL/min. Injector temperature was 105°C and detector temperature was 120°C.

The system was equipped with a Hewlett Packard 7694E headspace autosampler and 2,3-hexanedione was used as an internal standard. The sample cycle time was 40 min, with a vial equilibration time of 30 min at 65°C, a pressurization time of 2 min at 4.8 psig, a loop fill time of 0.2 min, a loop equilibration time of 0.1 min, and an injection time of 0.27 min. Carrier pressure was 18.8 psig, transfer line temperature was 95°C and loop temp was 65°C.

4.11.5 Beer Volatiles

Beer volatiles including acetaldehyde, ethyl acetate, isobutanol, 1-propanol, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, and ethyl octanoate were measured using an internal standard (n-butanol) GC (Hewlett Packard 5890) headspace method and a flame ionization detector (FID). The carrier gas was helium at 6.0 mL/min and the GC was equipped with an Hewlett Packard 7694 headspace autosampler.

GC injector temperature was 200°C and detector temperature was 220°C. Oven temperature profile: 40°C (5 min), 40 - 200°C (10°C/min), 200 - 220°C (50°C/min), 220°C (5 min). The FID gases included the carrier at 6.0 mL/min, helium makeup at 30 mL/min and 28 psig, H₂ at 50 mL/min and 25 psig, and air at 300 mL/min and 35 psig.

WO 02/102961

122

PCT/CA02/00970

The septum was purged at a flow rate of 0.8 mL/min. The head pressure was 4.0 psig. When the autosampler was connected via a needle in the injection port, the vial pressure was 15.9 psig, the carrier pressure was 7.1 psig, the column head pressure was 4 psig, the split flow was 18 mL/min and the column flow was 6 mL/min. Zone temperatures: vial at 70°C, loop at 80°C, transfer line at 150°C.

The GC cycle time was 40 min, with a vial equilibration time of 35 min, a pressurization time of 0.25 min, a loop fill time of 0.1 min, a loop equilibration time of 0.1 min, an injection time of 3 min and a sample loop volume of 1 mL.

4.11.6 Free Amino Nitrogen (FAN)

The Free Amino Nitrogen International Method of the Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992) was used to determine the concentration of free amino nitrogen in a fermentation sample, using a Perkin Elmer LS50B spectrophotometer. This spectrophotometric method displays a colour reaction between ninhydrin and the nitrogen present in the sample. The amount of absorbance is directly related to the amount of free amino nitrogen present.

- a) Colour Reagent: 19.83 g disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
 30.00 potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
 2.78 g ninhydrin monohydrate
 1.50 g fructose
- b) Dilution Reagent: 2.00 g potassium iodate (KIO_3)
 596 mL distilled, deionized water
 404 mL 95% (v/v) ethanol

Stored in refrigerator and used at room temp.

c) Glycine Stock Solution: 0.1072 g/100 mL distilled deionized water

d) Glycine Standard Solution: stock solution was diluted 1:100 (v/v) with distilled, deionized water. This standard contains 2 mg/L FAN.

The samples were diluted to a ratio of 100:1 with distilled water and 2 mL of the diluted sample were introduced into each of 3 test tubes. The blank was prepared by introducing 2 mL of distilled deionized water into each of 3 test tubes. Three test tubes containing 2 mL each of the glycine standard solution were also prepared.

For all samples, 1 mL of colour reagent was added and then they were placed in a 100°C water bath for exactly 16 min. The test tubes were then cooled in a 20°C water bath for 20 min. Five mL of the dilution reagent was then added to each test tube and mixed thoroughly. The samples were then allowed to stand for 10-15 min. The absorbance at 570 nm was then measured using a spectrophotometer and the amount of FAN in a sample was calculated using equation 4.3.

$$\text{FAN (mg/L)} = (A_P - A_B - A_F) 2d / A_S \quad (4.3)$$

Where FAN is the amount of free amino nitrogen in the sample in mg/L, A_P is the average of the absorbances of the test solutions, A_B is the average of the absorbances for the blanks, A_F is the average of the absorbances for the correction for dark worts and beers, 2 is the amount of FAN in the glycine standard solution, d is the dilution factor of the sample, and A_S is the average of the absorbances for the glycine standard solution.

WO 02/102961

123

PCT/CA02/00970

CHAPTER 5. CONTINUOUS FERMENTATION USING
A GAS-LIFT BIOREACTOR SYSTEM

A gas-lift draft tube bioreactor system was chosen for continuous beer fermentation because of its published excellent mass transfer (liquid-solid) and mixing characteristics. Liquid-solid mass transfer is especially important since it involves the transfer of nutrients from the liquid phase to the solid immobilized cell biocatalyst, providing substrates for the encapsulated yeast. These bioreactors also provide good aeration, low power consumption, and are simple to construct. This has made gas-lift bioreactor systems very attractive for large scale operations, such as those used commercially for wastewater treatment (Driessen et al., 1997; Heijnen, 1993).

5.1 Gas-lift Draft Tube Bioreactor Description

This section gives a detailed description of the gas-lift bioreactor used in this work.

5.1.1 Bioreactor Body

The 13 L (8 L working volume) gas-lift draft tube bioreactor designed for this work was a three phase fluidized bed (liquid/solid/gas) where the immobilized cells were kept in suspension by carbon dioxide gas driven internal liquid circulation (Heijnen, 1996) as shown in FIG. 16. A photograph of the bioreactor vessel is given in FIG. 17 and a detailed drawing with detailed dimensions is given in FIG. 18. Carbon dioxide and air flow into the bottom cone of the bioreactor through a sintered stainless steel sparger (CO₂ purger nozzle, Part #9222, Hagedorn & Gannon, USA), 0.11m length, 0.013 m outer diameter. Carbon dioxide was used as the fluidizing gas and air was used to supply oxygen to the yeast cells.

A draft tube, concentrically located inside the columnar bioreactor, functioned as the riser in this fluidized bed system while the outside annulus served as the downcomer. The internal draft tube was suspended from a cylindrical particle separator, seated on three stainless steel tabs in the expanded head region of the bioreactor. Keeping the draft tube and particle separator fittings inside the bioreactor, minimized the risk of microbial contamination from the outside environment.

Originally, the bioreactor had a mesh screen to separate the immobilized cells from the liquid at the outlet. However, the screen was prone to plugging, so a stainless steel cylinder was used to separate the immobilized cell beads from the liquid phase as they moved over the top of the draft tube and flowed down the annulus. The particles would hit the cylinder and fall back down into the bulk liquid phase rather than leaving the bioreactor as overflow. Thus there was a small region near the bioreactor outlet that was free of immobilized cell particles. The bioreactor expanded head region also increased the surface area for gas bubble disengagement.

5.1.2 Bioreactor Headplate

In FIG. 19 a schematic of the bioreactor headplate is given. Headplate ports were kept to a minimum to reduce the risk of contamination. The ports were either welded directly onto the headplate or compression fittings (Swagelok®) were used. The headplate incorporated an inoculation port, a thermowell, a thermometer, a septum for gas sampling, and liquid withdrawal and return ports for dissolved oxygen measurement. A temperature sensor was inserted into the thermowell, which fed back to the temperature controller system. The temperature

WO 02/102961

124

PCT/CA02/00970

controller gave feedback to a solenoid valve, which opened and closed the glycol supply to the bioreactor thermal jacket. Temperature was monitored using a thermometer (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple thermometer, #90610-20) and a type T probe, which was welded into the bioreactor head plate. Dissolved oxygen was measured using a dissolved oxygen analyzer (Dr. Theidig, Digox 5), which required a flow of 9-11 L/hr of liquid broth through the analyzer block for accurate oxygen readings. Liquid was withdrawn from the bioreactor for oxygen measurement through a 1/4 i.d. pipe that went through the headplate into the fermentation liquid. As shown in FIG. 20, the tip of pipe was fitted with a filter to remove larger particulates from the liquid, as it was pumped through the dissolved oxygen analyzer. The liquid was then returned back to the bioreactor through another 1/4" port in the headplate.

5.1.3 Sanitary Valves for Aseptic Sampling

The bioreactor was equipped with a membrane sample valve (Scandi-Brew[®]) welded into the bioreactor wall. The valve was designed for sampling under aseptic conditions. The membrane sealed directly against the fermentation liquid, allowing the valve to be fully sterilizable with steam and alcohol through two outlets (FIG. 18). A small external reservoir of ethanol surrounded the membrane to maintain sterility between sampling. This valve was used for all bioreactor sampling and it was assumed that the composition of the liquid at the point of sampling was not significantly different than the composition of the liquid exiting the bioreactor outlet. As mentioned in the Materials and Methods chapter of this work, the bioreactor was sampled from a valve located on the outer wall of the bioreactor. In order to validate the assumption that the composition of the liquid exiting the bioreactor outlet was the same as the liquid sampled from the body of the bioreactor, mixing time studies were performed.

A pulse tracer method was used to determine mixing time in the gas-lift bioreactor (Chistie, 1989). A 1 mL volume of 10 N HCl was rapidly injected into the bioreactor annulus and the change in pH was logged over time, with time, $t = 0$ seconds at the time of the injection. The pH was returned to its original value by injecting 10 N NaOH. The pH electrode (Cole-Parmer, cat. #P-05990-90) was 277 mm in length and 3.5 mm in diameter. An Ingold Model 2300 Process pH Transmitter was used to monitor pH. A two-point pH calibration was performed with certified standard buffers, Beckman pH 7.0 green buffer, Part #566002 and Beckman pH 4.0 red buffer, Part #566000. The data was logged at a frequency of 2750 Hz for 300 seconds using a software program designed by Cheryl Hudson and John Beltrano in 1994, and modified by Norm Meusour in 1999 (University of Western Ontario, London, Ontario).

The pH data was then smoothed using the Savitsky-Golay algorithm in TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Guelph, Ontario). The Savitsky-Golay algorithm is a time-domain method of smoothing based on least squares quartic polynomial fitting across a moving window within the pH data (Anon, 1996). The smoothed data was then normalized and a plot of ΔpH versus time was generated. The mixing time was taken to the nearest minute, when the pH had reached ~95% of equilibrium value. The mixing time was measured using three different volumetric flow rates of carbon dioxide: 283 cm³/min, 472 cm³/min (volumetric flow rate used throughout this work), and 661 cm³/min. In all three cases the pH in the bioreactor had equilibrated (~95% cutoff) in less than 2 minutes, as seen in Appendix 1. The mixing time was deemed to be sufficiently short to validate our original assumption that the bioreactor was well-mixed. This allowed us to assume that the composition of the liquid sampled from the bioreactor wall was not significantly different from

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

125

PCT/CA02/00970

that which flowed from the outlet, with an average liquid residence time of 24 hours in the bioreactor. From the appended figures, a definite liquid recirculation superimposed on mixing by dispersion was seen, which is typical of gas-lift bioreactors (Chisti, 1989).

5.2 Flow Diagram of Continuous Beer Fermentation System

A flow diagram for the continuous beer fermentation system, which was housed in the Microbrewery Pilot Plant of Labatt Brewing Company Limited in London, Ontario, is given in FIG. 21 with a detailed parts description in Table 5.1. In summary, brewer's wort was collected from the London Labatt Plant, sterilized using a flash pasteurizer (Fisher Plate Heat Exchanger, combi-flow Type Eurocal 5FH), and stored in large holding tanks (T-1 and T-2). During continuous fermentation the wort was transferred at a controlled flow rate to the gas-lift bioreactor (BR-1) containing immobilized yeast cells. Fermented liquid left the bioreactor as overflow and was collected into a receiving vessel (T-3). In the following sections, the operation of the continuous beer fermentation system given in FIG. 21 is detailed.

5.2.1 Wort Collection and Storage

Un-oxygenated wort for continuous fermentation was collected from the Labatt London plant via piping into a 1600 L cylindroconical storage tank, pre-purged with carbon dioxide to minimize oxygen pickup by the wort. All tanks of this scale, including wort holding tanks, T-1 and T-2, were cleaned and sanitized as per Labatt Best Practices prior to their use. The wort was then flash pasteurized and transferred at 2°C into the available wort holding tank, T-1 or T-2 (also pre-purged with carbon dioxide). Wort was held in these tanks at 2°C for up to 2 weeks, supplying liquid to the continuously fermenting bioreactor, BR-1. At the end of the two-week period, the bioreactor feed was changed over so that wort was supplied from the second wort tank, which contained fresh wort. Two identical wort storage tanks, T-1 and T-2, were employed to minimize downtime during the changeover to fresh wort. In all cases, wort was tested for contamination a minimum of two days prior to being introduced into the bioreactor (BR-1). If the wort was contaminated, it was discarded and fresh wort was immediately collected and pasteurized.

Minimizing Wort Dissolved Oxygen Concentration During Storage: The goal was to store the wort with minimal oxygen, at a constant level, and at a low temperature, without freezing the wort. This was required to prevent undesirable staling reactions in the wort from chemical reactions with oxygen (Narziß et al., 1993), to provide a consistent supply of wort to the bioreactor, and to minimize the risk of wort contamination with microbes during storage. The large 1,600 L (net) cylindroconical vessels (T-1 and T-2) used to store the wort for the continuous fermentations, were originally designed as batch fermenters, not wort storage tanks. Because of this, the cooling for these vessels was not adequate to maintain wort at 2°C. After three days of holding the wort, temperature varied as much as 15°C from one region of the tank to another (Table 5.2).

These warm regions in the tanks increased the risk of microbial growth. Thus, some agitation was needed in these tanks to ensure a uniform low temperature throughout.

For these reasons, a pipe sparger was installed into the base cone of each wort storage tank (T-1 and T-2).

Experiments were performed to determine the best protocol for filling the tank with wort and maintaining constant low levels of dissolved oxygen. In the first experiment, the storage tank was filled with wort that had been collected without oxygenation and flash-pasteurized. Once the storage tank was filled with 1,600 L wort,

WO 02/102961

126

PCT/CA02/00970

0.113 m³/hr of carbon dioxide was sparged into the base of the tank. During the second experiment, the wort was again collected without oxygenation and flash-pasteurized. This time, the storage tank was purged with carbon dioxide (0.85 m³/hr) for 3 hours prior to filling and a small amount of carbon dioxide (0.113 m³/hr) was continuously sparged into the storage vessel as the wort was being transferred into the tank. This low flow of carbon dioxide was continuously bubbled through the wort stored in the tank while it supplied wort to the continuous fermentation. For both experiments, wort dissolved oxygen concentration was monitored on a regular basis during a week of storage.

In Figure 5.7, dissolved oxygen concentration versus wort storage time is given. When the holding tank was not pre-purged with carbon dioxide, the air in the headspace of the tank allowed some pickup of oxygen by the wort. Thus, without prepurging the tank it took a significantly longer period of time for the dissolved oxygen concentration in the wort to reach a minimal and constant level. When the tank was pre-purged, the wort dissolved oxygen concentration remained at a constant low level throughout the storage period. Thus, pre-purging the wort storage tanks (T-1 and T-2), and continuing to provide a small flow of carbon dioxide through the wort during storage in order to keep a slight positive pressure on the tanks, was adopted as part of the wort storage procedure for all continuous fermentations.

The temperature profile in the storage vessels was also compared with and without 0.113 m³/hr of carbon dioxide sparging. This was performed on water rather than on wort using a Type T temperature probe connected to a thermometer (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple Thermometer, cat. #90610-20). City water (1,600 L) was collected into a wort storage tank and equilibrated for three days and the temperature of the water was recorded in different regions of the storage tank. The water in the tank was then sparged for 24 hours with 0.113 m³/hr carbon dioxide and the temperature was again recorded. Ambient temperature was recorded in each case and the temperature set point within the storage tank was 2.0°C.

As seen in Table 5.2, with carbon dioxide sparging, the temperature in the storage tanks was more uniform, with temperature ranging between 0.1 and 4.1°C in the regions measured, and the contents of the tanks did not freeze. This lower temperature helped to prevent unwanted growth of microbes in the wort during storage.

Gas was released from the wort storage tanks through a sterile gas filter situated at the top of the tank. Wort was then transferred using a variable speed peristaltic pump (P-1) (Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50) to the 8 L bioreactor (BR-1) inlet using Norprene® Food Grade L/S 16 flexible tubing.

5.2.2 Continuous Fermentation using Gas-Lift Draft Tube Bioreactor System

Wort was introduced near the bottom cone of the bioreactor, BR-1, through a 1/4" port. A mixture of filter-sterilized (Millipore, Millex®-FG50, 0.2 µm Filter Unit), air and carbon dioxide (99.99% purity) flowed into the bioreactor through the sintered stainless steel sparger. A rotameter (R-3) was used to control the carbon dioxide flow rate at STP, and a precalibrated mass flow controller (M-1) was used to control the flow rate of air at STP. Fermented liquid left the bioreactor as overflow and flowed through 1" I.D. reinforced PVC tubing into a 30 L stainless steel collection vessel (T-3) which was cooled with an external glycol coil and kept at a temperature of 4°C.

WO 02/102961

127

PCT/CA02/00970

5.2.3 Product Collection

The product collection vessel (T-3) had a large inlet port (1" I.D.) which was designed so that the fermented liquid would flow down the collection vessel wall to minimize foaming. This vessel also had a sterile gas filter, (Millipore, Millex®-FG50, 0.2 µm Filter Unit), for gas release from the bioreactor (BR-1) and the collection vessel (T-3). The collection vessel was periodically emptied using a ¼" valve (V-12) situated 2" above the base of the tank.

5.2.4 Glycol Cooling Loop

Glycol was transferred from the London Brewery to the Microbrewery Pilot Plant at a temperature of -23°C and pressure of 45 psig, and circulated through cooling jackets for the wort holding tanks (T-1 and T-2), the gas-lift bioreactor (BR-1), and the product collection vessel (T-3). The two wort holding tanks and the bioreactor were equipped with liquid phase temperature probes which provided feedback to temperature controllers, which in turn controlled the flow of cold glycol to the vessel jackets. The wort holding tanks stored the wort at 2°C, while the temperature within the bioreactor was controlled at temperatures of 12°C to 22°C, depending upon the specific experiment. The product collection vessel did not have automatic temperature control, but rather, the flow of glycol was manually controlled to keep the vessel at approximately 4°C. It was not necessary to precisely control the temperature of the product collection vessel (T-3) because the liquid in this vessel was simply discarded and not analyzed or processed further.

Glycol was also used to jacket and cool the wort transfer lines from the wort tanks (T-1 and T-2) to the bioreactor (BR-1). Once the glycol had circulated through a given jacket, it was returned to a main line within the Pilot Plant Microbrewery and then was returned to the London Plant, generally at a temperature of -15°C and pressure of 40 psig.

5.3 Bioreactor Sterilization Protocol

The bioreactor (BR-1) was filled with a 2% (v/v) solution of Diversol® CX/A (DiverseyLever, Canada), a sanitizing detergent, and soaked overnight with gas sparging. The reactor was then drained and rinsed with cold water. This cycle of cleaning solution and water rinsing was repeated two times. In order to prepare the bioreactor for steam sterilization, the wort and gas lines were disconnected. The steam line was connected to the bioreactor inlet and the following valves were opened: the bioreactor inlet and purge valves (V-7, V-6), the gas inlet (V-17), product outlet valves (V-9, V-11), the membrane sampling valves (V-8, V-10), and collection vessel drain port (V12). The plant steam valve was then slowly opened and the bioreactor valves were adjusted so that a trickle of steam was observed at the exit of each external opening. After 60 minutes of steam exposure, all the external valves on the bioreactor were closed (V-17, V-8, V-10, V-12) except the wort bypass valve (V-6). When the steam valve was closed, the wort bypass valve was closed and a sterile filter was connected to the collection vessel to prevent contamination by non-sterile air entering the system as it cooled. The bioreactor gas line was also reconnected at V-17 as the plant steam line was closed in order to maintain a positive pressure while the system cooled.

WO 02/102961

128

PCT/CA02/00970

5.4 Fermentation System Startup

Brewer's wort was collected from the plant into a 20 L stainless steel pressure vessel and heated in an autoclave for 45 minutes at 100°C. Immobilized cells were aseptically transferred into the cooled wort (40% v/v). The sealed vessel was transported to the Microbrewery Pilot Plant where the bioreactor system was housed. The 20 L vessel was connected to a quick connect fitting (Cornelius Anoka, MN, USA), which was clamped to reinforced 3/8" PVC tubing (Cole-Parmer, USA). The other end of the PVC tubing was clamped to the membrane sampling valve (V-8) in the bioreactor wall. Filter-sterilized carbon dioxide was applied as 10 psig to the 20 L vessel and the membrane sample port was opened so that the immobilized cell mixture was transferred from the vessel into the bioreactor, without exposing the inoculum to the outside air environment. The internal components of the "quick connect" fittings of the 20 L vessel were removed to prevent plugging with immobilized cells upon transfer into the bioreactor. The cumulative particle size distribution (undersize) for the kappa-carrageenan gel beads is shown in Figure 5.8. The arithmetic mean particle diameter, $D_{p_{\text{amo}}}$, was calculated to be 1.252 mm and the Sauter mean particle diameter, $D_{p_{\text{sm}}}$, was 1.17 mm. The median particle diameter was 1.255 mm. The experimental data and mean particle diameter calculations are given in Appendix 1.

Following inoculation with immobilized cells, the bioreactor was operated in batch mode until the sugar and diacetyl concentrations reached targets of less than 3°Plato in terms of specific gravity and less than 100 □g/L diacetyl. The system was then prepared for continuous operation. In order to rinse with hot water and steam-sterilize the wort transfer line, valves V-2 (or V-4 for T-2), V-5, and V-6 were opened, while V-1 (or V-3 for T-2) and V-7 were closed, isolating the wort line. The wort transfer line was rinsed with hot water at approximately 80°C, which was supplied through V-2 (or V-4 for T-2). Following the hot water rinse cycle, the plant steam line was connected at the same location and the wort transfer line was steam sterilized for a minimum of 30 minutes. At the same time that the steam line was shut off, the bypass valve (V-6) was also closed. Once the system had cooled, V-2 (or V-4 for T-2) was closed and the steam line was disconnected. The wort tank valve, V-1 (or V-3 for T-2), and the bypass valve (V-6) were opened and the wort transfer pump (P-1) was started. The wort was sent to the sewer drain via the bypass valve (V-6) until the condensate in the line was replaced with fresh cold wort. At that point the bypass valve was closed and the bioreactor inlet valve (V-6) on the reactor was opened, commencing the continuous fermentation process.

