

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 820

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12C 11/02 (2006.01)
C12C 11/07 (2006.01)
C12C 11/09 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2004-55**
(22) Přihlášeno: **20.06.2002**
(30) Právo přednosti:
20.06.2001 US 2001 299186
20.06.2001 US 2001 299153
(40) Zveřejněno: **15.12.2004**
(Věstník č. 12/2004)
(47) Uděleno: **08.10.2014**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **19.11.2014**
(Věstník č. 47/2014)
(86) PCT číslo: **PCT/CA2002/000970**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/102961**

(56) Relevantní dokumenty:
(MATTI LINKO ET AL; JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 65; 1998, STR. 85 AŽ 98; RECENT ADVANCES IN THE MALTING AND BREWING INDUSTRY).
EP 13974841 B1; SK 288157.

(73) Majitel patentu:
LABATT BREWING COMPANY LIMITED,
London, Ontario N6B2H8, CA

(72) Původce:
Phyllis Heather Pilkington, London, Ontario
N6B2H8, CA
Normand Anthony Mensour, London, Ontario
N6B2H8, CA

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS Praha a.s., Jívanská 1273/1,
140 21 Praha 4

(54) Název vynálezu:
**Způsob kombinovaného kontinuálního a
periodického kvašení**

(57) Anotace:
Při výrobě alkoholických nápojů se používá stupeň kontinuální fermentace k naočkování a/nebo počátečnímu zfermentování sladiny obsahující zkvasitelné cukry. Kontinuální stupeň například zahrnuje použití bioreaktoru s plynovým výtahem s použitím superflokulentních kvasinek a přísné kontroly kyslíku. Po kontinuálním stupni pak může následovat vedení alespoň částečně zfermentovaného výstupu z kontinuálního procesu pro dokončení do vsázkového zpracovatelského stupně.

CZ 304820 B6

Způsob kombinovaného kontinuálního a periodického kvašení

Oblast techniky

5

Vynález se týká výroby pitných alkoholických produktů, zejména piva a zvláště použití hybridního procesu zahrnujícího zpracovatelské stupně kontinuálního a periodického kvašení.

10 Dosavadní stav techniky

Značný počet nedávných publikací v této oblasti ilustruje velký zájem pivovarnického průmyslu o imobilizaci. V několika přehledných pracích (Enari, 1996; Iserentant, 1995; Masschelein, 1997; Mensour *et al.*, 1997; Stewart, 1996; Virkajarvi & Linko, 1999) o obecném stavu pivovarnického průmyslu je zdůrazněna potenciálně revoluční role imobilizace při výrobě piva. Kromě skupin uvedených v oddílech 3.1 až 3.5 se výzkumem a vývojem imobilizovaných buněk pro pivovarnické aplikace zabývá mnoho dalších institucí. Miller Brewing Company (Duncombe *et al.*, 1996; Tata *et al.*, 1999) ze Spojených států provedla některá předběžná hodnocení na zkušební jednotce Meura Delta, stejně jako bioreaktoru s fluidním ložem, který distribuuje Schott Engineering. Coors Brewing také prováděli předběžné experimenty se systémem Meura Delta.

Slovenská technická univerzita, ve spolupráci s Heinekenem, zkoumala použití pektátu vápenatého v systému výroby piva s pneumatickým výtahem (Domeny, 1996). V poslední době publikovala skupina ze Slovenské technické univerzity o svém probíhající výzkumu několik článků (Smogrovicova *et al.*, 1997; Smogrovicova & Domeny, 1999). Guinness zkoumal původně použití různých adsorpčních nosičů pro imobilizaci a následné kvašení v bioreaktoru s fluidním ložem (Donnelly, 1998). V r. 1999 publikovali Donnelly a kolegové práci, popisující kinetiku metabolismu cukru uvnitř jejich bioreaktoru s fluidním ložem (Donnelly a spol., 1999). Jejich experimentální zařízení zahrnovalo použití porézních skleněných perliček Siran jako imobilizačního nosiče pro kvasinky při vrchním kvašení. Guinness se stal součástí Immocon Consortium, které bylo popsáno v oddílu 2.2.5.