Every two weeks the tank, which supplied wort was alternated between storage tanks (T-1 and T-2). After two weeks of supplying wort from T-1, the continuous feed pump, P-1 was stopped and the valve (V-5) at the inlet of the bioreactor was closed. The wort transfer line was then connected to the second storage tank (T-2) and the line was flushed and sterilized as described in the previous paragraph. Continuous fermentation then resumed after only a short down time of less than one hour.

Table 5.1. Detailed parts description for flow diagram shown in Figure 5.6; PTFE, polytetrafluoroethylene; SS, stainless steel.

Item	Description	Size	Mat'l Const.
BR-1	Bioreactor	8 L net	316 SS
T-1	Storage tank for wort	1600 L net	316 SS
T-2	Storage tank for wort	1600 L net	316 SS
T-3	Storage tank for beer	30 L net	316 SS
P-1	Pump (peristaltic, variable speed) for wort transfer from T-1 to BR-1	<0.08 L/min	SS rollers on Norprene® Food flexible tubing
F-1	Filter for gas at outlet of T-1	<4 bar	polyprop., 0.2 micrometer PTFE membrane
F-2	Filter for gas at inlet of T-1	<2 bar	polyprop., 0.2 micrometer PTFE membrane
F-3	Filter for gas at outlet of T-2	<4 bar	polyprop., 0.2 micrometer PTFE membrane
F-4	Filter for gas at inlet of T-2	<2 bar	polyprop., 0.2 micrometer PTFE membrane
F-5	Filter for gas at inlet of BR-1	<2 bar	polyprop., 0.2 micrometer PTFE membrane
F-6	Filter for gas at outlet of T-3	<2 bar	polyprop., 0.2 micrometer PTFE membrane
M-1	Mass flow controller for air to BR-1	<500 sccm	316 SS, nylon, Vison® "Q"-ings
R-1'	Rotameter for carbon dioxide to T-1	<10 scfh	316 SS, acrylic block
R-2	Rotameter for carbon dioxide to T-2	<10 scfh	316 SS, acrylic block
R-3	Rotameter for carbon dioxide to BR-1	<2.5 scfh	316 SS, acrylic block
PR-1	Pressure regulator for carbon dioxide to T-1 & T-2	<100 psi	316 SS

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Item	Description	Size	Mat'l Const
PR-2	Pressure regulator for carbon dioxide to BR-1	<100 psi	316 SS
PR-3	Pressure regulator for air to BR-1	<100 psi	316 SS
V-1	Valve (butterfly) for wort in T-1	1"	316 SS, Viton® seat
V-2	Valve (butterfly) for wort in CIP loop in T-1	1"	316 SS, Viton® seat
V-3	Valve (butterfly) for wort in T-2	1"	316 SS, Viton® seat
V-4	Valve (butterfly) for wort in CIP loop in T-2	1"	316 SS, Viton® seat

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

131

18 AUG 2004 1 2 1 0 0 1 0 0 0 0

Table 5.1 (cont'd). Detailed parts description for flow diagram shown in FIG. 21.

Item	Description	Size	Mat'l Const.
V-5	Valve (ball) for wort at header	1/4"	316 SS, silicone seat
V-6	Valve (ball) for bypass at BR-1 wort inlet	1/4"	316 SS, silicone seat
V-7	Valve (ball) for BR-1 wort inlet	1/4"	316 SS, silicone seat
V-8	Valve (membrane sample) on wall of BR-1	12 mm	316 SS, silicone seat
V-9	Valve (butterfly) at BR-1 beer outlet	1"	316 SS, viton seat
V-10	Valve (membrane sample) for BR-1 wort outlet	12 mm	316 SS, silicone seat
V-11	Valve (butterfly), secondary, at BR-1 beer outlet	1"	316 SS, viton seat
V-12	Valve (ball) for emptying liquid from T-3	1/4"	316 SS, silicone seat
V-13	Valve (ball) for carbon dioxide line to T-1 & T-2	1/4"	316 SS, silicone seat
V-14	Valve (butterfly) for T-1 carbon dioxide inlet	1/2"	316 SS, silicone seat
V-15	Valve (butterfly) for T-2 carbon dioxide inlet	1/2"	316 SS, silicone seat
V-16	Valve (ball) for carbon dioxide line to BR-1	1/4"	316 SS, silicone seat
V-17	Valve (quick release) for BR-1 gas inlet	1/4"	316 SS, silicone seat
V-18	Valve (ball) for air line to BR-1	1/4"	316 SS, silicone seat

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

Symbols used in FIG. 21:

132

A. W. FROST & CO. LTD.

	Flexible connector and union
	Gas Filter
	Pressure regulator
	Pump
	Valve

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

133

PCT/CA02/00970

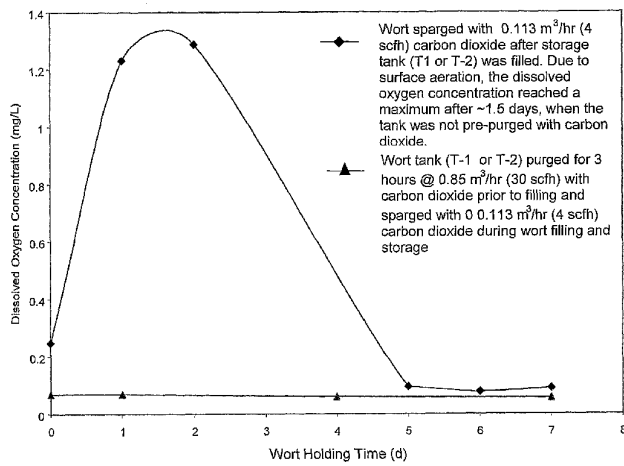


Figure 5.7. Dissolved oxygen concentration in the wort versus hold time in wort storage vessel (T-1 or T-2) under different tank filling conditions.

Table 5.2. Temperature profile of water in wort storage vessel (T-1 or T-2) after equilibrating for three days with no carbon dioxide sparging, and after 24 hours of carbon dioxide sparging at 0.113 m³/h.

Location of Measurement within Cylindroconical Vessel	Temperature (°C)	
	No CO ₂ Sparging	With CO ₂ Sparging
10 cm below liquid surface and 10 cm from the vessel wall	20.6	0.4
10 cm below liquid surface and at the center of the vessel	20.1	0.1
bottom of cylindrical section and 10 cm from vessel wall	3.8	3.7
bottom of cylindrical section and at the center of the vessel	3.7	4.1
Pilot Plant ambient	21.4	19.8

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

134

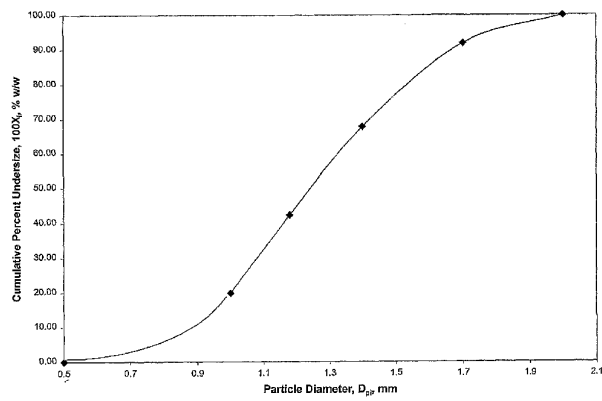


Figure 5.8. Cumulative particle size distribution of kappa-carrageenan gel beads containing immobilized yeast cells (n = 5)

WO 02/102961

135

PCT/CA02/00970

¹CHAPTER 6. Kappa-Carrageenan Gel Immobilization of
LAGER BREWING YEAST

Scientists have studied a variety of matrices for the physical entrapment of whole cells including calcium alginate (Bejar et al., 1992; Curin et al., 1987; Masschelein and Ramos-Jeunehomme, 1985; Nedovic et al., 1996; Shindo et al., 1994; White and Portno, 1978), agarose (Hooijmans et al., 1990; Lundberg and Kuchel, 1997), and carrageenan gels (Norton et al., 1995; Wang et al., 1982). Carrageenan is a food grade material and it has been favoured for cell encapsulation due to its superior mechanical strength compared to other gels (Büyükgüngör, 1992).

In the first part of this chapter, the yeast cell colonization within kappa-carrageenan gel beads was monitored over three cycles of repeated batch fermentation. The viability of the immobilized cells and the cells released into the liquid phase was examined. Fermentation parameters including ethanol, maltose, maltotriose, fructose, and glucose were followed throughout the repeated batch fermentations and then compared with control fermentations using only freely suspended yeast cells under the same nutrient conditions.

There has been little published information to date on the physical effects on cells after long term immobilization (Virkajärvi and Kronlöf, 1998) and continuous exposure to external stresses and fermentation products. The second part of this chapter examines the viability, cell population distribution and physical appearance of yeast cells immobilized within carrageenan gel beads over an extended period of continuous fermentation in a gas-lift bioreactor. Also examined over extended periods of time were the relative percentage of respiratory deficient yeast in the immobilized and freely suspended cell population of the bioreactor.

Carrageenan is made up of repeating 3-6-anhydrogalactose units and assorted carrageenans differ by the number and position of the sulfate ester groups on repeating galactose units. A schematic of the carrageenan gelation mechanism may be seen in FIG. 22. When carrageenan is in the sol state, its polysaccharide chains are in a random coil configuration. When enough helices have formed to provide cross-links for a continuous network, gelation occurs. As more helices are formed, or, as the helices form aggregates, the gel becomes stronger and more rigid (Rees, 1972).

The three common types of carrageenan are lambda, iota, and kappa. As illustrated in Figure 6.2, they differ in sulfate ester content and the amount of sulfate ester will affect the solubility of the polysaccharide chain. Lambda-carrageenan is highly sulfated and lacks the ability to form a gel (Marrs, 1998). Iota-carrageenan forms a highly elastic, weak gel in the presence of calcium ions, and does not show significant syneresis. Syneresis occurs when the tendency of the gel to further form helices or aggregates is so strong that the network contracts causing "weeping" of liquid (Rees, 1972). Kappa-carrageenan is moderately sulfated and thus forms a stronger and more rigid gel in the presence of potassium ions, and will undergo some syneresis. The increased gel strength afforded by kappa-carrageenan makes it desirable for immobilizing whole yeast cells.

¹ A version of section 6.0 has been published (Pilkington et al., 1999).

WO 02/102961

136

PCT/CA02/00970

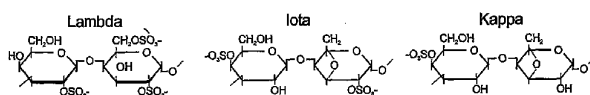


Figure 6.2. Chemical structures of lambda-, iota-, and kappa-carrageenans.

An important characteristic of carrageenan is its reversible thermogelation properties. As carrageenan solution is cooled, viscosity increases and gelation occurs. As the solution is heated, viscosity decreases and the carrageenan reverts back to the sol state. By controlling the composition of the gelling cation solution, the temperature at which carrageenan is transformed from a sol into a gel may be altered. Kappa-carrageenan gelling temperature increases with increasing potassium chloride concentration in solution. This phenomenon was used to engineer a process for cell immobilization, since severe temperature fluctuations can be avoided (Neufeld et al., 1996). The gelling temperature of the carrageenan can be controlled such that it is high enough to be a gel under fermentation conditions, yet low enough that the yeast cells may be mixed with the carrageenan in its sol state without detrimental effects on viability prior to bead gelification.

There are a number of factors, nevertheless, which indicate the need for further study on the effects of immobilization within gel matrices on yeast cell metabolism and physiology. Immobilized cells are not subjected to the same micro-environment as the free cells in the liquid phase because there are additional barriers from the gel matrix and other entrapped yeast cells which must be surmounted, before substrates can be transported to their surfaces (FIG. 23). There have been many studies on mass transfer rates within gel matrices (Estepé et al., 1992; Hannoun and Stephanopoulos, 1986; Korgel et al., 1992; Kurosawa et al., 1989; Merchant et al., 1987; Oyaas et al., 1995; Venâncio and Teixeira, 1997) to gain a better understanding of the potential negative effects that nutrient limitation to immobilized cells may have on fermentation performance. The effective diffusivities of small molecules within carrageenan gel are comparable with the diffusivities of the same molecules in water alone, and the gel allows molecular diffusion of small molecules, such as glucose and ethanol. However, in a typical immobilized cell fermentation, nutrients are rapidly transported to the immobilized cell beads mainly by convective transport in addition to molecular diffusion (Hannoun and Stephanopoulos, 1986). Once the nutrients enter the beads, transport is relatively slow because molecular diffusion dominates. This means the yeast cells at the periphery of the gel beads may have a distinct nutritional advantage over those in the center of the beads.

The age of the immobilized yeast must also be considered. Entrapped cells age as a continuous fermentation proceeds over the course of months and they ferment under a defined set of pseudo-steady-state conditions. However, during batch fermentation, yeast cells are exposed to an environment that changes with time and the cells are only reused for a limited number of fermentations before disposal. More research is needed to study the long-standing effects of continuous fermentation on yeast cell vitality, relating to fermentation performance.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

137

PCT/CA02/00970

In Part A of this chapter, the kinetics of yeast colonization in kappa-carrageenan gel beads were examined during three cycles of repeated batch fermentation. Viability and cell concentrations of immobilized and freely suspended yeast were monitored, along with ethanol, degree Plato, and sugar concentration.

In Part B, the effects of fermentation time on cell position and distribution within the gel bead and yeast cell morphology were examined. Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine kappa-carrageenan-immobilized yeast cells in different regions of the gel bead at four different times: 1) immediately after bead production; 2) after two days of batch fermentation; 3) after two months of continuous fermentation in a pilot scale gas lift bioreactor; 4) after six months of continuous fermentation in a pilot scale gas lift bioreactor. Yeast viability and concentration in both immobilized and liquid phase cells were also measured. Also examined was the relative percentage of respiratory deficient yeast (immobilized and free cells in the liquid phase) after five months of continuous fermentation in the gas lift bioreactor and this was compared with the percentages found in traditional batch beer fermentations. A production lager yeast strain was used throughout the study.

6.1 Experimental Procedure

Kappa-Carrageenan Gel Bead Production: kappa-carrageenan gel X-0909 was a generous gift from Copenhagen Pectin A/S. Kappa-carrageenan gel beads containing entrapped lager yeast cells were produced using the static mixer process with an initial cell loading of 2.6×10^7 cells/mL of gel (Patent Application 2133789 (Neufeld et al., 1996) and a bead diameter of 0.5 to 2.0 mm.

Fermentation Medium: Labatt Breweries of Canada supplied brewery wort with a specific gravity of 17.5°P as described in detail in the Materials and Methods section.

Part A: Repeated Batch Kinetics of Yeast Immobilized in Kappa-Carrageenan Gel Beads

Fermentations were conducted in 2 L Erlenmeyer flasks at 21°C, with shaking at 150 rpm. Carrier loading was 40% (v/v) of immobilized cell beads and the total fermentation volume was 1 L. Each fermentation was seven days in duration. In R1 fresh immobilized cell beads were pitched into wort and at the end of the fermentation these beads were separated from the fermented liquid by passing the mixture through a sterile stainless steel sieve (500 μ m mesh size). The beads were then repitched at the same proportion into fresh, sterile wort for a second (R2) and then third (R3) batch fermentation. Sampling was performed twice a day for the first three days, and then once per day for the fourth and fifth days of each fermentation. Fermentations were carried out in duplicate or triplicate. All fermentations were conducted with freely suspended cell control fermentations, which were conducted under the same conditions except that only free cells were pitched into the fermentations at a rate of 4 g/L. Samples were analyzed for free and immobilized cell viability and cell concentration, and liquid phase carbohydrate and ethanol concentrations.

Yield factors, $Y_{P/S}$, of product ethanol, from substrate total fermentable glucose, were calculated using equation 3.20 for the three immobilized cell fermentation cycles and the free cell control. For all fermentations the yield factors were calculated from the start of fermentation to the time that maltose consumption was complete.

Ethanol productivity, $V_{ethanol}$, the amount of ethanol produced per total bioreactor working volume per unit fermentation time was calculated using equation 3.25 for R1, R2 and R3, and the free cell control from the start of fermentation to the time that maltose consumption was complete. In the case of the yield factors and

WO 02/102961

138

PCT/CA02/00970

ethanol productivity, the contributions of the immobilized and freely suspended yeast cells were not distinguished from one another.

The local maximum specific growth rate, $\mu_{\max}$, and cell doubling time was calculated for the averaged free cell control using equations 3.3 and 3.4.

Part B: Viability and Morphological Characteristics of Immobilized Yeast over Extended Fermentation Time

Batch Fermentation Conditions: Batch fermentations were conducted in 2 L Erlenmeyer flasks at 21°C, with shaking at 150 rpm. Carrier loading was 40% (v/v) with a total fermentation volume of 1 L.

Continuous Fermentation Conditions: Pilot scale gas lift draft tube bioreactors were used for continuous fermentations. All data collected were from an 8 L working volume bioreactor, except the 2 month scanning electron micrographs, which were collected from a 50 L bioreactor using the same fermentation medium and immobilization method. Immobilized cell beads at 40% (v/v) were fluidized within the bioreactors using a mixture of air and carbon dioxide. The bioreactors were operated under varying conditions with fermentation temperatures controlled at 12, 17 and 22°C and residence times held between 0.9 and 1.8 days. The gas lift reactor reached a maximum ethanol concentration of 73 kg/m³ during the six-month experiment, with an average concentration of 58 kg/m³.

Microbiological Analyses: Samples were taken from the liquid phase of the gas lift bioreactor at least once a week to test for contaminants including wild yeast, non-lager yeast, and aerobic and anaerobic beer spoilage bacteria. After five months, the liquid phase yeast cells were assayed in duplicate for respiratory deficient mutation.

Scanning Electron Microscopy (SEM): Kappa-carrageenan gel beads (1.0 – 1.5 mm diameter) containing immobilized lager yeast cells were sampled for SEM examination at four different times: 1) after immobilized cell bead production and before inoculation of beads into the fermentation medium; 2) after 2 days in batch fermentation; 3) after 2 months of continuous fermentation in a pilot scale gas lift draft tube bioreactor; 4) after 6 months of continuous fermentation in a pilot scale gas lift draft tube bioreactor. The methodology for used for SEMs and the related sample preparation are described in section 4.7.

Using the methods described in section 4.6, yeast cell concentration and viability (immobilized and freely suspended) were assessed at the same times as the SEMs.

6.2 Results and Discussion

Part A: Repeated Batch Kinetics of Yeast Immobilized in Kappa-Carrageenan Gel Beads

Fermentation time was greatly reduced each time the immobilized cells were repitched into fresh wort, as seen in Figures 6.4 (a), (b), and (c) illustrating maltose, maltotriose, glucose, fructose and ethanol vs. fermentation time for the three repeated batch fermentation cycles. From these figures it can be seen that the time for complete sugar consumption was 64 hours for R1, 44 hours for R2, and 26 hours for R3. The freely suspended cell control fermentation which contained no immobilized cell beads, shown in Figure 6.5, took 82 hours for complete sugar consumption. One can also see from the graphs in Figure 6.4 that final ethanol concentrations were highest in the third of the three repeated batch immobilized cell fermentations. Because kappa-carrageenan is a hydro-gel, some ethanol is carried over in beads when they were repitched into fresh wort. Consequently at time zero for R2 and R3, some ethanol was present in the fermentation liquid and the initial concentration of glucose, maltose, maltotriose, and fructose was lower in the immobilized cell fermentations

WO 02/102961

139

PCT/CA02/00970

(Figure 6.4) compared with the free cell control fermentation, as seen in Figure 6.5. Thus, yield factors were calculated for the fermentations so that the yield, g ethanol production per g sugar consumed, can be examined on a comparable basis.

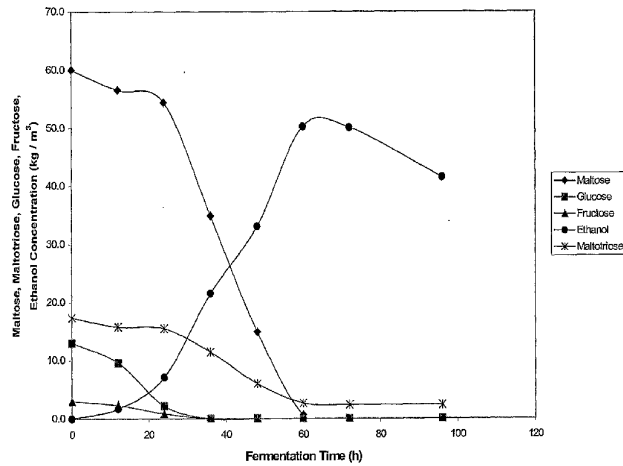


Figure 6.4. a) R1, maltose, maltotriose, glucose, fructose, and ethanol concentration versus fermentation time for repeated batch fermentations using lager yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads.

WO 02/102961

140

PCT/CA02/00970

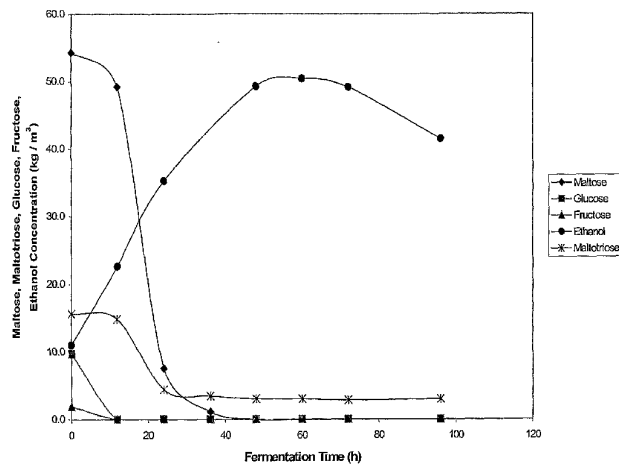


Figure 6.4. b) R2, maltose, maltotriose, glucose, fructose, and ethanol concentration versus fermentation time for repeated batch fermentations using lager yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads.

WO 02/102961

141

PCT/CA02/00970

19 AUG 2004 14:00:04

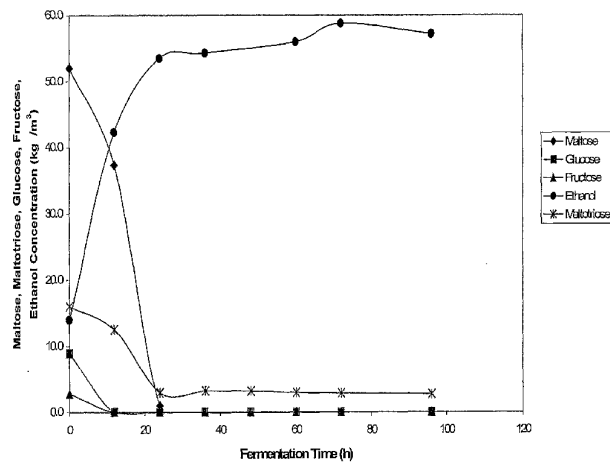


Figure 6.4. c) R3, maltose, maltotriose, glucose, fructose, and ethanol concentration versus fermentation time for repeated batch fermentations using lager yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads.

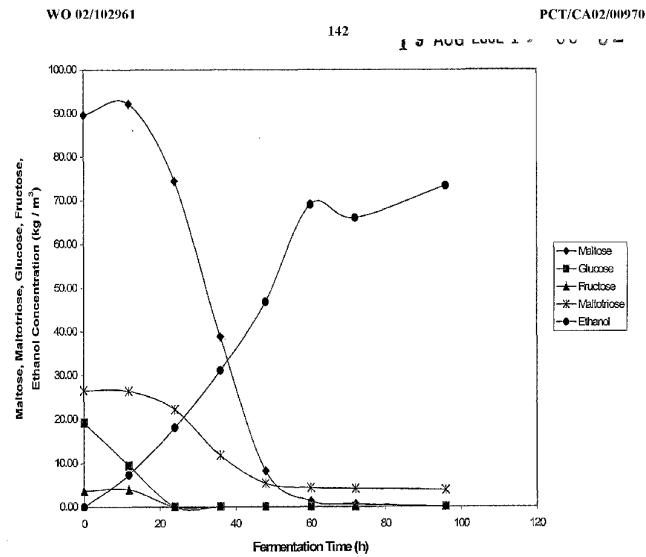


Figure 6.5. Maltose, maltotriose, glucose, fructose, and ethanol concentration versus fermentation time for freely suspended lager yeast control fermentations (no immobilized cells).

Figures 6.6 (a) and (b) compare maltose and ethanol concentrations respectively versus fermentation time of R1, R2, and R3. During repeated R1, maltose was taken up by the yeast cells almost immediately after pitching into fresh wort. Ethanol concentrations reached their peak earlier in repeated R1 and also reached higher concentrations than the first two batch fermentations. As shown in Figure 6.6 (b), the initial lag in ethanol production in R1 was drastically reduced when these immobilized cells were repitched in R2 and further reduced after repitching for R3.

WO 02/102961

143

PCT/CA02/00970

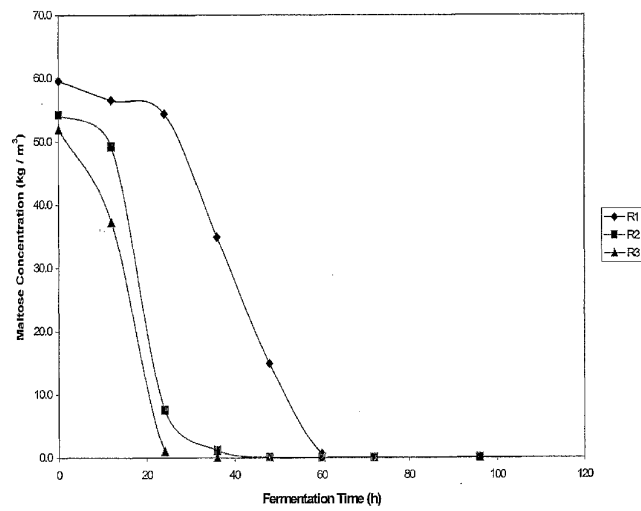


Figure 6.6. a) Maltose concentration versus fermentation time for repeated batch fermentations, R1, R2, and R3, using lager yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads.

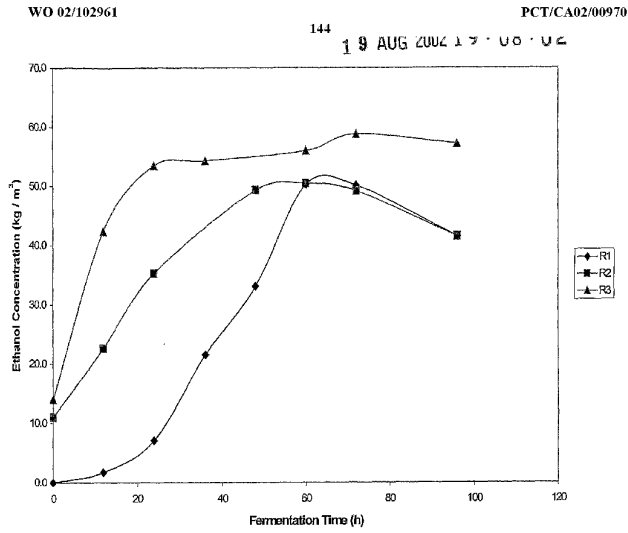


Figure 6.6. b) Ethanol concentration versus fermentation time for repeated batch fermentations, R1, R2, and R3 using lager yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads.

Figure 6.7 (a) shows immobilized cell concentration per total bioreactor volume vs. fermentation time for R1, R2 and R3. The free cells released from the immobilized cell matrix into the bulk liquid phase in these fermentations vs. time are shown in Figure 6.7 (b). In Figure 6.7 (c) the total of immobilized and free yeast cells per total reactor volume are shown for the three batches. Figure 6.7 (a) shows that the concentration of immobilized cells within the kappa-carrageenan gel continued to increase following their initial inoculation into wort for R1. When the beads were repitched into fresh wort for repeated R2, growth continued to occur within the gel beads. The third time that the encapsulated cells were repitched into fresh wort, the rate of increase in immobilized cell concentration had slowed. The concentration profile of free cells released from the kappa-carrageenan gel matrix into the bulk liquid phase, immobilized cells, and total cells in the fermentation for R1 is shown in Figure 6.8.

WO 02/102961

145

PCT/CA02/00970

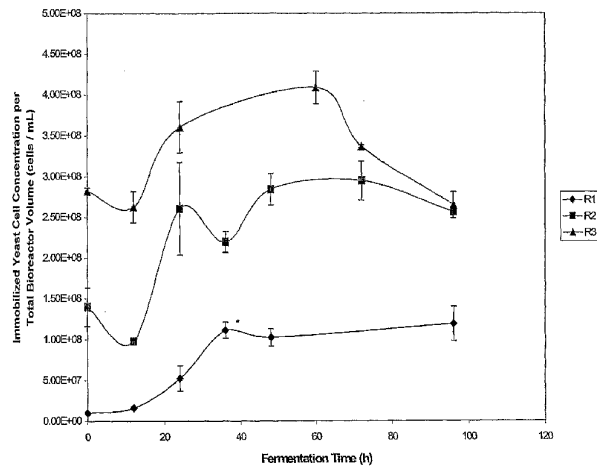


Figure 6.7. a) Immobilized lager yeast cell average concentration per total bioreactor volume versus fermentation time for R1, R2, and R3 fermentations. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data ($n = 2$).

WO 02/102961

146

PCT/CA02/00970

1 5 AUG 2004 1 7 00 00

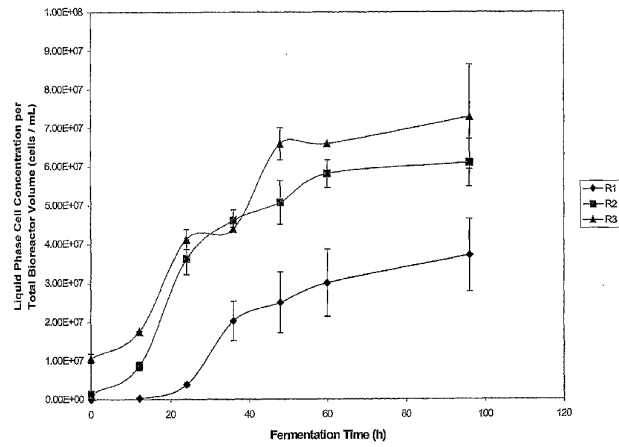


Figure 6.7. b) Concentration per total bioreactor volume of lager yeast cells released into bulk liquid phase versus fermentation time for R1, R2, and R3 fermentations. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

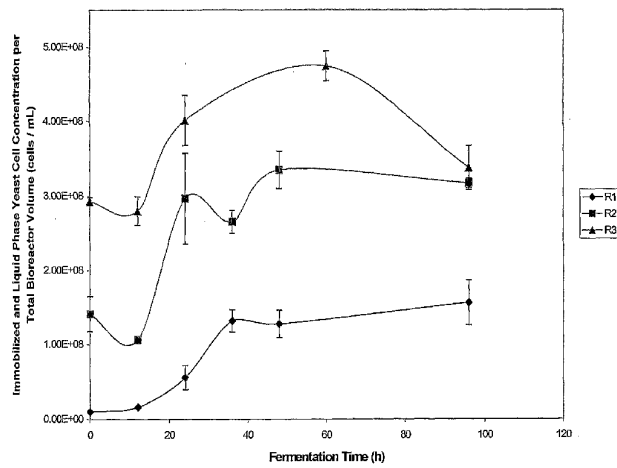


Figure 6.7. c) Total (immobilized and liquid phase) lager yeast cell concentration per total bioreactor volume versus fermentation time for R1, R2, and R3 fermentations. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

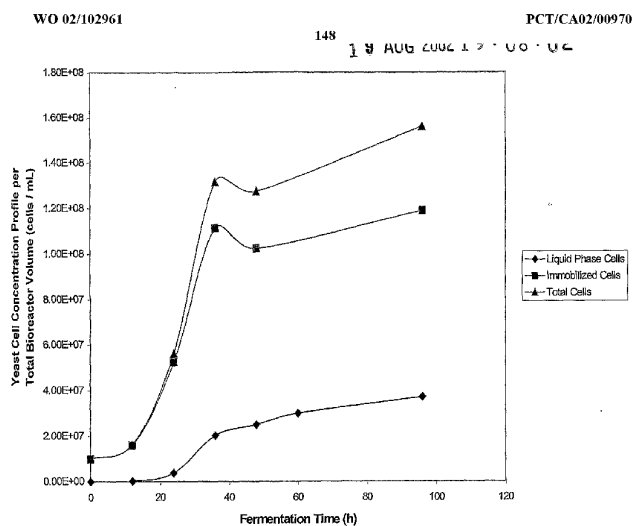


Figure 6.8. Profile of immobilized, liquid phase, and total (immobilized and liquid phase) cell concentration versus fermentation time for R1, the first of three repeated batch fermentations using lager yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads.

In R1, the immobilized cell concentration within the kappa-carrageenan gel bead was increasing at a similar rate to the control fermentation, which contained only liquid phase cells. This was confirmed by comparing the average growth curve of the free cell control fermentations in Figure 6.9 to the similar growth curve of cells immobilized in carrageenan in R1 in Figure 6.10. During R1, the gel beads were not yet fully colonized and the gel matrix did not appear to have an inhibitory effect on yeast cell growth within the beads. By R2, the matrix appeared to be restricting the growth of the cells within the gel bead, as indicated by a smaller increase of cell number during this fermentation cycle. This could be due to the nature of the gel or the crowding of the yeast cells within the beads, or to a lack of nutrient supply to the cells.

WO 02/102961

149

PCT/CA02/00970

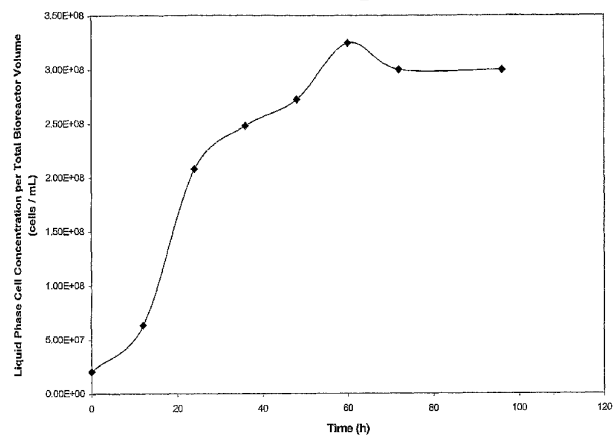


Figure 6.9. Control fermentation freely suspended lager yeast cell average concentration ($n = 3$) per total bioreactor volume versus fermentation time. No immobilized cells were present during these fermentations.

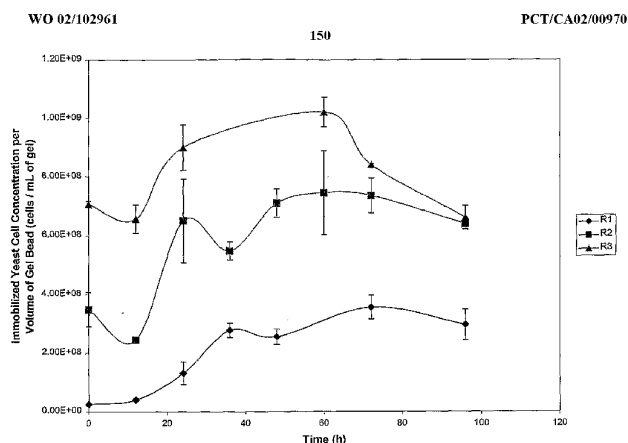


Figure 6.10. Immobilized lager yeast concentration per mL of gel beads versus fermentation time for R1, R2, and R3 fermentations. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data ($n = 2$).

In Table 6.1, the yields of ethanol from substrate fermentable sugars, $Y_{P/S}$, are shown for the three batch generations and the control. In Table 6.2, the bioreactor volumetric productivities of ethanol are also given, calculated using the data given in Table 6.1. The yields of ethanol from sugars for the fermentations were not significantly different from each other or from the control. Yields were all above 90% of the theoretical yield of 0.51 predicted from the Guy-Lussac equation. As mentioned earlier, biomass production and other by-products formed by the yeast cells prevent efficiencies from reaching higher than 95% of theoretical (Hardwick, 1995). The volumetric bioreactor productivity of ethanol in the three repeated batch fermentations varied significantly from batch to repeated batch. Ethanol productivity increased with each cycle of repeated batch fermentation and, by R3, the immobilized cells were more productive than the control fermentation. The total amount of ethanol produced in R2 was not significantly greater than that produced during R1, but the fermentation time was less than half of R1 and of the control fermentation. There are many factors that could contribute to this increased fermentation rate of immobilized cells with each batch repetition, such as yeast cell adaptation to the fermentation conditions and the progressively increasing cell concentration. The total number of cells per bioreactor volume only becomes significantly greater than that of the control by R3. In Figure 6.7 (b), the graph of freely suspended cell (released from the gel matrix) concentration in the bulk liquid vs. fermentation time demonstrated that the number of cells released from the gel beads increased with each batch generation. Once the beads became more fully loaded with yeast cells, they appeared to release more cells into the bulk liquid phase. Hüskens et al. (1996) conducted studies that examined bacterial cell colony expansion and eruption/release from kappa-carrageenan gel slabs. Vives et al. (1993) have reported that the maximum

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

151

concentration of yeast cells they have achieved in kappa-carrageenan gel beads was 10^8 cells per gram of gel, which is the concentration that was reached within the gel particles by R2. Similar maximum cell concentrations were found during the continuous fermentations in Part B. However, maximum cell loadings in the gel matrix will depend upon the initial cell loading, the composition of the gel and other factors.

Table 6.1. Yield, Y_{ps} , of product, P, ethanol from substrates, glucose (Glc), fructose (Frc), maltose (Mal) and maltotriose (DP3) for R1, R2, R3, and freely suspended cell control fermentation.

Batch	t_f^*	t_0	Glc _f	Frc _f	Mal _f	DP3 _f	P _f	Glc ₀	Frc ₀	Mal ₀	DP3 ₀	P ₀	Y_{ps}
Fermentation	(h)		(kg / m ³)										
R1	64.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	50.1	13.0	3.0	60.0	17.4	0.0	0.5
R2	44.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	49.0	9.7	2.0	54.3	15.7	11.0	0.5
R3	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	54.0	8.9	2.8	52.0	16.0	14.0	0.5
Free Cell Ctrl	82.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	66.0	19.5	3.6	91.2	27.3	0.0	0.5

*The symbol t_f is the time in hours to complete maltose uptake and the subscript f refers to the concentration of the given analyte at time, $t = t_f$.

Table 6.2. Bioreactor productivity of ethanol [$V_{ethanol} = (\text{kg ethanol produced}) / (\text{m}^3 \text{ bioreactor volume} \cdot \text{h})$] for immobilized cell batch fermentations (R1, R2, and R3) compared with freely suspended cell batch fermentations.

Fermentation	$V_{ethanol}$ (kg / m ³ · hr)*
R1	0.470
R2	0.668
R3	1.246
Free Cell Control	0.805

* calculated when maltose uptake complete.

Another factor affecting the increased bioreactor volumetric productivity observed with each repeated batch fermentation, involves yeast cell adaptation. By the end of the first fermentation, yeast cells had adapted their metabolic machinery to the given fermentation conditions. This may result in a decrease in the lag phase at the beginning of subsequent batch fermentations, increasing the rate of fermentation. During this study all control fermentations were carried out with freshly prepared lager yeast. It would be interesting to repitch the freely suspended control yeast alongside the repitched immobilized cells to further examine this effect relative to the cell concentration effects.

Figure 6.11 indicates that immobilized cell viability, using the methylene blue method as an indicator, was low (< 50%) when the immobilized cells were initially pitched into wort in R1, but the viability of immobilized cells was above 90% after 48 hours of fermentation. The yeast cells rapidly colonized the beads, and viability remained high throughout R3. However by repeated R3, viability tapered off slightly toward the end of the fermentation. However, throughout all three repeated batch fermentations, the free cells that were released into the bulk liquid medium had higher viability than their immobilized counterparts. The immobilization matrix may have a negative effect on yeast cell viability (mass transfer limitations and/or spatial limitations), or viable yeast cells may be preferentially released from the immobilization matrix into the bulk liquid medium over non-viable cells.

Using the averaged data from three separate freely suspended yeast control fermentations contained in Appendix 1, a plot of $\ln(X/X_0)$ versus fermentation time, is given in Figure 6.12. The slope is equal to the local maximum specific growth rate of the cells at 21°C in brewer's wort, with shaking at 150 rpm. The local maximum specific growth rate of the yeast was found to be 0.096 hr^{-1} and the cell doubling time was 7.22 hours. The $\square_{\text{max}}$ found in this work was defined as a local $\square_{\text{max}}$ because, as mentioned in the Theory section, the true $\square_{\text{max}}$ used in the Monod equation is achievable only when S is significantly greater than the Monod constant, K_s . More work is required to evaluate the Monod constant, K_s , of the limiting substrate in these fermentations, in order to confirm that the calculated local $\square_{\text{max}}$ was a true maximum, as defined by the Monod equation.

WO 02/102961

154

PCT/CA02/00970

1 8 AUG 2002 1 9 : 08 : 02

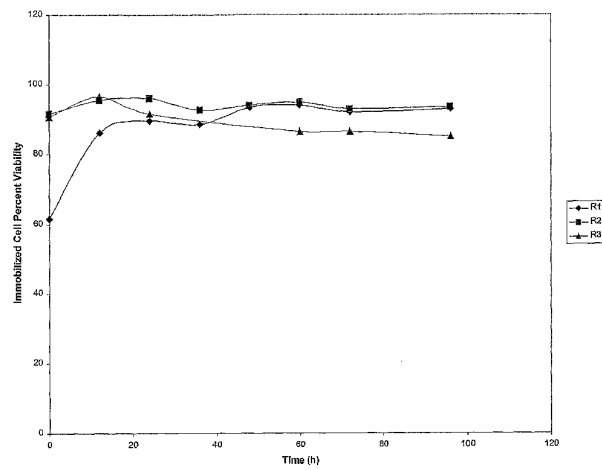


Figure 6.11. Immobilized lager yeast cell viability (methylene blue) versus fermentation time for R1, R2, and R3 fermentations.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

155

1 7 AUG 2004 1 7 00 00

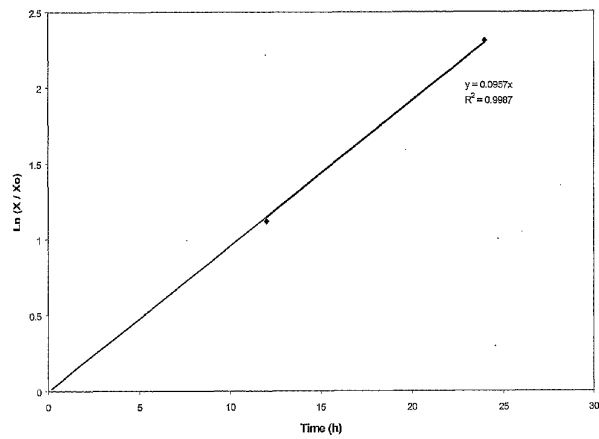


Figure 6.12. $\ln(X/X_0)$ versus batch fermentation time during the exponential growth phase of the averaged freely suspended yeast control fermentations, where X is the cell concentration at time, t , and X_0 is the cell concentration at time, $t = 0$ ($n = 3$).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

156

PCT/CA02/00970

Part B: Viability and Morphological Characteristics of Immobilized Yeast Over Extended Fermentation Time
 Before the gel beads were exposed to fermentation medium, and following immobilized cell bead production using the static mixer process, the cell concentration was 2.6×10^7 cells/mL of gel bead (Table 6.3, where values are the averages of two samples). SEM imaging shows the cells to be individually and uniformly distributed throughout the gel bead (FIG. 24).