Holsten Brauerei AG a Lurgi AG, oba z Německa, společně vyvinuli a uvedli do provozu pilotní zařízení pro kontinuální výrobu nealkoholického piva (Dziondziak, 1995). Pro kvašení byly použity perličky z alginátu vápenatého v jednostupňovém fermentoru s fluidním ložem (130 l) a pro dealkoholizaci piva byla použita kolona se síťovým dnem (7 síťových den). Celková doba výroby v tomto procesu byla 8,5 h.

Tým z výzkumných laboratoří Sapporo Breweries Ltd. v Japonsku studoval použití imobilizovaných buněk v reaktoru s fluidním ložem pro hlavní kvašení piva. Jejich studie se zabývaly použitím gelových perliček z polyvinylalkoholu (Shindo & Kamimur, 1990), gelových perliček Ca-alginátu (Shindo *et al.*, 1994a), gelových vláken s dvojitou vrstvou (Shindo *et al.*, 1994b) a perliček z chitosanového gelu (Shindo *et al.*, 1994c) jako imobilizačních matric. V posledně uvedené studii se pracovalo s bioreaktorem s pracovním objemem jednoho litru, obsahujícím 25 % obj. perliček Chitopearl® typu II (chitosanové perličky) na kontinuální bázi s ošetřením sladiny glukamylázou. Toto enzymatické zpracování umožnilo, aby vznik acetátu v systému imobilizovaných buněk byl podobný jako při běžném periodickém kvašení, tedy o jeden krok blíže k úpravě produktu.

Výzkumná skupina ze Sappora nyní zaměřila svou pozornost na vývoj fermentoru s fluidním ložem s chitosanovými perličkami, pracujícího v režimu opakovaných vsázek. Systém byl schopen pracovat bez větších problémů 75 dní a kvalita získaného piva byla podobná jako u komerčního produktu. Navločkový kmen se ukázal jako mnohem účinnější než flokulentní kmen (Maeba *et al.*, 2000; Umemoto *et al.*, 1998).

55

Na kongresu EBC konaném v r. 1997 v Maastrichtu byly předneseny dva další přístupy ke snížení diacetylu. Výzkumníci ve Francii (Dulieu et al., 1997) navrhli použití enkapsulované α -acetolaktát dekarboxylázy pro rychlou přeměnu α -acetolaktátu na acetoin. Meura Delta zdůraznila předběžné výsledky použití aluminosilikátového zeolitu jako katalyzátoru pro přímou konverzi acetolaktátu na acetoin za studena (Andries et al., 1997). Pokud se tato opatření ukážou jako účinná a přijatelná pro spotřebitele, mohou se stát realitou levnější alternativy k systémům pro zrání, navrhovaným firmou Cultor a Alfa Leval.

Další neprůmyslový výzkum v oblasti imobilizace pro výrobu piva představují výsledky z Singapore Institute of Standards and Industrial Research, kde bylo studováno použití alginátových gelových částic typu vláken pro použití v reaktoru s vrstvou výplně a bylo shledáno příznivějším než alginátové perličky (Que, 1993). Mafra a kolegové z Universidade do Minho v Portugalsku diskutovali použití superflokulentního kmene kvasinek pro kontinuální zrání piva (Mafra et al., 1997). Stejná výzkumná skupina publikovala také práci o použití svých flokulentních kvasinek ve stoupačkovém bioreaktoru pro produkci ethanolu (Vicente et al., 1999; Domingues et al., 2000).

Použití imobilizace pro výrobu piva se v poslední době věnovali též výzkumníci v různých akademických institucích (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). Technologii imobilizovaných buněk se také věnovaly a v 80. letech výsledky publikovaly výzkumné skupiny z Číny (Chao et al., 1990; Yuan, 1987; Zhang et al., 1988), Ruska (Kolpachki et al., 1980; Sinitsyn et al., 1986) a Československa (Chladek et al., 1989; Curin et al., 1987; Polednikova et al., 1981).

Během přípravných prací pro studie, na nichž se zakládá tento vynález, byly vzaty v úvahu četné literární odkazy. Patří mezi ně:

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 Lacval 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.