Table 6.3. Viability (methylene blue) and concentration of freely suspended and immobilized lager yeast cells entrapped in kappa-carrageenan gel beads over fermentation time.

Time	Fermentation Mode	Freely Suspended Yeast In Liquid Phase		Immobilized Yeast in Gel Phase	
		Viability (%)	Cell Conc. (cells/mL in liquid)	Viability (%)	Cell Conc. (cells/mL of gel)
0	n/a	n/a	n/a	n/a	$2.6E+07$
2 days	Batch	98	$5.5E+07$	92	$2.35E+08$
2 months	Continuous	93	$2.35E+08$	76	$8.60E+08$
6 months	Continuous	92	$2.11E+08$	<50*	$1.40E+09^*$

*Based on single sample.

Viability was >90% following 2 days of batch fermentation, and cell concentration within the gel bead had increased ten-fold (Table 6.3). Cells (>90% viable) had also begun to be released from the gel into the bulk liquid phase of the fermentation, yielding a concentration of 10^7 cells/mL of liquid. Small yeast colonies formed inside the gel beads, with many bud scars present on individual cells as seen in FIG. 25.

Immobilized yeast cell viability decreased after 2 months of continuous fermentation in a gas lift bioreactor (Table 6.3), but the cells in the bulk liquid phase remained highly viable (>90%), and this finding was supported during several different continuous fermentations in pilot scale gas lift bioreactors. The SEM in FIG. 26 showed that at two months large colonies of yeast had formed toward the periphery of the bead, confirming the results of other researchers (Bancel and Hu, 1996; Gödia et al., 1987; Wada et al., 1979; Wang et al., 1982). A comparison of the morphology of yeast positioned toward the outer edge of an immobilized cell bead to the yeast positioned at the center of a gel bead was made in several samples using SEM imaging. The cells located toward the periphery of the beads were ovoid and smooth with many bud scars (FIG. 27), indicative of yeast multiplication (Smart, 1995). The cells that were imaged at the center of the bead (FIG. 28) appeared malformed and displayed little evidence of bud scar formation. The lack of bud scars may be an indication of possible limitation of nutrients, such as oxygen, at the center of the beads. The surface irregularity observed on the surface of the yeast in FIG. 28, may also be an indicator of cell aging (Barker and Smart, 1996; Smart, 1999).

The viability of the yeast immobilized within the carrageenan gel had dropped to below 50% after six months of continuous fermentation in the gas lift bioreactor, (Table 6.3). It should be noted that while only a single data point for immobilized cell concentration and viability was collected at six months, data at the five-month mark was similar, with an immobilized cell concentration of 1.14×10^9 cells/mL of gel and viability of <50%. While a gradual decline in immobilized cell viability was seen over time, the viability of the cells in the bulk liquid

WO 02/102961

157

PCT/CA02/00970

phase remained reliably high. In addition, even though immobilized cell viabilities were low in the beads as a whole, the bioreactor produced a fully fermented beer during its sixth month of continuous operation. Possible reasons for this finding include the significant contribution of the highly viable freely suspended yeast cells to the fermentation. As well, there is the potential contribution of viable immobilized cells located at the periphery of the gel bead where there are fewer barriers to mass transfer, as compared to the cells located at the center of the bead. It is unclear whether the immobilized cells had the ability to redistribute themselves within the gel matrix, or if these cells remained stationary where they were first located. A concentration of 10^3 cells/mL of gel bead was the maximum reached within these beads over the six-month period of continuous fermentation.

In FIG. 29 an entire bead was imaged using SEM. This bead had a hollow center and, of the many beads examined, approximately half exhibited this structure. The hollow cavity could be a result of the carrageenan gel structure degradation and promoted further by the SEM preparation. This hollow cavity was not observed in fresh bead preparations. Previous work by others (Bancel et al., 1996) has shown that growing cells induced weakening of the gel network. Audet et al. (1988) reported that the addition of locust bean gum to kappa-carrageenan modified the mechanical strength of gel beads for the immobilization of bacteria.

Over the entire six month beer fermentation experiment, the gas lift bioreactor was tested a minimum of once a week for contamination. No bacterial contaminants were detected at any time during the experiment. In the last two months of the trial, a contaminating yeast was detected in concentrations which fluctuated between 1 and 5 cfu/mL. This yeast was capable of growth on PYN medium at 37°C, but did not grow aerobically or anaerobically on DUBA medium (selective for bacteria), did not ferment dextrins, and showed no growth on CuSO₄ medium (selective for wild yeast).

After five months, the average percentage of respiratory deficient yeast cells was 7%, which is higher than what is normally found using this strain during industrial batch fermentations (2% average). Other researchers have reported similar findings (Norton and D'Amore, 1995). Respiratory deficient yeast result from a mutation which causes yeast to be incapable of respiring glucose to carbon dioxide and water. These yeast have mitochondria with permanently impaired activity and arise usually because of a mutation of mitochondrial DNA (Hardwick, 1995).

Artifacts from SEM sample preparation can cause confusion. Technologies such as nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Fernandez, 1996) and confocal microscopy (Bancel and Hu, 1996) have been used to examine immobilized cells non-invasively. NMR imaging techniques have allowed researchers to study transport, flow and spatial distribution of cells and biochemicals in biofilms. Researchers (Bancel and Hu, 1996) have also shown that confocal laser scanning microscopy can be used to observe cells immobilized in porous gelatin microcarriers through serial optical sectioning.

Although methylene blue is used as a standard indicator of cell viability in the brewing industry the method has many shortcomings (Mochaba et al., 1998). It measures whether a yeast population is viable or non-viable based on the ability of viable cells to oxidize the dye to its colourless form. Non-viable cells lack the ability to oxidize the stain and therefore remain blue (O'Connor-Cox et al., 1997). Plate count and slide culture techniques are based on the ability of the cells to grow and produce macrocolonies on agar plates or microcolonies on media covered microscope slides (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Ongoing work of examining the viability of yeast in immobilized matrices over extended periods of time at Labatt now uses, not only methylene blue, but also the aforementioned methods as well as developing

WO 02/102961

158

PCT/CA02/00970

the confocal microscopy technique using vital staining. In addition to measuring the viability of the cells, the issue of "vitality" of the immobilized cells must also be addressed in future work. Where viability has been used to describe the ability of cells to grow and reproduce, vitality measures yeast fermentation performance, activity, or the ability of the yeast to recover from stress (Smart et al., 1999).

CHAPTER 7. FLAVOUR PRODUCTION IN A GAS-LIFT CONTINUOUS BEER FERMENTATION SYSTEM

7.1 Experimental Procedure

Using continuous fermentation to produce beer is very different from other applications using immobilized cells because the resulting product is not measured in terms of one component of interest such as ethanol. Rather, it is a balance of numerous chemical compounds which must be balanced to make a quality finished product. The effects of oxygen on yeast flavour metabolites during continuous primary fermentation and during a secondary batch holding period were examined. The effect of residence time on flavour metabolites was also examined at two levels. Lastly, a commercial enzyme preparation of alpha-acetolactate decarboxylase was added to the continuous fermentation wort supply and liquid phase total diacetyl concentration was monitored.

7.1.1 Effect of Relative Amounts of Air in the Bioreactor Fluidizing Gas on Yeast Metabolites during Primary Continuous Fermentation

The amount of air and hence oxygen in the bioreactor fluidizing gas was varied while residence time, temperature and all other controllable process variables were held constant. The total volumetric flow rate of gas was held constant at 472 mL/min at STP, temperature was 15°C, and kappa-carrageenan gel beads containing immobilized LCC 3021 yeast were used throughout the trial with an initial cell loading of 1×10^8 cells/mL of gel. Four different volumetric flow rates of air were imposed on the system throughout the trial (Table 7.1), and the average bioreactor residence time, R_0 , was 1.18 days.

Table 7.1. Air volumetric flow rates supplied to the bioreactor through the sparger during continuous fermentation. The total volumetric flow rate supplied to the bioreactor was 472 mL/min at STP, with carbon dioxide making up the remainder of the gas.

Air Volumetric Flow Rate (mL/min)	Percent Air in the Fluidizing Gas (% v/v)	Start (Day)	Finish (Day)	Total Time (Days)
94	19.9	10	26	17
354	75.0	27	40	14
34	7.2	41	58	18
0	0	59	66	8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

159

PCT/CA02/00970

The following analyses were performed repeatedly throughout the experiment: free amino nitrogen (FAN), total fermentable carbohydrate (as glucose), ethanol, total total diacetyl, beer volatiles (selected esters and alcohols), and liquid phase yeast cell concentration and viability. The bioreactor was also tested for contamination a minimum of once a week.

The dissolved oxygen concentration in the bulk liquid phase of the bioreactor was measured when the continuous fermentation was assumed to be at pseudo-steady state for each volumetric flow rate of air (minimum of three reactor turn-over times).

7.1.2 Post Fermentation Batch Holding Period: Effects of Oxygen Exposure on Yeast Metabolites

Even when the amount of oxygen in the bioreactor fluidizing gas was relatively low (34 mL/min at STP), the concentrations of acetaldehyde and total diacetyl found during the experiment conducted in section 7.1.2, were unacceptable high for the North American lager beer market. Therefore a novel approach was taken, where liquid taken from the continuous primary bioreactor was held in batch for 48 hours at a slightly elevated temperature of 21°C to reduce the concentration of these two compounds. As well, the results from the previous section 7.1.2 indicated the significant effect that the amount of air in the fluidizing gas had on the flavour compounds measured. Therefore the effect on yeast flavour metabolites of aerobic versus anaerobic conditions downstream of the primary fermentation, where the secondary batch hold occurred, was examined. Continuous primary fermentation was performed in a 50 L gas lift bioreactor using a highly flocculent variant of the LCC3021 yeast strain for this trial because the sample volume requirement for the study was too large relative to the volume of the 8 L bioreactor. Operating conditions were 1180 mL/min CO₂ and 189 mL/min air at STP in the fluidizing gas, an average bioreactor residence time, R_o , of 1.0 day, a temperature of 15 °C, and high-gravity 17.5°P lager brewer's wort.

A total of 4 samples were taken (100 mL crimp vials), with two handled under anaerobic conditions and the other two were exposed to the aerobic environment.

The anaerobic sampling procedure was as follows: two 100 mL crimp vials and six 25 mL crimp vials were autoclaved and then placed in an anaerobic box (Labmaster 100, mbraun, USA) with argon as the purging gas. The 100 mL vials were allowed to equilibrate for 45 minutes and then they were sealed using aluminum caps and Teflon® septa. A 50 mL syringe, fitted with a 3 inch, 16 gauge needle, sanitized using a 70% (v/v) ethanol solution, was used to withdraw sample from the bioreactor by puncturing the septum of the membrane of the sample valve and the sample was injected into the 100 mL pre-purged anaerobic vials. It was necessary to provide a vent to the crimp vial, through an additional sterile syringe needle, to allow release of the pressure within the vial during filling. The aerobic samples were exposed to the atmosphere as they were drained from the bioreactor by fully opening the membrane sample valve into the 100 mL unsealed sample vials, without using a syringe and needle.

The sample liquid was allowed to rest at room temperature for 2 hours in order to allow the yeast to settle out of solution, leaving a cell concentration in the bulk liquid of approximately 10⁶ cells/mL. Once settled, the liquid from each 100 mL vial was decanted into three 25 mL vials. The anaerobic samples were handled in an anaerobic box in order to minimize oxygen pickup while the aerobic samples were processed under the laminar flow hood. Each of the samples in the 100 mL vials were split into 3 smaller 25 mL vials, so that sample

WO 02/102961

160

PCT/CA02/00970

analyses could be performed without altering the course of the fermentation due to sample removal. Once the aerobic samples were transferred to the smaller vials they were incubated, uncapped at 21°C. The anaerobic samples were transferred to the three smaller vials and sealed using an aluminum cap and Teflon® septa. In order to avoid pressure buildup due to carbon dioxide evolution within the vials, while preventing exposure of the samples to the aerobic external environment, the septa were punctured with a needle. The end of the needle exposed to the external environment was submerged in ethanol (less than 1 cm of pressure head), preventing any back-flow of air into the sample. Samples were collected for analysis at 2, 24, and 48 hours. A sample was also taken directly from the bioreactor and analyzed immediately in order to assess the state of the fermentation within the bioreactor at the time of the protocol. The samples were analyzed for total fermentable carbohydrate (as glucose), ethanol, total diacetyl, and beer volatiles (selected esters and alcohols).

7.1.3 Effect of Liquid Residence Time on Yeast Metabolites during Continuous Primary Beer Fermentation

In order to examine the effect of liquid residence time on yeast metabolic activity, an experiment was performed in which a step change in wort volumetric flow rate to the bioreactor was imposed during continuous primary beer fermentation using LCC3021 yeast cells immobilized in kappa-carrageenan gel beads. The bioreactor temperature was held constant at 17°C throughout the trial. The gas volumetric flow rate supplied to the bioreactor was also constant at 472 mL/min at STP. The gas was a mixture of air (11 mL/min at STP) and carbon dioxide (461 mL/min at STP). The initial concentration of yeast cells in the kappa-carrageenan gel was 2.6×10^7 cells/mL of gel bead and the bioreactor contained 40% (v/v) of beads. The following analyses were performed repeatedly throughout the trial: carbohydrates, free amino nitrogen (FAN), total fermentable carbohydrate (as glucose), ethanol, total diacetyl, beer volatiles (selected esters and alcohols), and liquid phase yeast cell concentration and viability. The bioreactor was also tested for contamination, a minimum of once a week.

7.1.4 Using a Commercial Preparation of Alpha-Acetolactate Decarboxylase to Reduce Total Diacetyl during Continuous Primary Beer Fermentation

High diacetyl concentrations are considered by most North American brewers to be an undesirable flavour defect in their beer. In the continuous primary fermentations performed to date, total diacetyl concentrations have consistently been above the threshold levels for traditional batch fermentations (70 – 150 µg/L) in a North American lager. During batch fermentation, diacetyl is reduced during the later stages of fermentation, when oxygen is no longer present and additional sugars are not being introduced. In the continuous fermentation system a constant low level of oxygen is supplied to the bioreactor through a sparger, and fresh wort is continuously supplied to the bioreactor. Therefore, a novel strategy using a commercial enzyme preparation was explored to control diacetyl concentration in the continuous bioreactor. In a wort fermentation diacetyl is formed when alpha-acetolactate, an intermediate in the synthesis of valine, is oxidatively decarboxylated outside the yeast cell. The yeast cell then reabsorbs diacetyl and converts it into the less flavour-active acetoin. This oxidative decarboxylation of alpha-acetolactate to diacetyl is rate-limiting in batch wort fermentations. During the continuous fermentations, total diacetyl exited the bioreactor at

WO 02/102961

161

PCT/CA02/00970

unacceptably high concentrations (300-400 $\mu\text{g/L}$). The commercial enzyme alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC), from Novo-Nordisk A/S can convert alpha-acetolactate directly into acetoin, thus avoiding the unwanted diacetyl intermediate (Figure 7.1) (Jepsen, 1993).

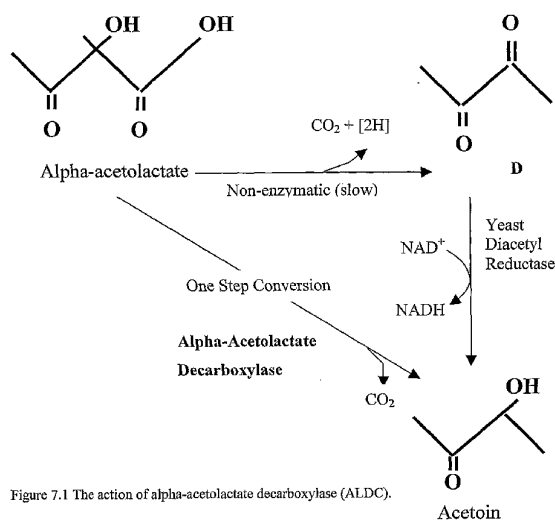


Figure 7.1 The action of alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC).

Alpha-acetolactate decarboxylase was added to the wort fed into the bioreactor in order to examine its net effect on total diacetyl concentration. Other strategies for reducing diacetyl, including a batch warm hold period of 48 hours post-fermentation and immobilized secondary fermentation systems, technology from Alpha-Laval (Anon, 1997), were also explored. Both of these other strategies have shown success in reducing diacetyl levels post fermentation, but neither addresses the level of diacetyl at the source (i.e. at the bioreactor outlet). By using ALDC in the wort to reduce the diacetyl concentration coming out of the bioreactor, the post-fermentation treatment periods could be minimized or eliminated.

ALDC activity is optimal at pH 6.0 in lager wort at 10°C. At pH 5.0, typical of industrial worts, ALDC activity is maximized at a temperature of 35°C (Anon, 1994). Thus under typical beer fermentation conditions of reduced temperature and pH, ALDC activity is less than optimal.

Health Canada in 1997 amended Canada's Food and Drug Regulations (SOR/97-81) to allow the use of ALDC in alcoholic beverages, which has opened the door for its use in Canadian breweries. *Bacillus subtilis*, carrying

WO 02/102961

162

PCT/CA02/00970

the gene coding for ALDC (E.C. 4.1.1.15) from *Bacillus brevis*, produces the enzyme ALDC. Because ALDC is an enzyme that is produced by a genetically modified organism (GMO), there are public perception issues that would need to be addressed before using such an enzyme in a commercial product.

Lager yeast, LCC3021, was used for these experiments. High gravity, 17.5°P, lager brewer's wort was supplied by the Labatt London brewery. Ethanol, total fermentable carbohydrate (as glucose), total diacetyl, and liquid phase cell concentration were monitored. Yeast cells were immobilized in kappa-carrageenan gel beads as described in the Chapter 4. The bioreactor was allowed three turnover times, before it was assumed to have reached pseudo-steady state. As mentioned earlier, the diacetyl method used in this work is referred to as "total diacetyl" because the method measures the amount of diacetyl and its precursor, alpha-acetolactate. Thus an observed reduction in total diacetyl during this experiment would be due to the combined effect of the enzyme converting alpha-acetolactate directly into acetoin and the subsequent lowered concentration of its derivative, diacetyl.

Alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC) was supplied as a generous gift for laboratory purposes from Novo Nordisk A/S, Denmark as Maturex® L. The activity of the enzyme was 1500 ADU/g, where ADU is the amount of enzyme which under standard conditions, by decarboxylation of alpha-acetolactate, produces 1 µmole of acetoin per minute as described in Novo Nordisk Method AF27 (Anon, 1994).

Continuous Fermentation Conditions: Continuous fermentations were performed in the 8 L gas lift draft tube bioreactor pitched at 40% (v/v) with kappa-carrageenan gel beads containing immobilized lager yeast cells. The bioreactor was sparged with a mixture of carbon dioxide (438 mL/min at STP) and air (34 mL/min at STP). Fermentation temperature was controlled at 15°C throughout the trials and the bioreactor residence time, R_b , was 1.5 days. Total diacetyl concentration was monitored under these conditions and an average pseudo-steady state control diacetyl concentration was reached. ALDC was then added to the wort at a concentration of 72 □g/L (108 ADU/L) and total diacetyl concentration in the bioreactor was monitored for a response.

Experiment 1: Wort was collected from the brewhouse into a 20 L stainless steel vessel, and heated in an autoclave for 45 minutes at 100°C. The wort was held at 2°C in a controlled temperature water bath while feeding the bioreactor. Once a pseudo-steady state total diacetyl concentration had been reached within the bioreactor, 72 □g/L (108 ADU/L) of ALDC was added to the wort inside the 20 L vessel. The initial biomass loading in the kappa-carrageenan gel beads was 3×10^7 cells/mL of gel.

Experiment 2: In order to minimize the risk of contamination, the system was closed loop at the outlet and other upgrades were also made to the system as described in Chapter 4. As with Experiment 1, wort was collected from the brewhouse into a 20 L stainless steel vessel, and autoclaved for 45 minutes at 100°C. While feeding the bioreactor, the wort was held at 2°C in a controlled temperature water bath. The initial biomass loading in the kappa-carrageenan gel beads was 3×10^7 cells/mL of gel. Once a pseudo-steady state total diacetyl concentration had been reached within the bioreactor, 72 □g/L (108 ADU/L) of ALDC was added to the wort inside the 20 L vessel.

Experiment 3: Unoxygenated 17.5°P brewery wort (14 hL) was collected into a large wort storage vessel (T-1) in the Pilot Plant. It was then flash pasteurized and stored with carbon dioxide sparging in order to maintain a constant dissolved oxygen concentration of <0.10 mg/L, as described in Chapter 5. The wort was fed into the bioreactor from this tank until a pseudo-steady state total diacetyl concentration was reached. ALDC (72 □g/L) was then aseptically added to the wort for the remainder of the trial. The addition of ALDC was accomplished

WO 02/102961

163

PCT/CA02/00970

by measuring the amount of wort remaining in the storage vessel and calculating the amount of ALDC needed to bring the concentration of enzyme up to the target concentration of 72 $\square$ g/L (108 ADU/L). The appropriate amount of enzyme was then dissolved in 10 L of sterile wort. This solution was transferred to a 20 L stainless steel pressure vessel, which was connected via sterile tubing to the sample port on the wort holding vessel (T-1). The ALDC solution was then pushed using sterile carbon dioxide pressure into the wort holding vessel. In order to ensure that the ALDC solution was adequately mixed with the wort in the holding vessel, the flow rate of carbon dioxide sparged into the tank was increased to 4720 mL/min at STP for 1 hour and then returned to its normal flow rate. The storage tank then held enough ALDC dosed wort to complete the trial. The initial biomass loading in the kappa-carrageenan gel beads was 10^5 cells/mL of gel.

7.2 Results and Discussion

7.2.1 Effect of Relative Amounts of Air in the Bioreactor Fluidizing Gas on Yeast Metabolites during Primary Continuous Fermentation

In Figures 7.2 - 7.11 liquid phase yeast viability and cell concentration, free amino nitrogen (FAN), total fermentable carbohydrate (as glucose), ethanol, total diacetyl, acetaldehyde, ethyl acetate, 1-propanol, isobutanol, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, and ethyl octanoate concentrations are plotted versus continuous fermentation time. All bioreactor operating conditions were held constant throughout the protocol except the percentage of air in the bioreactor sparging gas, which is marked directly on the figures. In Table 7.2 the averages for each analyte at pseudo-steady state (after a minimum of three reactor turnover times) are summarized.

Table 7.2. Summary table of effect of air volumetric flow rate to the bioreactor through the sparger on liquid phase yeast and key yeast metabolite concentrations in the bioreactor at a residence time, R_R , of 1.18 days, averages at pseudo-steady state.

Average* Analyte Concentration	Air Volumetric Flow Rate (mL/min)		
	94	354	34
Cell Conc (cells/mL)	3.87E+08	2.98E+08	4.73E+08
Total Ferm. Glucose (g/100 mL)	1.36	1.25	2.07
FAN (mg/L)	196.9	171.7	162.8
Ethanol (g/100 mL)	6.14	5.46	5.74
Total diacetyl (ug/L)	346	1417	389
Acetaldehyde (mg/L)	75.62	329.48	28.63
Ethyl Acetate (mg/L)	22.38	21.13	18.01
1-Propanol (mg/L)	44.74	50.89	53.04
Isobutanol (mg/L)	8.73	16.09	8.05
Isoamyl Acetate (mg/L)	0.38	0.21	0.30
Isoamyl Alcohol (mg/L)	58.62	61.64	59.16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

164

PCT/CA02/00970

Average* Analyte	Air Volumetric Flow Rate (mL/min)		
Ethyl Hexanoate (mg/L)	0.060	0.030	0.053
Ethyl Octanoate (mg/L)	0.031	0.013	0.025

*average of final four days of each operating condition

Figures 7.2 and 7.3 show that the liquid phase yeast population did not reach zero during this experiment. The flavour compounds that were studied in this work were produced by a combination of free and immobilized yeast cells and the relative contributions from each source were not determined. There was more than one source of freely suspended yeast cells in this work: biomass growth and cells that were released from the gel beads into the bulk liquid medium. Research has shown with compound models of cell release and growth, that when cells are being released from biofilms, even if the bioreactor is operated high dilution rates, there will still be a population of cells in the output liquid (Karamanev, 1991).

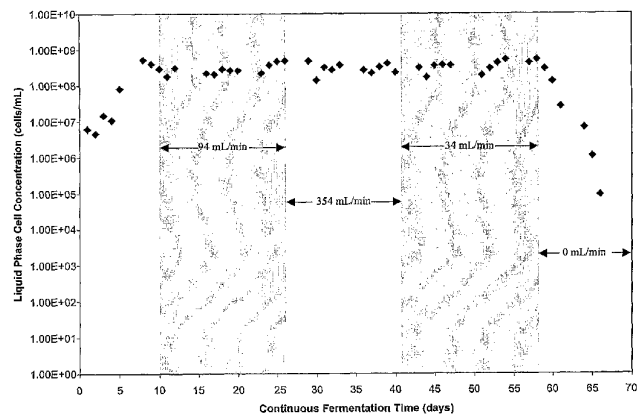


Figure 7.2. Liquid phase yeast cell concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

165

PCT/CA02/00970

19 AUG 2002 14:08:04

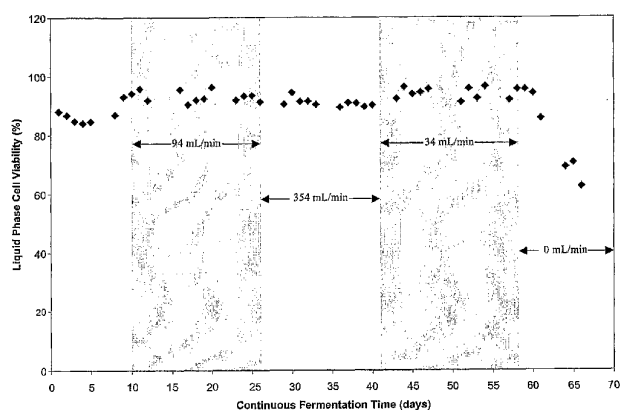


Figure 7.3. Liquid phase yeast viability versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

In Figure 7.4 the liquid phase concentration of free amino nitrogen (FAN) was tracked. It was interesting to note that the minimum FAN concentrations occurred at 34 mL/min at STP of air. This did not coincide with maximum ethanol concentration or minimum total fermentable carbohydrate (as glucose) concentrations. The ethanol concentration within the bioreactor liquid phase decreased, while total fermentable carbohydrate (as glucose) increased when the volumetric flow rate of air in the sparge gas was increased from 94 to 354 mL/min, as seen in Figure 7.5. This may indicate that more cell respiration, as opposed to fermentation, was occurring due to the increase in oxygen availability. When the volumetric flow rate was again reduced from 354 mL/min down to 34 mL/min at STP, the ethanol concentration again increased, however it did not reach the concentration seen when the flow rate was at 94 mL/min at STP. It is difficult to compare in precise terms the concentrations of ethanol at 34 mL/min with those at 94 mL/min at STP, because there have been other factors influencing the system, resulting from cell aging, effects of the continuous exposure to relatively high amount of oxygen for the time at 354 mL/min at STP, and changes in the immobilized cell population. In Figure 2.4, White and Portno (1978) noted changes in yeast flavour metabolite concentrations with continuous fermentation time in their tower fermenter.

WO 02/102961

166

PCT/CA02/00970

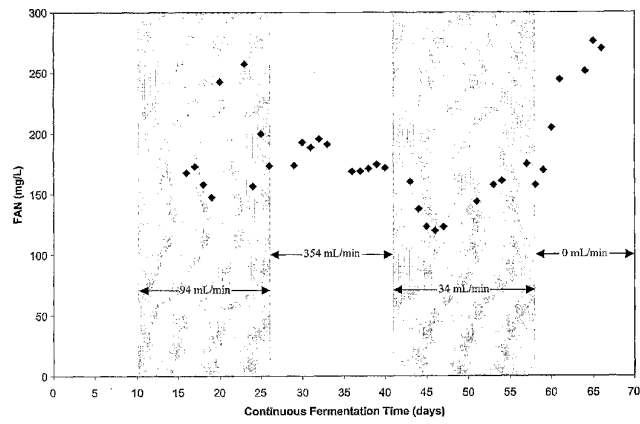


Figure 7.4. Free amino nitrogen concentration remaining in wort versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

WO 02/102961

167

PCT/CA02/00970

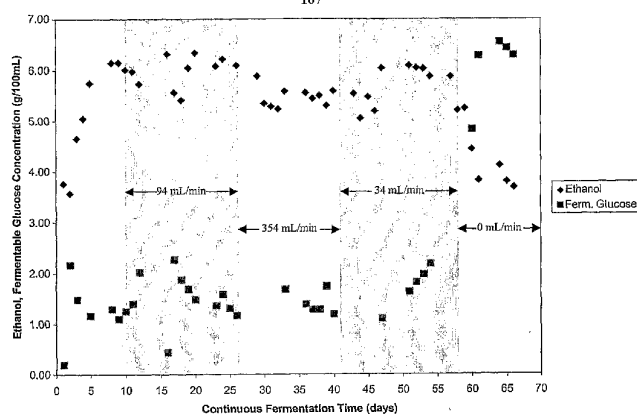


Figure 7.5. Liquid phase ethanol and total fermentable carbohydrate (as glucose) concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

In Figure 7.6, the pronounced effect of oxygen on the production of total diacetyl is seen. Since diacetyl is generally considered an undesirable flavour compound in beer, one of the main reasons to optimize the amount of oxygen in the bioreactor is to control levels of this flavour compound. After the 354 mL/min air phase, the flow rate was dropped to 34 mL/min at STP and total diacetyl decreased. During batch fermentation, it is known that increased oxygen leads to an increase in the formation of alpha-acetolactate, the precursor of diacetyl (Kunze, 1996).

In Figure 7.7 a clear relationship between the amount of air in the sparge gas and acetaldehyde concentration, arose. As the percent of air in the sparge gas increased, the amount of acetaldehyde also increased. Acetaldehyde imparts a green-apple character to beer, and is normally present in commercial beer at levels of less than 20 mg/L.

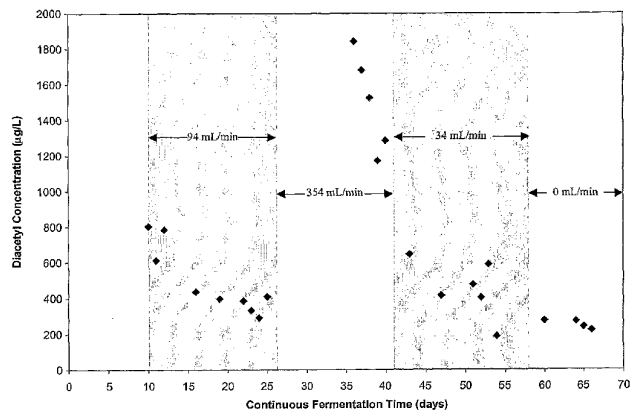


Figure 7.6. Liquid phase total diacetyl concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment

WO 02/102961

169

PCT/CA02/00970

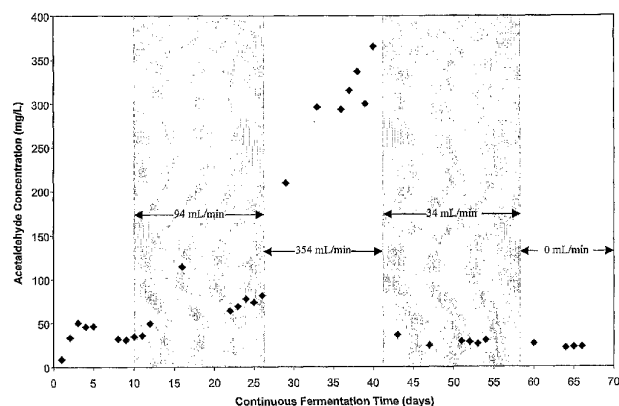


Figure 7.7. Liquid phase acetaldehyde concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

In Table 7.2 and Figures 7.8 - 7.9 the pseudo-steady state concentrations of ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, and ethyl octanoate are given versus continuous fermentation time. For all the esters measured, the step change in aeration rate from 94 to 354 mL/min at STP resulted in a decrease in concentration. When the aeration rate was decreased from 354 mL/min down to 34 mL/min at STP, the concentration of isoamyl acetate, ethyl hexanoate, and ethyl octanoate increased. However they did not increase to the values seen at the 94 mL/min aeration rate. The pattern of response of these compounds closely matched one another, with ethyl hexanoate and ethyl octanoate showing more relative fluctuations than isoamyl acetate. The concentration of ethyl acetate actually further decreased when the volumetric flow rate of air was reduced to 34 mL/min at STP. For all the esters measured in this study, the concentration showed an increase when the air was completely eliminated from the fluidizing gas. The concentration of each ester rose and then tapered off, as the liquid phase cell concentration decreased rapidly in the bioreactor.

WO 02/102961

170

PCT/CA02/00970

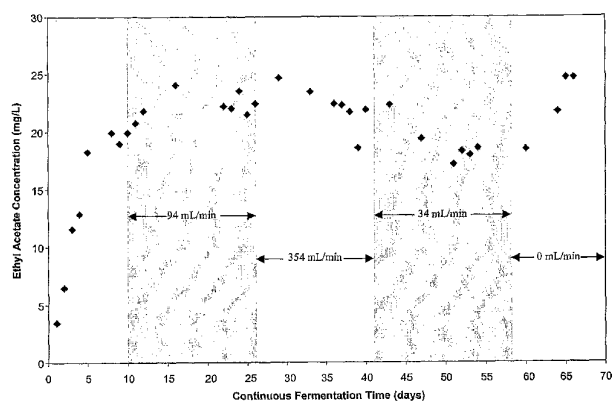


Figure 7.8. Ethyl acetate concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

WO 02/102961

171

PCT/CA02/00970

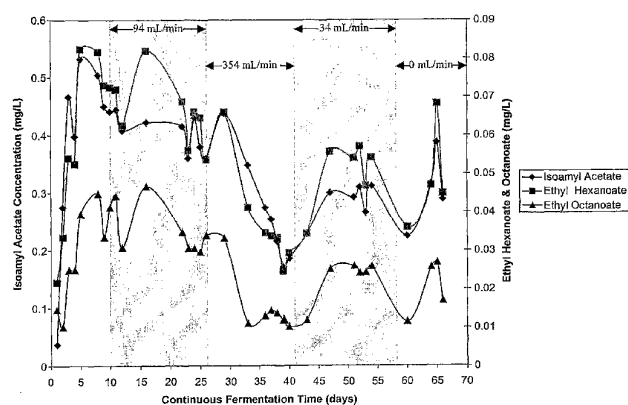


Figure 7.9. Liquid phase isoamyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

The higher alcohols isoamyl alcohol, isobutanol, and 1-propanol versus continuous fermentation time are given in Figures 7.10 and 7.11. For the alcohols measured, the concentration increased as a result of the step change increase in aeration from 94 to 354 mL/min at STP. Isobutanol showed the largest relative fluctuations when aeration rate was changed. The 1-propanol concentrations were well below the flavour threshold values of 600 – 800 mg/L, however, throughout the continuous fermentation experiment, the concentration was well above that found in typical commercial batch-produced beers, where concentrations are usually below 16 mg/L. This was not the case for isoamyl alcohol or isobutanol, which were within normal ranges. The compound 1-propanol is thought to arise from the reduction of the acid propionate (Gee and Ramirez, 1994). Others (Hough et al., 1982; Yamauchi et al., 1995) have also related the formation of 1-propanol to the metabolism of the amino acids β -aminobutyric acid and threonine, with the corresponding oxo-acid and aldehyde being β -oxobutyric acid and propionaldehyde, respectively.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

172

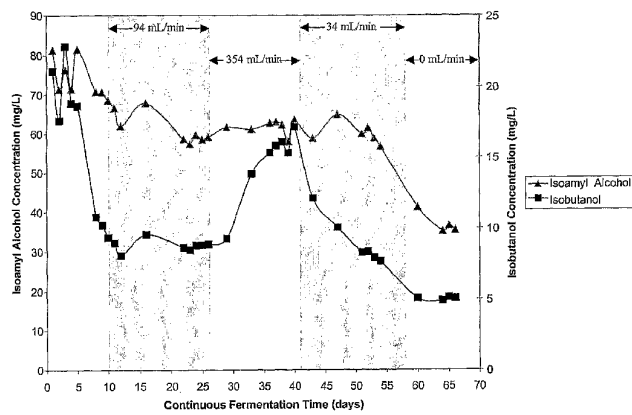


Figure 7.10. Liquid phase isoamyl alcohol and isobutanol concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate of air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

WO 02/102961

173

PCT/CA02/00970

18 AUG 2004 19:08:02

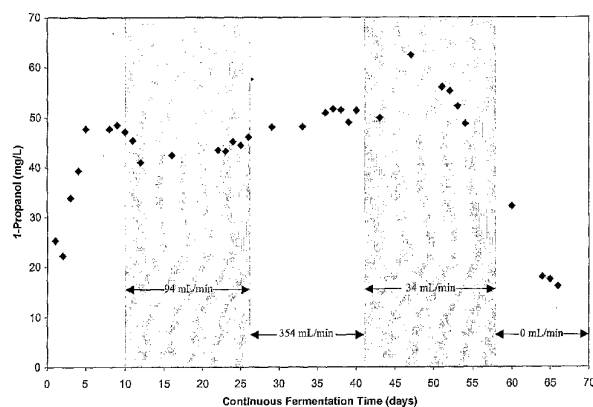


Figure 7.11. Liquid phase 1-propanol concentration versus relative continuous fermentation time. The volumetric flow rate air at STP supplied to the bioreactor through the sparger is indicated on the graph. The remainder of the gas was carbon dioxide and the total volumetric gas flow rate was constant at 472 mL/min at STP throughout the experiment.

Because excess diacetyl, acetaldehyde and fusel alcohols are undesirable in beer, oxygen control to limit their production is important. As discussed in the literature review, when the supply of oxygen to the yeast cells is increased, there is enhanced anabolic formation of amino acid precursors and thus an overflow of higher alcohols, oxo-acids, and diacetyl. The concentration of esters is known to decrease with an increase in oxygen availability because ester formation is catalysed by acetyl transferase. Acetyl transferase is inhibited by unsaturated fatty acids and ergosterol, which in turn will increase in the presence of oxygen (Norton and D'Amore, 1994).

For the bioreactor conditions used in this experiment, the pseudo-steady-state (after a minimum of three reactor turnover times) dissolved oxygen concentrations measured in the liquid phase of the bioreactor were close to zero (less than .03 mg/L). This experiment did not allow for a direct comparison of the data from the 94 mL/min and 34 mL/min of air at STP in the fluidization gas, because they were separated by the highest air flow rate (354 mL/min). This is because the physiological state of the yeast resulting from the exposure to previous bioreactor conditions, the immobilization matrix and continuous fermentation time may also have caused other changes in flavour production.

WO 02/102961

174

PCT/CA02/00970

No contamination was detected in the bioreactor at any point during this experiment.

In order to balance the requirement of yeast for some oxygen to maintain yeast viability and the need to minimize oxygen to obtain a beer with a desirable flavour profile, other strategies could be explored such as the addition of nutrients such as zinc, magnesium, or providing other exogenous compounds required by the yeast cell to maintain viability. Such additions would allow for a further decrease in the oxygen requirement of the yeast. Another possibility would be to operate at very low oxygen concentrations most of the time, with periodic pulses of oxygen supplied to the yeast on a regular basis to maintain cell viability.

7.2.2 Post Fermentation Batch Holding Period: Effects of Oxygen Exposure on Yeast Metabolites

Because total diacetyl was not within normal ranges for a commercial beer at the end of primary fermentation, several approaches were taken to reduce the concentration of this compound to acceptable levels. One such approach was to use a warm holding period immediately following continuous primary fermentation. In Figures 7.12 -- 7.21 liquid phase total fermentable carbohydrate (as glucose), ethanol, total diacetyl, acetaldehyde, ethyl acetate, 1-propanol, isobutanol, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, and ethyl hexanoate concentrations are plotted versus post fermentation holding time. Samples collected from the continuous primary fermenter at pseudo-steady state were held under aerobic or anaerobic conditions, as indicated in the legend of each figure.

In Figure 7.12 the concentration of total fermentable carbohydrate (as glucose) declined quickly in the first two hours and then declined at a slower rate during the remainder of the holding period in both the aerobic and anaerobic samples. Possible reasons for this observation were that during the first two hours, more yeast were present prior to decantation, and the concentration of sugars was higher at the start of the holding period. There was not a significant difference in fermentable glucose uptake between the aerobic and anaerobic samples, although some differences were noted initially.

The concentration of ethanol in Figure 7.13 rose quickly at the beginning of the hold period and then the anaerobic and aerobic samples increased in ethanol concentration over time, in an almost parallel fashion. The initial increase in ethanol for the anaerobic sample coincided with the period where the most sugar uptake occurred. At the end of the hold period, ethanol concentration was higher in the anaerobically treated samples.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

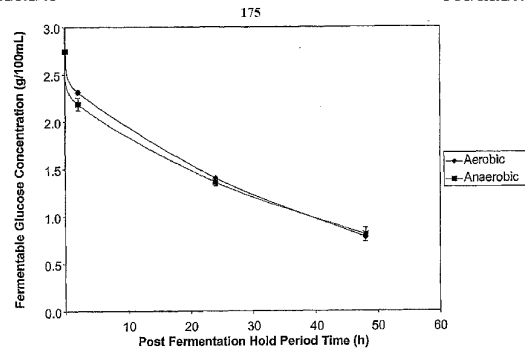


Figure 7.12 Mean fermentable glucose concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

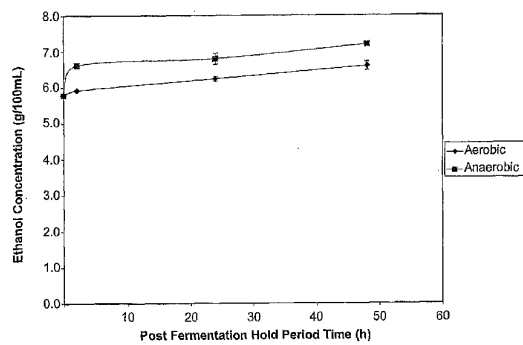


Figure 7.13. Mean ethanol concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

176

PCT/CA02/00970

In Figure 7.14 the aerobic samples showed an early increase in acetaldehyde upon exposure to aerobic conditions outside the bioreactor. The combination of aerobic conditions, with sugar consumption and ethanol production, could account for this result. By the end of the 48-hour holding period, the concentration of acetaldehyde had dropped from 17 mg/L to 9 mg/L in the anaerobic sample, which brings the liquid concentration to within specifications for a quality North American lager (less than 10 mg/L).

The concentration of total diacetyl versus holding time is given in Figure 7.15. The results show that the elimination of oxygen from the system during this holding period provides more favourable conditions for diacetyl reduction. The shape of the total diacetyl curve may be related to free amino nitrogen depletion and the subsequent intracellular production of valine, of which diacetyl is a byproduct (Nakatani et al., 1984a; Nakatani et al., 1984b). Total diacetyl concentration at the end of the primary continuous fermentation was 326 μ g/L and at the end of the anaerobic hold period it was at a concentration of 33 μ g/L, which is well below the taste threshold in commercial beers.