Austin, G. D., Watson, R. W. J., Nordstrom, P. A., D'Amorte, 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.
- 5 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.
- 10 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. *Osobní sdělení*.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 *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.
- 35 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.
- 40 Dillenhofer, W., Ronn, D. 1996. Secondary fermentation of beer with immobilized yeast. *Brau-welt 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.
- 45 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* 45: 447.
- 5 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)*, Aukladn 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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., Michales, 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.
- 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., Grenfield, 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.
- 5 Kreger-Van Rij, N. 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Leudeking, R., Piret, E. L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *Journal of Biochemical and Microbial 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 5 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.
- 10 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 Stabilizer for the Food Industry 9*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 218: 345.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50

- 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.
- 5 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.
- 10 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., Eichorn, P., Lustig, S. 1993. Technological approach to improve flavour stability. *MBAA Technical Quarterly* 30: 48.
- 15 Nava Saucedo, J. E., Roisin, C., Barbotin, J.-N. 1996. Complexity and heterogeneity of microenvironments in immobilized systems. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basic and Applications*, Noordwijkerhout 39.
- 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.
- 20 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.
- 25 O'Connor-Cox, E., Mochaba, F. M., Lodolo, E. J., Majara, M., Axccl, 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.
- 30 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., Herbts, N. R. 1992. *A Guide to Fluid Mixing*. New York: Lightnin.
- Opekarova, M., Sigler, K. 1982. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolysis changes in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast). *Folia Microbiologia* 27: 395.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 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.
- 5 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.
- 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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. *Brewer's Guardian*, 126, 26.
- 40 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.
- 45 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.
- 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.
- 10 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.
- 15 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 Various Parameters on Bead Size and their Distribution. *Process Biochemistry*, **24**, 217.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 Cashin, M.-M., 1966. Comparative Studies of Five Porous Supports for Yeast Immobilization by Adsorption/Attachment. *Journal of the Institute of Brewing*, **102**, 5.
- 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.
- 5 Chibata, I., 1979. Immobilized Microbial cells with Polyacrylamide Gel and Carrageenan and their Industrial Applications. American Chemical Society Series, **106**, 1987.
- 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.
- 10 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.
- 15 Decamps, C. & Norton, S., 1994. New Emulsion Process using Static Mixer for the Production of κ -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.
- 20 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. *Bewerage World International*, **34**.
- 25 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, Postdam, Germany*, Poster 12.
- Domingues, L., Lima, N. & Teixeira, J. A., 2000. Contamination of a High-Cell-Density Continuous Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 584.
- 30 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.
- 35 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.
- 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.
- 45 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 Brewing Convention*, **8**, 35.
- 5 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.
- 10 Heggart, H. M., Mergaritis, 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 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.
- 40 Iserentant D., 1995. Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. *Fermented Beverage Production*. (A. H. 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.
- 45 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.
- 5 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 Spirotoovaya Promyshlennost*, **9**.
- Krikilion, Ph., Andries, M., Goffin, O., van Beveren, P. C. & Masschelein, C. A., 1995.
- 10 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.
- 15 Kronlof, J. & Virkajarvi, I., 1996. Main Fermentation with Immobilized Yeast – Pilot Scale *European Brewery Convention Brewing Science Group Bulletin, Zoeterwoude*, 94.
- Kronlof, J., Virkajarvi, I., Storgards, E. L., Londesborough, J. & Dymond, G., 2000. Combined
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- Margaritis, A., 1975. *A Study of the Rotorfermentor and the Kinetics of Ethanol Fermentation*. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- 5 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 Bio-*
 10 *engineering*, **24**, 1483.
- Margaritis, A. & Merchant, F., 1984. Advances in Ethanol Prodction 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. *Development in Industrial Microbiology*, **24**, 329.
- 15 Margaritis, A., te Bokkel, D. & El Kashab, M., 1987. Repeated Batch Fermentation of Ethanol Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a Fluidized Bioreactor Systems. *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
 20 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.
- Margaritis, A. & Wilke, C. R., 1978a. The Rotorfermentor. Part I: Description of the Apparatus,
 25 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
 30 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 Fermentor for the Continuous Production of Beer. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **21**,
 35 28.
- Masschelein, C. A. & Andries, M., 1996b. Meura-Delta's Immobilized Yeast Fermentor 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
 40 Density Pitching Yeast Suspensions. *Proceedings of he 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.
- 45 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 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.
- 25 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.
- 30 Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A. & Mitsui, S., 1993. Beer Brewing Using and 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 5 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.
- 10 Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **38**, 39.
- 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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 Institue of Brewing Convention, Victoria Falls*, 159.
- 30 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.
- 35 Shindo, S. & Kamimur, M., 1990. Immobilization of Yeast with Holllow 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.
- 40 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.
- 45 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 Spiritovaya 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.
- 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., Manuel, M., Guerra, B., Machado Cruz, J. M. & Sa Almeida, A. M., 1991. The Influence of Cell Wall Composition of a Brewer's Focculent 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 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. Goosens & C. A. Masschelein, 1991b. High Performance Immobilized Yeast Reactor Design for Continuous Beer Foundation. *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.
- 5 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.
- 10 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 Möglichkeiten mit Immobilisierter Hefe. *Brauwelt*, **136**, 2140.
- 15 Wackerbauer, K., Fitzner, 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.