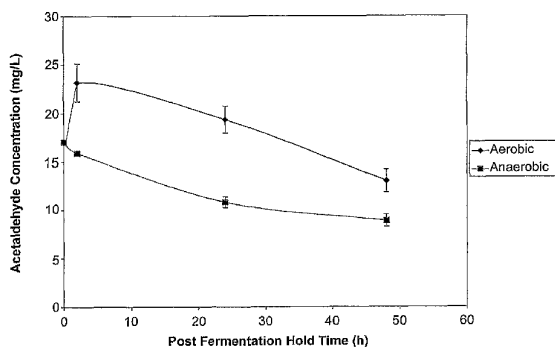


Figure 7.14. Mean acetaldehyde concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

WO 02/102961

177

PCT/CA02/00970

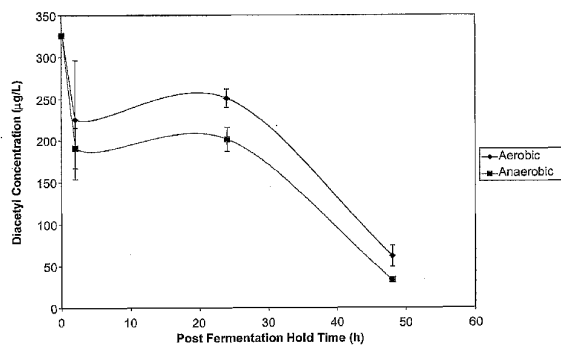


Figure 7.15. Mean total diacetyl concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data ($n = 2$).

In Figures 7.16 - 7.18 the esters ethyl acetate, isoamyl acetate, and ethyl hexanoate concentrations are plotted versus post fermentation holding time. The same pattern for aerobic and anaerobic samples was observed for all esters. The concentration of esters did not diverge between the anaerobic and aerobic samples until later in the holding period, where the concentration of esters in the aerobic samples declined and the concentration in the anaerobic samples increased. Because the concentration of esters in the continuous fermentations is somewhat low compared with ester concentrations found in commercial beer, it is desirable to select conditions, which favour ester production.

WO 02/102961

178

PCT/CA02/00970

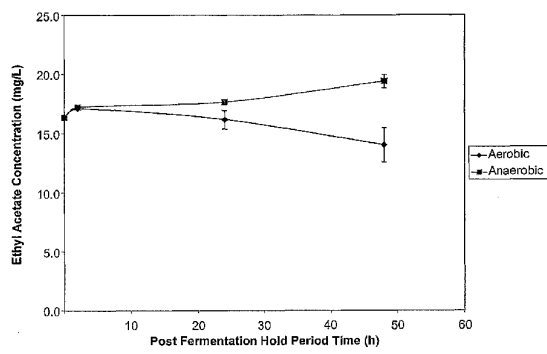


Figure 7.16. Mean ethyl acetate concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data ($n = 2$).

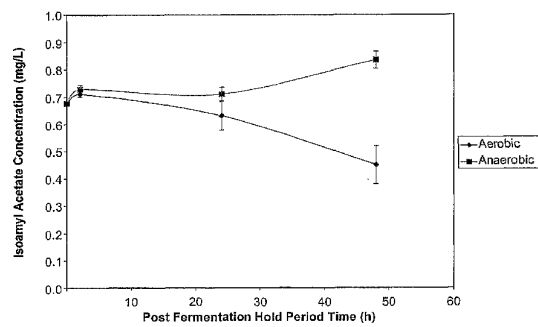


Figure 7.17. Mean isoamyl acetate concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data ($n = 2$).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

179

PCT/CA02/00970

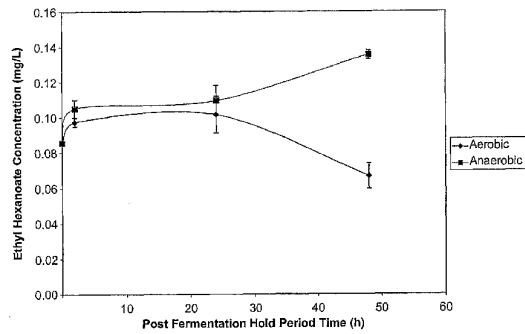


Figure 7.18. Mean ethyl hexanoate concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

Figures 7.19 - 7.21 show isoamyl alcohol, 1-propanol, and isobutanol concentration versus post fermentation holding time. At the end of the 48 hour holding period, no significant differences in these alcohols were observed between the aerobic and anaerobic treatments. However, the 24-hour samples showed a higher concentration in all cases for the aerobic treatments.

WO 02/102961 PCT/CA02/00970

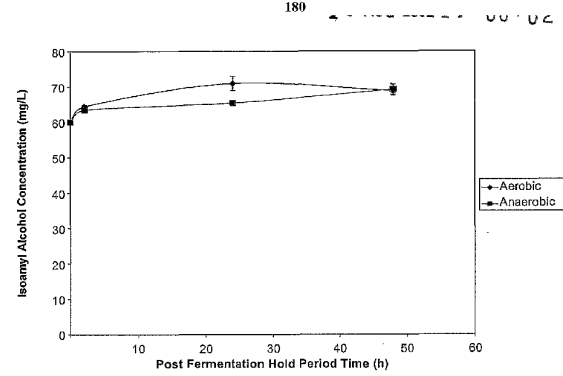


Figure 7.19. Mean isoamyl alcohol concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

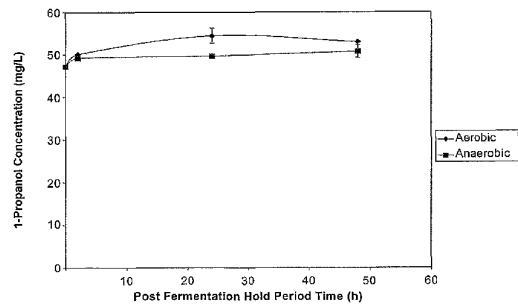


Figure 7.20. Mean 1-propanol concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

WO 02/102961

181

PCT/CA02/00970

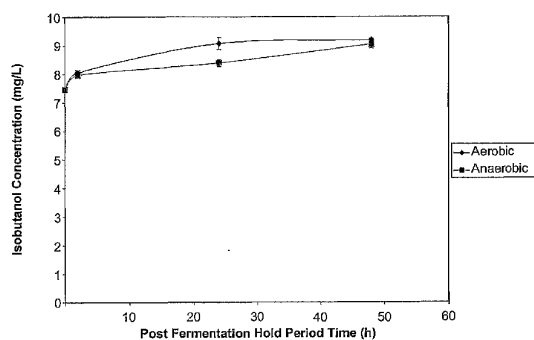


Figure 7.21. Mean isobutanol concentration versus post fermentation hold time for aerobic and anaerobic treated samples after continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. Error bars represent the upper and lower limits of the experimental data (n = 2).

In Figure 7.22, a radar graph is given to allow comparison of a number of the flavour compounds after the 48 hour aerobic and anaerobic holding period with a profile from a commercial beer. Radar graphs are commonly used in the brewing industry to allow one to examine and compare a variety of different beer characteristics together on one graph (Sharpe, 1988). From this figure, it can be seen that the anaerobically-held continuously fermented beer is the closest match to a typical market beer. From Appendix 6, it can be seen that the anaerobic liquid was within normal ranges for a market beer, except in the case of 1-propanol, which was significantly higher than batch-fermented beers. This higher than normal 1-propanol was observed in all continuously fermented products from this work.

The formation of 1-propanol occurred during the continuous primary fermentation stage and it did not decrease significantly during the holding period, whether the conditions were aerobic or anaerobic. Kunze (1996) states that the following factors will increase higher alcohols such as 1-propanol during batch fermentation: mixing, intensive aeration of the wort, and repeated addition of fresh wort to existing yeast.

Ultimately the ideal scenario will be to eliminate the secondary holding period entirely by optimizing the conditions in the primary continuous bioreactor. However, further gains can be made using the holding period, by optimizing the holding temperature (diacetyl removal by yeast is very temperature dependent), the amount of fermentable sugars remaining in the liquid at the beginning of the holding period, optimizing the concentration of yeast present, the hydrodynamic characteristics of the holding vessel (diacetyl removal could be improved by improving the contact between the yeast and the beer), and taking further measures to eliminate oxygen from this stage.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

182

PCT/CA02/00970

Volumetric beer productivity calculations are given in Appendix 3. The process described in this section, with a continuous bioreactor operating with a 24 hour residence time followed by a 48 hour batch hold, is 1.8 times more productive than a current industrial batch process. A relatively fast industrial batch process with a 7.5 day cycle time has a volumetric beer productivity of 0.093 m³ beer produced / (m³ vessel volume x day), whereas the continuous process described here has a productivity of 0.165 m³ beer produced / (m³ vessel volume x day). If further research allowed the batch holding period to be shorted to 24 hours, beer productivity would become 2.3 times more productive than the industrial batch standard. If the ideal scenario of a 24 hour continuous process with no batch holding were achieved, beer volumetric productivity would become 7.5 times that of the batch standard. In addition to the increased volumetric productivity, the additional benefits realized by moving from a batch to a continuous process, such as shorter time to market, decrease in brewhouse size, and less frequent yeast propagation, must be balanced with a careful analysis of relative operating costs.

Other researchers (Kronlöf and Virkajärvi, 1996; Nakanishi et al., 1993; Yamauchi et al., 1995) have focused on developing multi-staged continuous fermentations in which the first stage of continuous fermentation (aerobic) results in only a partial consumption of the fermentable sugars present in the wort. While this strategy has shown some success in terms of flavour production, these systems are complex. As well, the first aerobic stage of such systems creates an environment, which is more susceptible to microbial contamination (i.e. high sugar concentration, temperature, and oxygen, with low concentrations of ethanol). In the gas-lift bioreactor system presented in this work, the bioreactor has a low fermentable sugar concentration, low pH, high ethanol concentration, and low concentrations of oxygen, making the environment inhospitable for potential contaminants.

WO 02/102961

183

PCT/CA02/00970

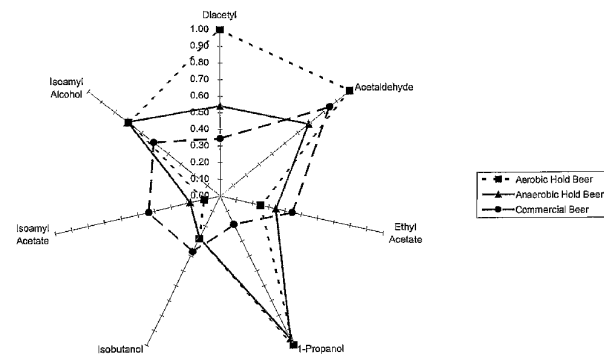


Figure 7.22. Radar graph of normalized concentration data obtained after 48 hours of aerobic or anaerobic holding, following continuous primary fermentation in a gas lift bioreactor. The normalized data is based on the averages of duplicate samples and the commercial beer data was taken as the midpoint of the data listed in Appendix 6.

WO 02/102961

184

PCT/CA02/00970

7.2.3 Effect of Liquid Residence Time on Key Yeast Metabolites during Continuous Primary Beer Fermentation

Figures 7.23 - 7.28 show the analytical results obtained from the bioreactor liquid phase. In Table 7.3, the average concentrations and flow rates of the measured analytes at pseudo-steady state (after a minimum of three bioreactor turnover times) are listed at the two liquid residence times used during this experiment. While liquid phase yeast viability did not change significantly when the flow rate of wort to the bioreactor was increased, the concentration of yeast cells did change as seen in Figure 7.23.

Table 7.3. (a) Summary table of effect of bioreactor residence time on liquid phase yeast and key yeast metabolite concentrations, averages at pseudo-steady state; (b) Summary table of the effect of bioreactor residence time on liquid phase yeast and key yeast metabolite flow rates at the bioreactor outlet, averages at pseudo-steady state.

(a) Average Analyte Concentration	Bioreactor Residence Time	
	1.8 days	0.9 days
Cell Conc (cells/mL)	2.38E+08	1.32E+08
Tot. Ferm. Glucose (g/100 mL)	0.29	6.09
FAN (mg/L)	106.3	246.4
Ethanol (g/100 mL)	5.16	4.80
Total Diacetyl (ug/L)	292	460
Acetaldehyde (mg/L)	19.47	37.07
Ethyl Acetate (mg/L)	41.00	38.29
1-Propanol (mg/L)	44.95	13.53
Isobutanol (mg/L)	22.78	9.13
Isoamyl Acetate (mg/L)	0.90	1.28
Isoamyl Alcohol (mg/L)	76.67	51.39
(b) Average Analyte Flow Rate	Bioreactor Residence Time	
	1.8 days	0.9 days
Cell Flow Rate(cells/min)	7.38E+08	8.22E+08
Tot. Ferm. Glucose (g/min)	8.93E-03	3.72E-01
FAN (g/min)	3.65E-04	1.50E-03
Ethanol (g/min)	1.60E-01	2.93E-01
Total Diacetyl (g/min)	9.06E-07	2.81E-06
Acetaldehyde (g/min)	6.04E-05	2.26E-04
Ethyl Acetate (g/min)	1.27E-04	2.34E-04
1-Propanol (g/min)	1.39E-04	8.25E-05
Isobutanol (g/min)	7.06E-05	5.57E-05
Isoamyl Acetate (g/min)	2.80E-06	7.30E-06
Isoamyl Alcohol (g/min)	2.38E-04	3.13E-04

WO 02/102961

185

PCT/CA02/00970

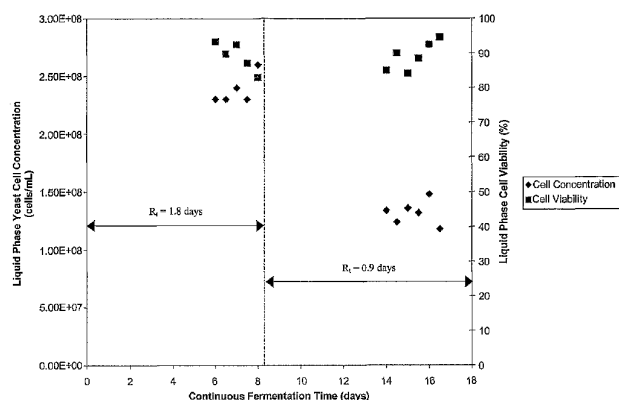


Figure 7.23. Liquid phase yeast cell concentration versus relative continuous fermentation time, effect of liquid residence time in bioreactor. R_L is bioreactor liquid residence time in days.

In Figures 7.24 and 7.25, the concentrations of the wort substrates free amino nitrogen (FAN) and total fermentable carbohydrate (as glucose) both increased when the liquid residence time decreased from 1.8 to 0.9 days. From the mass balances in Table 7.4, the consumption rate of total fermentable carbohydrate (as glucose) increased while free amino nitrogen consumption rate decreased, with decreasing bioreactor residence time. The yield factor, $Y_{P/S}$, of the fermentation product ethanol from fermentable glucose substrate, increased from 0.3 to 0.5 with the reduction in liquid residence time. Because the system was sparged with air and carbon dioxide, there were probably minor losses of ethanol in the gas phase, which would have an impact on the yield factor, $Y_{P/S}$, by affecting the balance on ethanol. Research conducted in collaboration with Budac and Margaritis (1999) has qualitatively demonstrated, using a gas chromatograph-mass spectroscopy technique (GC-MS), that beer flavour volatiles including ethanol, acetaldehyde, ethyl acetate, and isoamyl acetate are detected in the gas-lift bioreactor headspace during continuous fermentation.

WO 02/102961

186

PCT/CA02/00970

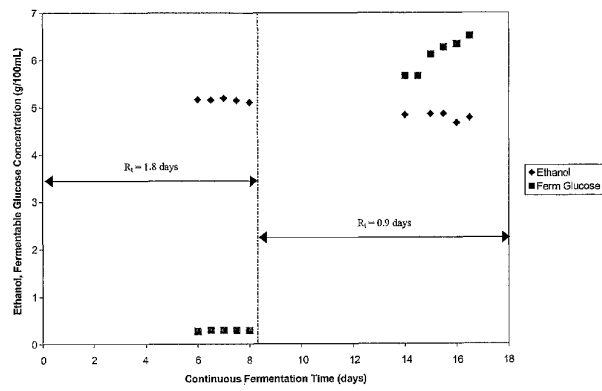


Figure 7.24. Liquid phase ethanol and fermentable glucose concentration versus relative continuous fermentation time, effect of liquid residence time in bioreactor. R_t is bioreactor liquid residence time in days.

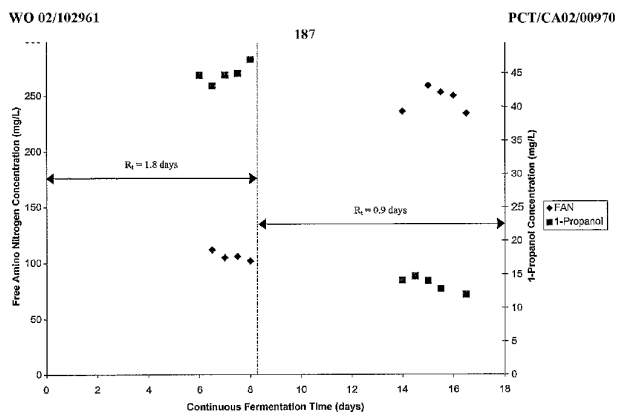


Figure 7.25. Liquid phase free amino nitrogen and 1-propanol concentration versus relative continuous fermentation time, effect of liquid residence time in bioreactor. R_L is bioreactor liquid residence time in days.

Table 7.4. Mass balances on free amino nitrogen and total fermentable carbohydrate (as glucose) based on average data in Table 7.3, effect of residence time.

Residence Time	1.8 days	0.9 days	1.8 days	0.9 days
	Free Amino Nitrogen		Total Ferm. Glucose	
	(g/min)		(g/min)	
Inlet*	8.84E-04	1.74E-03	4.71E-01	9.26E-01
Outlet	3.65E-04	1.50E-03	8.93E-03	3.72E-01
Consumption (ΔS)	5.18E-04	2.35E-04	4.62E-01	5.54E-01
Yield Factor (Y_{PS})			0.3	0.5

*Inlet concentrations from Appendix 1

The liquid phase concentration of the fermentation product ethanol decreased with the step change in liquid residence time. However, the system as a whole was producing more ethanol on a mass flow rate basis at the faster liquid residence time. Because the objective of this work was not only to produce ethanol in isolation, but rather a beer with a balance of many components, maximizing ethanol productivity must be balanced with other factors. At the end of a commercial primary beer fermentation, the majority of fermentable glucose substrate must be consumed.

In Figure 7.26, the response of acetaldehyde and total diacetyl concentration, to the step change in wort flow rate is given. Both analytes increased in concentration and in their rate of production when the liquid residence

WO 02/102961

188

PCT/CA02/00970

time was decreased. During batch beer fermentations, acetaldehyde is excreted by yeast during the first few days of fermentation (Kunze, 1996).

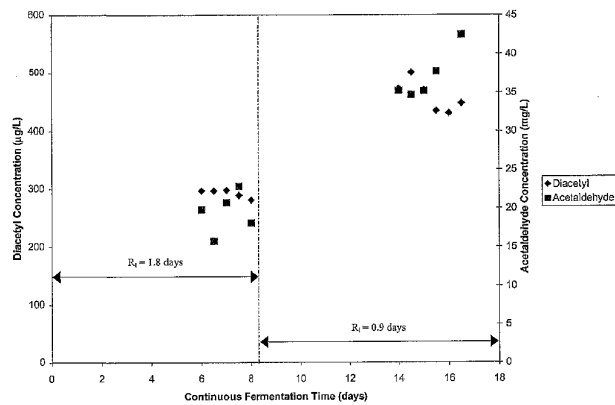


Figure 7.26. Liquid phase total diacetyl and acetaldehyde concentration versus relative continuous fermentation time, effect of liquid residence time in bioreactor. R_L is bioreactor liquid residence time in days.

Figures 7.25 and 7.27 show the effect of decreasing bioreactor residence time on the liquid phase concentrations of the higher alcohols 1-propanol, isobutanol and isoamyl alcohol. All three higher alcohols decreased in concentration when the bioreactor residence time was decreased.

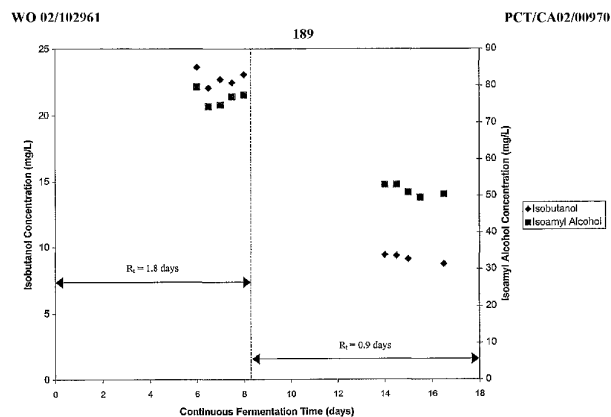


Figure 7.27. Liquid phase isobutanol and isoamyl alcohol concentration versus relative continuous fermentation time, effect of liquid residence time in bioreactor. R_L is bioreactor liquid residence time in days.

Ethyl acetate and isoamyl acetate mass flow rates given in Table 7.3 (b) both increased in response to the decrease in liquid residence time. In Figure 7.28 the liquid phase concentration of ethyl acetate decreased while isoamyl acetate increased. Because this experiment allowed for an increase in liquid phase cell growth without increasing the oxygen supply to the system, the conditions in the bioreactor promoted ester production. Hough et al. (1982) state that increased growth and decreased oxygen conditions encourage ester formation.

WO 02/102961

190

PCT/CA02/00970

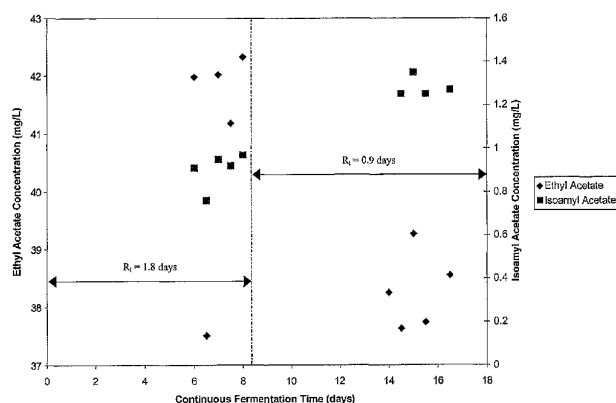


Figure 7.28. Liquid phase ethyl acetate and isoamyl acetate concentration versus relative continuous fermentation time, effect of liquid residence time in bioreactor. R_L is bioreactor liquid residence time in days.

7.2.4 Using a Commercial Preparation of Alpha-Acetolactate Decarboxylase to Reduce Total Diacetyl during Continuous Primary Beer Fermentation

Experiment 1: The bioreactor was contaminated with aerobically growing Gram positive cocci before the trial could be completed. It was determined that the bioreactor itself was contaminated, since microbiological testing of the wort supply showed no contamination. This pointed to the need for bioreactor upgrades with improved safeguards against contamination. However, before the system was shut down, a decrease in total diacetyl concentration was observed when ALDC was added to the wort supply. Unfortunately it was not possible to draw any conclusions from this data due to the confusing effects of bioreactor contamination.

Experiment 2: As a result of numerous bioreactor upgrades, the system operated without contamination throughout the duration of Experiment 2. The data for this experiment is given in Figures 7.29 – 7.31. In Table 7.5 the average pseudo-steady state concentrations of total diacetyl before and after ALDC addition to the wort are summarized. Total diacetyl concentration dropped by 47% with the addition of ALDC to the wort, which makes the use of this enzyme promising for the future (averages taken after three bioreactor turnover times). As seen in Figures 7.30 and 7.31, total fermentable carbohydrate (as glucose) and cell concentration drifted slightly during this trial, which may have been caused by slight differences in the wort, supplied to the bioreactor before and after the addition of ALDC.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

191

19 AUG 2002 19:08:02

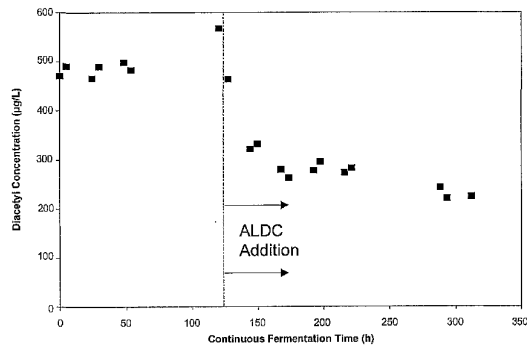


Figure 7.29. Liquid phase total diacetyl concentration versus continuous fermentation time, effect of ALDC addition to the wort fermentation medium, Experiment 2.

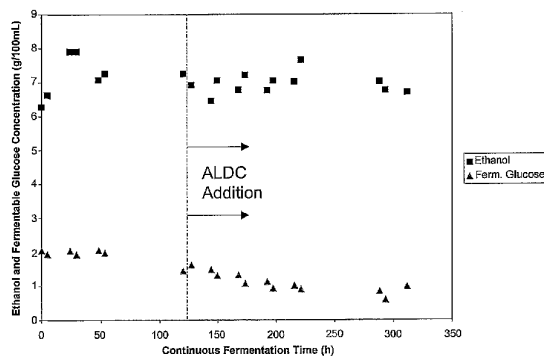


Figure 7.30. Liquid phase fermentable carbohydrate (as glucose) and ethanol concentration versus continuous fermentation time, effect of ALDC addition to the wort fermentation medium, Experiment 2.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

192

1 8 AUG 2004 1 1 00 00

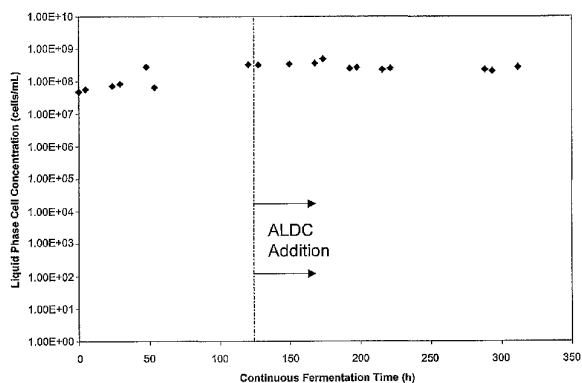


Figure 7.31. Liquid phase cell concentration versus continuous fermentation time, effect of ALDC addition to the wort fermentation medium, Experiment 2.

In order to eliminate the potential confounding effect of wort variability, during Experiment 3 a large quantity of wort from the brewhouse (14 hL) was collected and ALDC was added directly to the wort remaining in this holding vessel, once a pseudo-steady state baseline was reached. This further eliminated any potential wort inconsistencies that could have affected fermentation performance in Experiment 2. This wort storage vessel was also equipped with carbon dioxide sparging, so that dissolved oxygen levels in the wort supply were kept at a consistently low level.

Experiment 3: Figures 7.32 – 7.34 illustrate the effect of ALDC addition to the wort supply, on total diacetyl, total fermentable carbohydrate (as glucose), ethanol, and the freely suspended cell concentration during continuous beer fermentation. Table 7.6 also gives the average pseudo-steady state total diacetyl concentration before and after the addition of ALDC to the wort supply (averages taken after three bioreactor turnover times). No contamination was detected at any point during this experiment. The concentration of total diacetyl was reduced by 45% upon addition of ALDC. No significant differences in ethanol, total fermentable carbohydrate (as glucose) or the freely suspended cell concentration were observed, which agrees with the batch findings of Aschengreen and Jepsen (1992).

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

193

1 8 AUG 2004 17 : 00 : 00

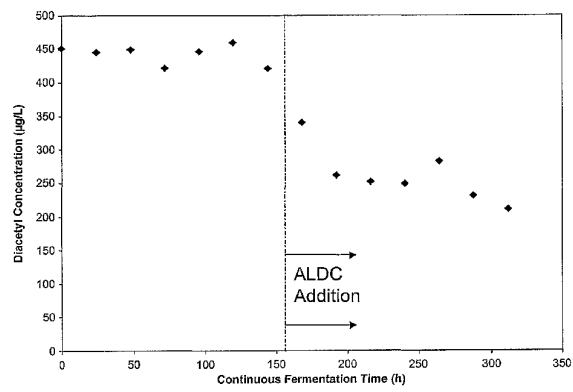


Figure 7.32. Liquid phase total diacetyl concentration versus continuous fermentation time, effect of ALDC addition to the wort fermentation medium, Experiment 3.

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

194

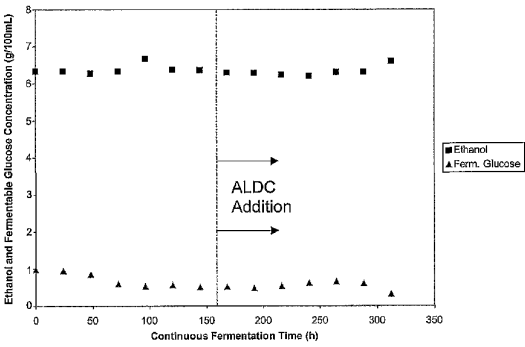


Figure 7.33. Liquid phase ethanol and total fermentable sugar (as glucose) concentration versus continuous fermentation time, effect of ALDC addition to the wort fermentation medium, Experiment 3.

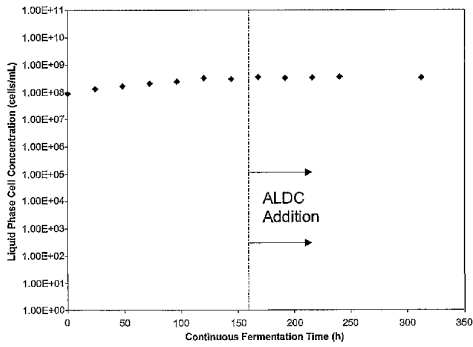


Figure 7.34. Liquid phase cell concentration versus continuous fermentation time, effect of ALDC addition to the wort fermentation medium, Experiment 3.

WO 02/102961

195

PCT/CA02/00970

The results of Experiments 2 and 3 indicate that ALDC did have a significant effect on total diacetyl concentration during continuous fermentation in gas lift bioreactors giving an average reduction in total diacetyl concentration of 46%. This has the potential to decrease, or eliminate secondary processing for diacetyl reduction in continuous gas-lift systems. A relatively high dosage of ALDC was used for these initial experiments, and it would be necessary to optimize the amount, method and timing of ALDC dosing, in wort if this enzyme was to be adopted for the process. Further savings could be realized if an enzyme becomes available with higher activity levels under brewery fermentation conditions or if the enzyme itself was immobilized, thus allowing for its reuse (Dallieu et al., 1996). Another consideration will be public acceptance of enzyme additives that have been produced using genetically modified organisms.

At the supplier's recommended dosage of 2 kg/1000 hL, and, with cost of the commercial enzyme preparation at \$131.05/kg, \$0.26 / hL would be added to the material costs of fermentation. As used in the experiments performed, the enzyme dosage was 72 □g/L (108 ADU/L) or 7.2 kg/1000 hL ALDC, giving an added material cost of \$0.94/hL. The economics of using ALDC for diacetyl reduction during gas lift continuous fermentations will depend on the optimum enzyme dosage under bioreactor conditions and the amount of time saved by its use.

Table 7.5. Summary of average pseudo-steady state effect of ALDC addition to wort fermentation medium on total diacetyl concentration during continuous beer fermentation in a gas lift bioreactor.

Experiment	Average Total Diacetyl Concentration (□g/L)		Percent Diacetyl Reduction
	(ALDC absent)	(ALDC, 60□L/L)	
Experiment II	495	260	47
Experiment III	445	245	45

*averages based on pseudo-steady state values after three reactor turnover times

The foregoing supports the proposition that continuous fermentation, using immobilized yeast and the associated free cells in a gas-lift draft tube bioreactor system, is a viable alternative to batch fermentation for beer production based on the following criteria:

- flavour match accomplished
- higher bioreactor volumetric productivity
- minimal complexity
- long term continuous operation demonstrated
- control of air (oxygen) in the fluidizing gas for flavour control
- addition of enzyme □-acetylactate decarboxylase for diacetyl control an option
- no bacterial contamination
- financial benefits.

There are still many areas, which need to be studied further, but the technology is ready to be tested at a larger scale. Gas-lift bioreactors are already used at an industrial scale for wastewater treatment, which makes the prospects of scaling up the continuous beer fermentation system technically feasible. The Grolsch brewery in the Netherlands has been reported to use a 230 m³ gas lift bioreactor for treatment of their wastewater (Driessen

WO 02/102961

196

PCT/CA02/00970

et al., 1997). One of the biggest barriers to commercial scale continuous fermentation in the brewing industry may be the acceptance by the brewers of a new process, in an industry that is deeply tied to tradition.

Data collected on secondary yeast metabolites produced during continuous beer fermentations conducted in this work highlighted the importance of controlling oxygen in the fluidizing gas for beer flavour formation. The findings showed that under the given operating conditions, increased air in the bioreactor fluidizing gas caused an increase in acetaldehyde, diacetyl, and higher alcohols (isoamyl alcohol and isobutanol), while the concentrations of esters (isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate) and ethanol were reduced. These data suggest that there is the potential for controlling beer flavour through the composition of the bioreactor fluidizing gas, allowing for the production of unique products.

With the exception of when air was eliminated from the fluidizing gas, a freely suspended cell concentration of greater than 10^8 cells/mL was maintained in the bioreactor liquid phase. The system thus has more than one population of yeast cells coexisting in the bioreactor, the immobilized yeast and the liquid phase suspended yeast. Because of the large quantities of viable yeast growing in the bioreactor liquid phase, the possibility exists of using a continuous bioreactor as a yeast propagator.

When a secondary 48-hour batch-holding period was added following continuous primary fermentation, a flavour profile within the range of market beers was obtained. The temperature of this holding period was 21°C and the importance of minimizing the exposure of the liquid to oxygen during the holding period for flavour formation was demonstrated experimentally. The addition of a holding period adds two days to the process as well as additional complexity, however it is still significantly faster than commercial batch fermentations, which take between seven and fourteen days.

Ultimately, the ideal scenario would be to entirely eliminate the secondary holding period by optimizing the conditions in the primary continuous bioreactor. However, further reductions in the secondary holding time can be achieved in the short term by optimizing the holding temperature (diacetyl removal by yeast is very temperature dependent), the amount of fermentable sugars remaining in the liquid at the beginning of the holding period, the concentration of yeast present, the hydrodynamic characteristics of the holding vessel (diacetyl removal could be improved by improving the contact between the yeast and the beer), and by taking further measures to eliminate oxygen from this stage.

Other researchers (Kronlof and Virkajarvi, 1996; Nakanishi et al., 1993; Yamauchi et al., 1995) have focused on developing multi-stage continuous fermentations in which the first stage of continuous fermentation (aerobic) results in only a partial consumption of the fermentable sugars present in the wort. While this strategy has shown some success in terms of flavour production, these systems are complex. As well, the first aerobic stage of such systems creates an environment, which is more susceptible to microbial contamination (i.e. high sugar concentration, temperature, and oxygen, with low concentrations of ethanol). In the gas-lift bioreactor presented in this work, the bioreactor has a low steady state fermentable sugar concentration, low pH, high ethanol concentration, and low concentrations of oxygen, making the environment inhospitable for potential contaminants. In a less-developed brewery, minimizing complexity and developing a robust, contamination-resistant process is an important success factor.

The addition of a commercial preparation of alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC) to the wort supplying the continuous fermentation showed an average diacetyl reduction of 46%. However, because ALDC is an enzyme that is produced by a genetically modified organism (GMO), there are public perception issues that would need

WO 02/102961

197

PCT/CA02/00970

to be addressed before using such an enzyme in a commercial product. In addition the commercially available enzymes for diacetyl control do not have optimal activity under fermentation conditions. Over six months of continuous fermentation using kappa-carrageenan gel immobilization, freely suspended cells in the liquid phase retained viabilities greater than 90%, while immobilized cell viability decreased to less than 60%. Scanning electron micrographs revealed that cells located near the periphery of the gel bead had multiple bud scars and a regular morphology, while those near the bead core had an irregular shape and fewer bud scars, suggesting impaired growth. The micrographs also suggested that the yeast located near the bead core were showing signs of aging. As discussed in section 5, kappa-carrageenan gel has many characteristics that make it a desirable yeast immobilization matrix. However, there is currently no industrial method available for bead manufacture and, because the yeast are entrapped in the matrix as part of the bead-making process, bead-handling in a commercial plant increases complexity and cost. Other immobilization methods such as self-aggregation or flocculation should be explored in the future. This would eliminate the complexity of bead handling in a plant environment, and, if the yeast flocs were disrupted on a regular basis, one could ensure that aged cells are regularly removed from the bioreactor.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

198

PCT/CA02/00970

Claims:

1. In a process for the production of potable alcohols, a continuous fermentation stage is employed to initially ferment a wort containing fermentable sugars, following which the "at least partially fermented" discharge from the continuous process is delivered to a batch processing stage for finishing.
2. The process according to claim 1 wherein said potable alcohol is a beer.
3. The process according to claim 2 wherein the beer is a pale style beer.
4. The process according to claim 3 wherein said beer is a lager.
5. The process according to claim 1 wherein said beer is a North American style beer.
6. A process for the continuous fermentation of beer wherein a wort is at least partially fermented in a gas lift bioreactor employing a flocculent yeast strain with a restricted oxygen supply.
7. The process according to claim 6 wherein said fermentation is a primary fermentation.
8. The process according to claim 1 wherein the continuous stage is carried out in a gas lift bioreactor.
9. The process according to claim 1 wherein said continuous fermentation stage employs "immobilized" cells selected from one of the group consisting of carrier immobilized yeast or flocculating yeasts.
10. The process according to claim 9, wherein flocculating yeasts are selected for use.
11. The process according to claim 1, wherein completion of primary fermentation is said carried out in said batch hold stage.
12. The process according to claim 11, wherein diacetyl concentration reduction is carried out.
13. The process according to claim 11, wherein acetaldehyde concentration reduction is carried out.
14. The process according to claim 11 wherein the concentration of higher fusel alcohols substantially remains unaffected by the batch hold processing stage.
15. The process according to claim 1, wherein the discharge from the continuous fermentation stage is distributed through a manifold to ones of a plurality of batch hold vessels wherein said batch hold process takes place.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

199

PCT/CA02/00970

16. The process according to claim 1, wherein said continuous process is a process for pitching subsequent batch fermentations in the batch hold stage.