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

5 Podstata vynálezu

Vynález se týká způsobu výroby alkoholických nápojů, který zahrnuje stupeň kontinuální fermentace, který se používá k zakvašování a/nebo alespoň zahájení fermentace sladiny obsahující zkvasitelné cukry.

Vynález zejména poskytuje výhodný postup, při němž se provádí kontinuální fermentace s použitím bioreaktoru s plynovým výtahem, využívajícího flokulentního (a zejména vysoce flokulentního nebo superflokulentního) kmene kvasinek a uplatňujícího přísnou kontrolu kyslíku.

Ve zvlášť výhodném provedení vynálezu se „alespoň částečně fermentovaný“ výstup z kontinuálního procesu vede do vsázkového stupně pro konečnou úpravu (která v kontextu patentových nároků může zahrnovat – avšak není na to omezena – dokončení fermentačního procesu, při němž kvasí sacharidy na alkohol).

Vynález se týká výroby piva (včetně zejména světlých piv, ležáků, a zvláště piv severoamerického typu). V této souvislosti viz například *Essentials of Beer Style* – F. Eckhardt.

Postup podle nároku 1, v němž se kontinuální stupeň provádí v bioreaktoru s plynovým výtahem:

V souladu s kontinuálním stupněm, použitelným v různých provedeních vynálezu, je výhodné používat imobilizované buňky (v kontrastu k čistě volným buňkám), a to je možno provádět s použitím zvoleného typu kvasinek imobilizovaných na nosiči nebo flokulujících. Bez ohledu na právě uvedené je však výhodné používat flokulující kvasinky spíše než imobilizované na nosiči, a zvlášť výhodné pro tento účel jsou superflokulující kvasinky.

Další podrobnosti ohledně výhodných provedení a výhod spojených s kontinuálními procesy jsou uvedeny v průběhu podrobného popisu vynálezu. Patří mezi ně použití umělých (tj. kontrolovaných) plyných směsí a použití dusíku, oxidu uhličitého a kyslíku, stejně jako vzduchu.

Navíc jsou zde uvedeny další podrobnosti ohledně vsázkového zpracovatelského stupně. Je třeba zdůraznit, že v některých provedeních vynálezu vsázkový stupeň překračuje koncept „dokončení“ přeměny zkvasitelných sacharidů na alkohol (která může být v každém případě prakticky dokončena v kontinuálním stadiu zpracování). V těchto provedeních je primárním cílem vsázkového stupně vyrovnání chuti (čili remediac), zejména v souvislosti s diacetylem a acetaldehydem.

Výhodná provedení vynálezu umožňují distribuci zakvašené a/nebo alespoň částečně fermentované sladiny po kontinuálním stupni pomocí distribučního rozvodu (ať už jako pevného rozvodu nebo selektivním spojováním a rozpojováním potrubí) mezi větším počtem vsázkových tanků. V procesu se sériovou distribucí se naplní jeden tank, pak druhý, a tak dále. Ve zvlášť výhodném provedení je kapacita prosazení kontinuálního reaktoru uvedena do souladu, pokud jde o velikost a počet příslušných nádob, se zádržnou kapacitou vsázky, takže kapacita výrobního průtoku je v průběhu času vyrovnána. Ideálně se ze vsázkových nádob dokončený produkt vypouští právě v době čištění, načež se znovu napojí a naplní z trvalého přítoku z kontinuálního fermentačního stupně.