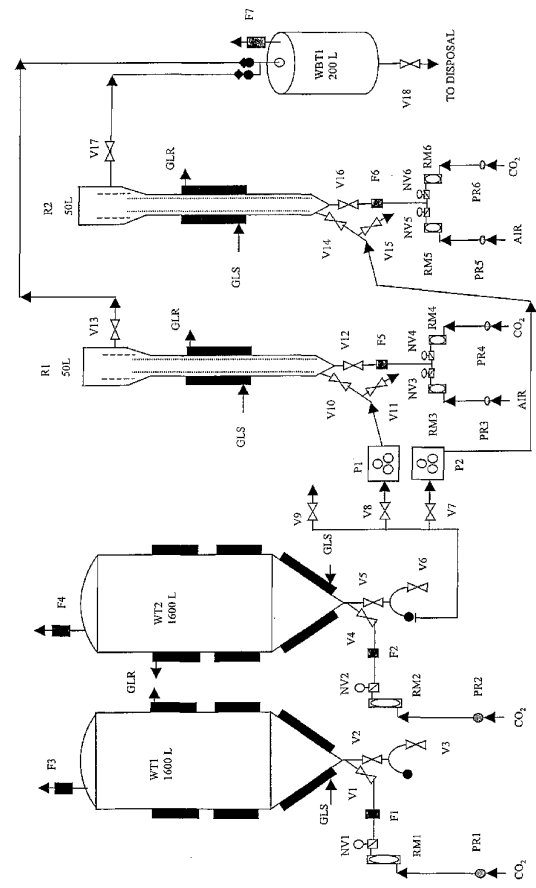


FIG. 1

WO 02/102961

2/22

PCT/CA02/00970

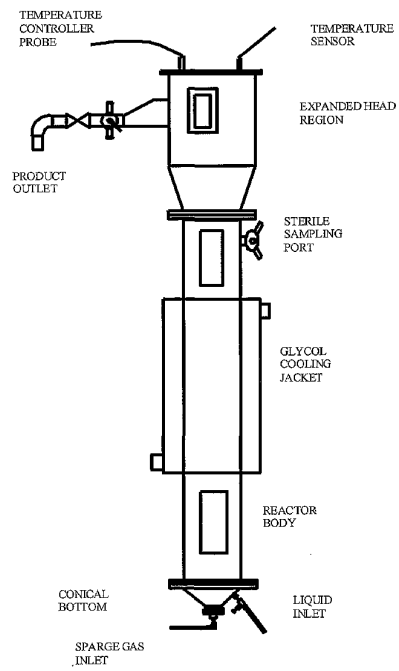


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

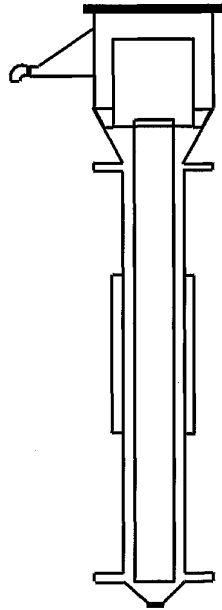


FIG. 3

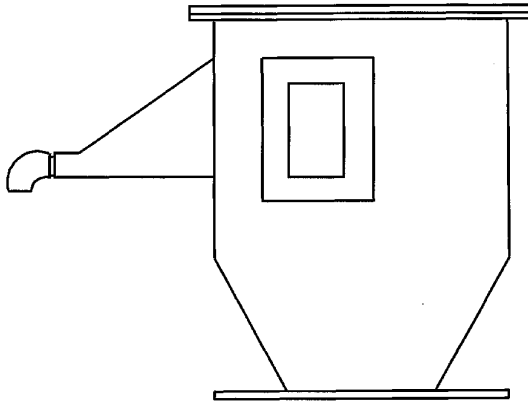


FIG. 4

WO 02/102961

5/22

PCT/CA02/00970

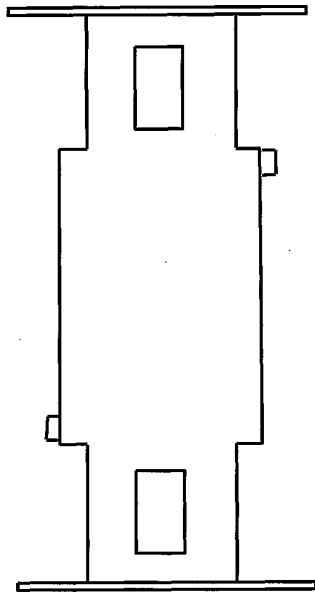


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

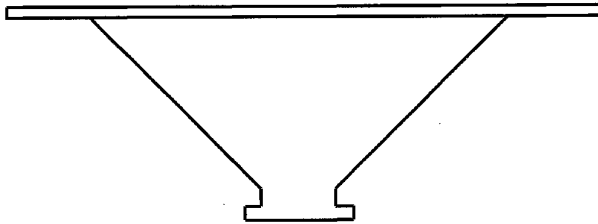


FIG. 6

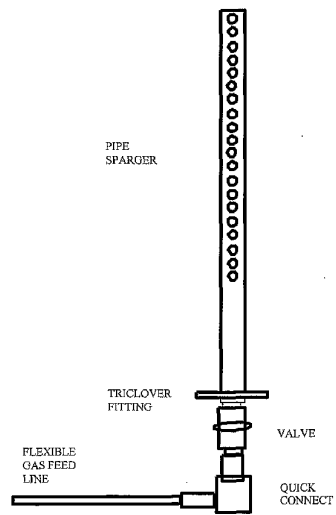


FIG. 7

WO 02/102961

8/22

PCT/CA02/00970

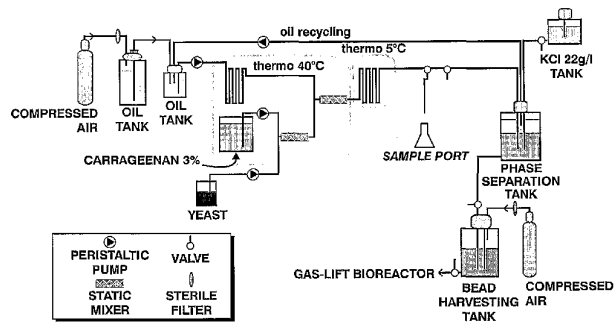


FIG. 8

WO 02/102961

9/22

PCT/CA02/00970

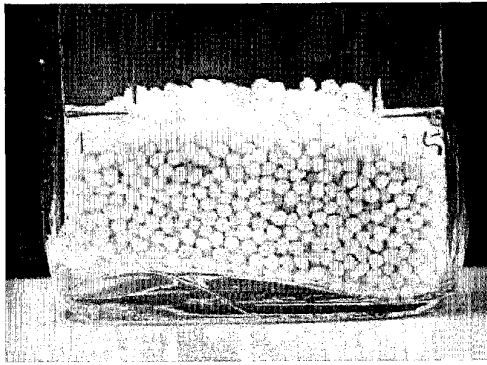


FIG. 9

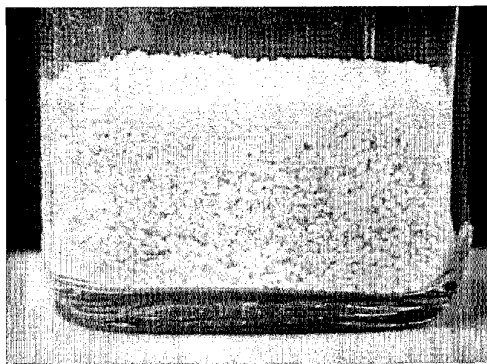


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

10/22

PCT/CA02/00970

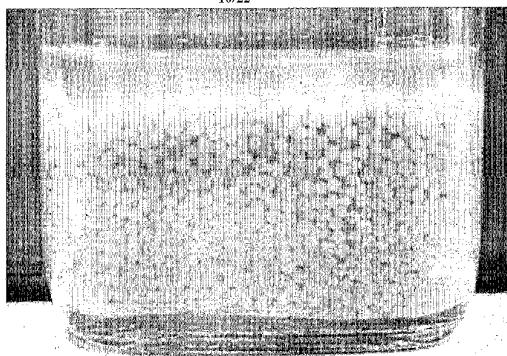


FIG. 11

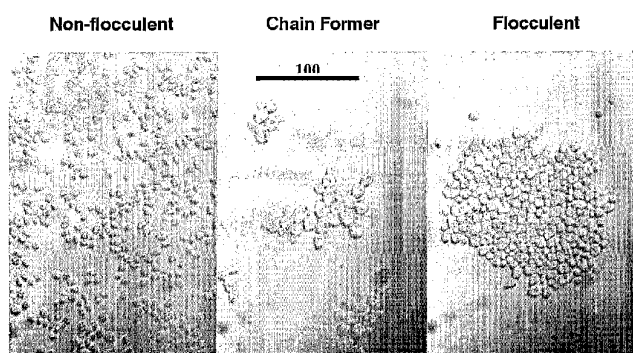
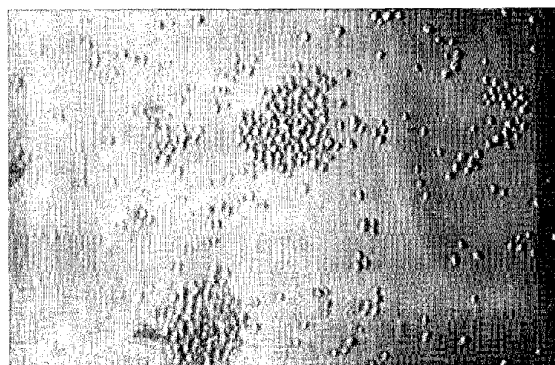


FIG. 12

WO 02/102961

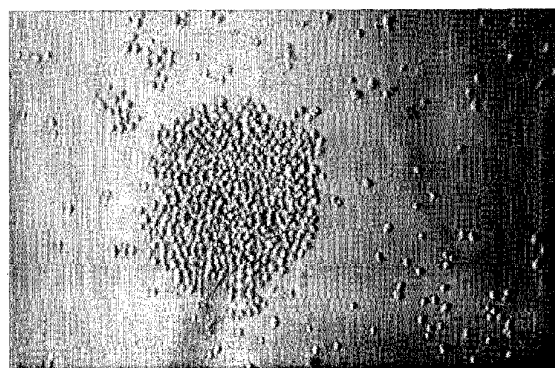
11/22

PCT/CA02/00970



250 μm

FIG. 13



250 μm

FIG. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

12/22

PCT/CA02/00970

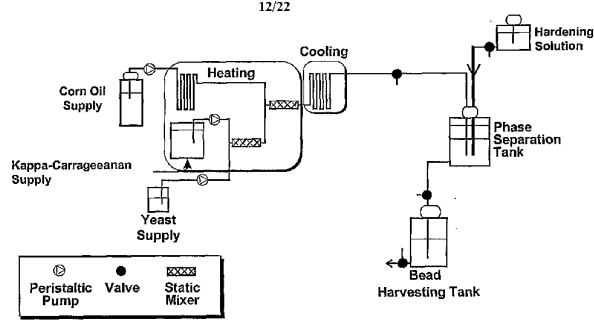


FIG. 15

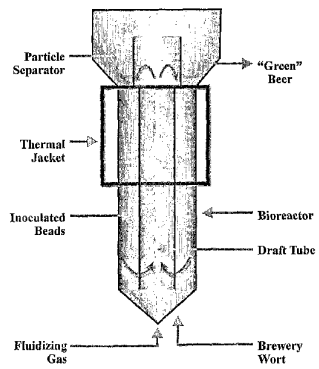


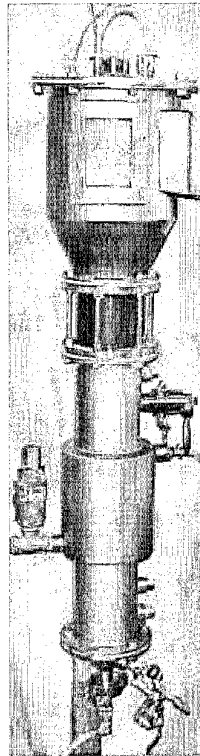
FIG. 16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

13/22

PCT/CA02/00970



5 cm

FIG. 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

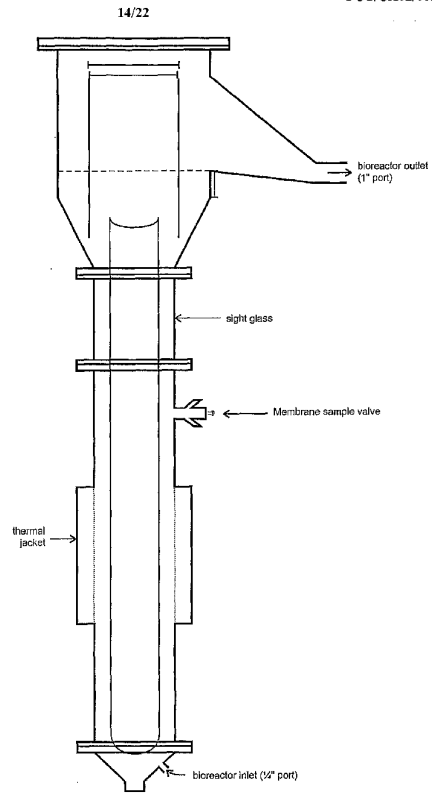


FIG. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/102961

PCT/CA02/00970

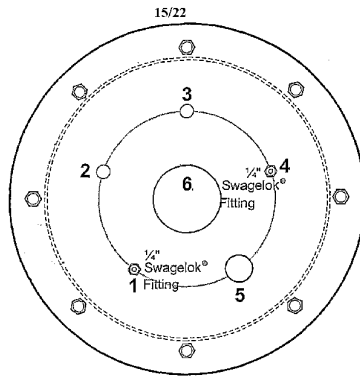


FIG. 19

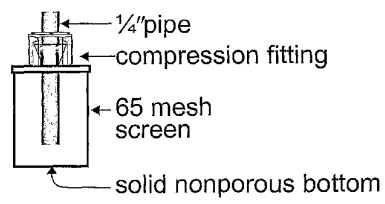


FIG. 20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

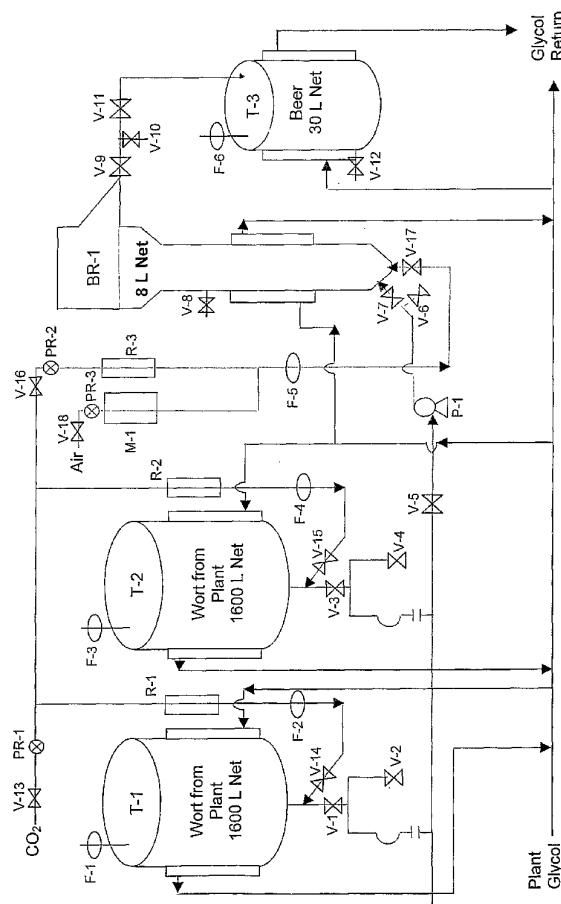


FIG. 21

WO 02/102961

17/22

PCT/CA02/00970

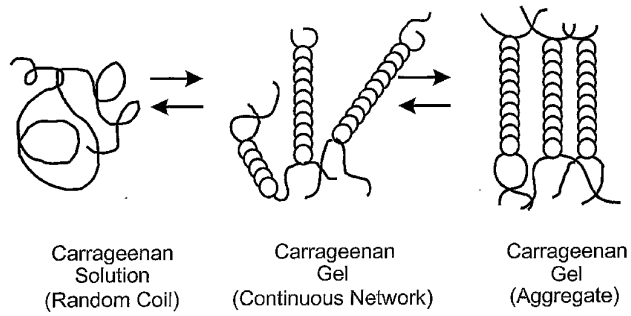


FIG. 22

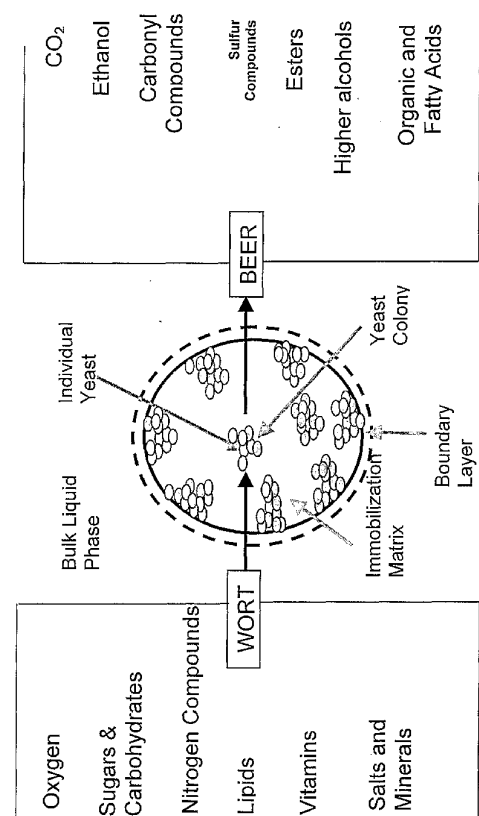


FIG. 23

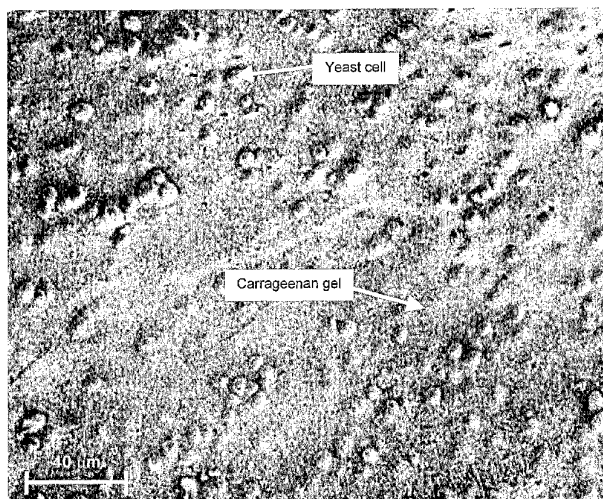


FIG. 24

WO 02/102961

20/22

PCT/CA02/00970

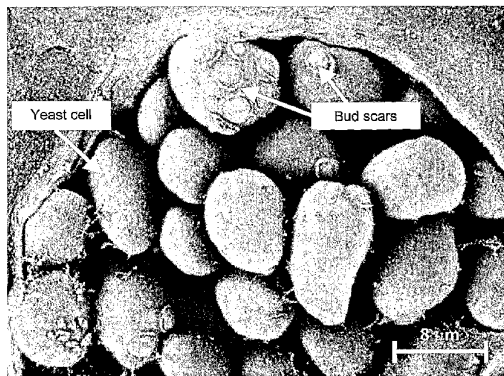


FIG. 25

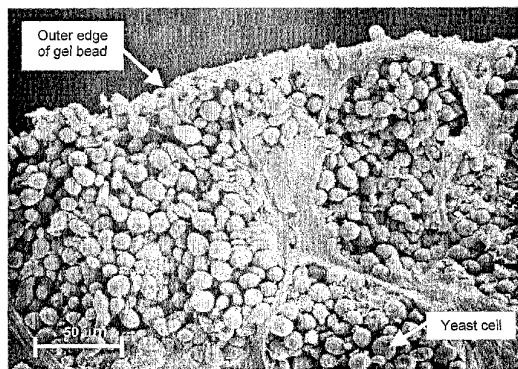


FIG. 26

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

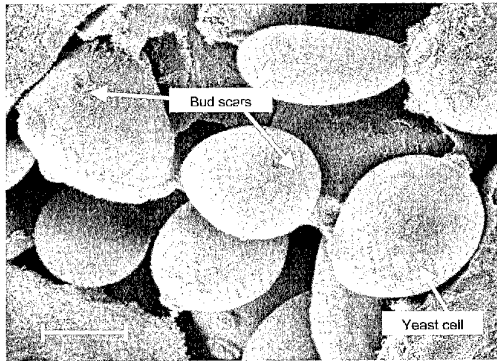


FIG. 27

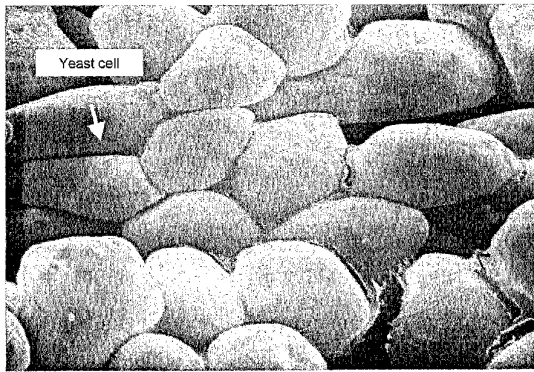


FIG. 28

WO 02/102961

22/22

PCT/CA02/00970

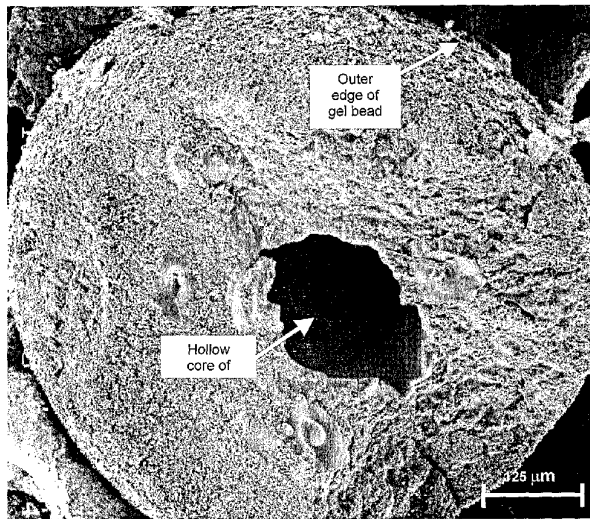


FIG. 29

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102961 A3

- (51) International Patent Classification: C12C 11/02, 11/07, 11/09 (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00970 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 20 June 2002 (20.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/299,153 20 June 2001 (20.06.2001) US
60/299,186 20 June 2001 (20.06.2001) US
- (71) Applicant: LABATT BREWING COMPANY LIMITED [CA/CA]; 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
- Published:
— with international search report
- (72) Inventors: PILKINGTON, Phyllis, Heather; 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
MENSOUR, Normand, Anthony; 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
- (74) Agent: KERR, James W.; Labatt Brewing Company Limited, 303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8 (CA).
- (88) Date of publication of the international search report: 27 February 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/102961 A3

(54) Title: COMBINATION CONTINUOUS/BATCH FERMENTATION PROCESSES

(57) Abstract: In the production of potable alcohols, a continuous fermentation stage is employed to pitch and/or initially ferment a wort containing fermentable sugars. An exemplary continuous stage involves the use of a gas lift bioreactor employing super-flocculant yeast and stringent oxygen control. The continuous stage can then be followed by sending an at least partially fermented discharge from the continuous process to a batch processing stage for finishing.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00970
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12C11/02 C12C11/07 C12C11/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, FSTA, COMPENDEX, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRONLOF J ET AL: "PRODUCTION OF BEER USING IMMOBILIZED YEAST ENCODING A-ACETOLACTATE DECARBOXYLASE" JOURNAL OF THE INSTITUTE OF BREWING, INSTITUTE OF BREWING, LONDON, GB, vol. 98, no. 6, 1 November 1992 (1992-11-01), pages 479-491, XP000311039 ISSN: 0046-9750 page 479, column 2, paragraph 5; table 7 page 480 page 481, column 1, paragraph I --- --/--	1-5, 9-14,16
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 September 2002		Date of mailing of the international search report 18/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2200 PH Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax. (+31-70) 340-2010		Authorized officer Koch, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Original Application No. PCT/CA 02/00970
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LINKO M ET AL.: "Recent advances in the malting and brewing industry" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 65, no. 2-3, 27 October 1998 (1998-10-27), pages 85-98, XP004144915 ISSN: 0168-1656 page 92, column 1, paragraph 4 -page 94; figures 1,4	1-12, 14-16
X	DE 44 30 905 C (METALLGESELLSCHAFT AG) 24 May 1995 (1995-05-24)	1-10
A	the whole document	12
X	PILKINGTON ET AL.: "Kappa-Carrageenan Gel Immobilisation of lager brewing yeast" JOURNAL OF THE INSTITUTE OF BREWING, vol. 105, no. 6, 1999, pages 398-404, XP002212080 page 400, column 1, paragraph 2 page 400, column 2, paragraph 2	1-10
X	EP 0 669 393 A (SAPPORO BREWERIES) 30 August 1995 (1995-08-30) page 3, line 27-43; figure 1; example 1	1-9,15
X	EP 1 106 679 A (SAPPORO BREWERIES) 13 June 2001 (2001-06-13) abstract paragraphs '0033!', '0036!', '0039!', '0046!'	1-5, 9-11,16
X	US 4 929 452 A (HAMDY MOSTAFA K) 29 May 1990 (1990-05-29) column 7, paragraph 1; figures 1,3; examples 1,3	1-5,9,15
P,X	WO 01 98477 A (ARNAUT MARC ;BEKAERT SA NV (BE); ANDRIES MARC (BE); DELVAUX FREDDY) 27 December 2001 (2001-12-27) page 8, line 4-17; claims 11-15 page 11, line 29-32	1-10,15
A	SMOGROVICOVÁ ET AL.: "Reactors for continuous primary beer fermentation using immobilised yeast" BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES, vol. 11, no. 4, 1997, pages 261-264, XP002212356 cited in the application the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/CA 02/00970

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4430905	C	24-05-1995	DE 4430905 C1	24-05-1995
			AT 191235 T	15-04-2000
			AU 695461 B2	13-08-1998
			AU 3078595 A	22-03-1996
			BR 9508814 A	23-12-1997
			CA 2198147 A1	07-03-1996
			CN 1159826 A ,B	17-09-1997
			CZ 9700609 A3	17-09-1997
			DE 59508101 D1	04-05-2000
			DK 779919 T3	04-12-2000
			WO 9606923 A1	07-03-1996
			EP 0779919 A1	25-06-1997
			ES 2146798 T3	16-08-2000
			FI 954090 A	01-03-1996
			GR 3033538 T3	29-09-2000
			JP 10504722 T	12-05-1998
			NZ 290142 A	19-12-1997
			PT 779919 T	31-08-2000
			SK 26197 A3	08-10-1997
			US 6077549 A	20-06-2000
EP 0669393	A	30-08-1995	JP 7123969 A	16-05-1995
			AU 674448 B2	19-12-1996
			AU 7623694 A	27-03-1995
			EP 0669393 A1	30-08-1995
			CA 2147511 A1	16-03-1995
			CN 1114111 A ,B	27-12-1995
			WO 9507343 A1	16-03-1995
			US 2001019731 A1	06-09-2001
EP 1106679	A	13-06-2001	JP 2001008676 A	16-01-2001
			EP 1106679 A1	13-06-2001
			WO 0102534 A1	11-01-2001
US 4929452	A	29-05-1990	NONE	
WO 0198477	A	27-12-2001	AU 8185901 A	02-01-2002
			WO 0198477 A1	27-12-2001

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 フィリス・ヘザー・ピルキントン

カナダ、エヌ６ビー・２エイチ８、オンタリオ、ロンドン、リッチモンド・ストリート３０３番

(72)発明者 ノーマンド・アンソニー・メンサワー

カナダ、エヌ６ビー・２エイチ８、オンタリオ、ロンドン、リッチモンド・ストリート３０３番