V souladu s dalším aspektem vynálezu jsou některá provedení speciálně upravena z hlediska obsahu kyslíku ve sladince nebo pivu. To se týká jak kontinuálního, tak vsázkového stupně procesu. S ohledem na kontinuální stupeň má koncentrace kyslíku různé účinky, ale zejména může být žádoucí ji minimalizovat za účelem optimalizace konverze vyšších alkoholů na aromatizační

aktivní estery. V této souvislosti je nutno poznamenat, že koncentrace vyšších alkoholů může zůstat vsázkovým stupněm do značné míry neovlivněna, takže, je-li to žádoucí, použije se přísná kontrola O_2 k vyrovnání chuti přiboudlinových esterů. V této souvislosti může být užitečné propláchnutí sladiny pomocí CO_2 před kontinuální fermentací.

5

V jednom provedení vynálezu je primárním účelem kontinuálního stupně zpracování zajistit zakvašení v dále navazující vsázkové fermentaci.

10 Podrobný popis:

Dále je uveden podrobný popis vynálezu ve dvou částech.

15 Popis obsahuje grafy, vzorce, obrázky apod. nebo na ně odkazuje, přičemž každý je označen názvem „obr.“ a konkrétním identifikačním číslem. Dále se odkazuje na připojené výkresy, na nichž jsou obrázky označeny symbolem „Obr.“ a příslušným identifikačním číslem. Předměty znázorněné na výkresech nemusejí mít přesné měřítko.

20 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 představuje proudové schéma pilotního kontinuálního fermentačního zařízení, jehož jednotlivé součásti jsou shrnuty v tabulce 5.1.

25 Obr. 2 představuje schematický diagram pilotního bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou o objemu 50 l (gas-lift draft tube, GLDT).

Obr. 3 představuje průřez reaktorem na obr. 2 včetně umístění vnitřní sací trubky, jakož i vnitřního separátoru.

30

Obr. 4 představuje podrobný náčrt horního nástavce bioreaktoru z obr. 2.

Obr. 5 představuje podrobný náčrt těla bioreaktoru z obr. 2.

35 Obr. 6 představuje podrobný náčrt konického dna bioreaktoru z obr. 2.

Obr. 7 představuje podrobný náčrt trubkového rozdělovače plynu bioreaktoru z obr. 2. Do trubky rozdělovače o průměru 1,27 cm bylo navrtáno celkem 160 děr (průměr 0,16 cm) v odstupu mezi středy 0,8 cm a s délkovým odstupem 0,6 cm.

40

Obr. 8 představuje diagram kontinuální perličkové produkce s použitím statických míchadel (patentová přihláška firmy Labatt. č. 2,133,789).

Obr. 9 znázorňuje skleněné perličky Siran[®], dodávané firmou Schott Engineering.

45

Obr. 10 znázorňuje křemelinové perličky Celite[®], dodávané firmou World Minerals.

Obr. 11 znázorňuje κ-karagenanové gelové perličky, vyráběné v laboratořích firmy Labatt Brewing Company Limited („Labatt“).

50

Obr. 12 je řada obrázků, znázorňujících, neflokulentní, resp. řetězíci, resp. flokulentní kvasinky. Snímky byly pořízeny mikroskopicky zaostřovanou kamerou se zvětšením 100 X.

Obr. 13 je mikroskopický snímek středně flokulentního kmene kvasinek LCC3021 se zvětšením 100 X.

55

Obr. 14 je mikroskopický snímek superflokulentního kmene kvasinek LCC290 se zvětšením 100 X.

5 Obr. 15 představuje schematický diagram procesu výroby kappa–karagenanových gelových perliček se statickým míchadlem. Ve statickém míchadle prochází tekutina míchadlem (nikoli míchadlo tekutinou), což umožňuje míchat tekutiny, které jsou čerpány potrubím.

10 Obr. 16 představuje další schéma bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou pro primární fermentaci piva.

Obr. 17 představuje fotografii skutečného bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou z obr. 15.

15 Obr. 18 představuje podrobný náčrt 13litrového (tj. pracovního objemu 8 l) bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou z obr. 16.

20 Obr. 19 představuje podrobný náčrt horního nástavce bioreaktoru, kde: 1–odvod kapaliny pro kyslíkové čidlo; 2–topné hnízdo pro teplotní čidlo, spojené s termostatickým ovladačem; 3–teplotní sonda; 4–zpětný vstup kapaliny pro kyslíkové čidlo; 5–inokulační vstup; 6–membránový vzorkovací vstup s nerezovým víkem.

Obr. 20 představuje profil odvodu kapaliny pro kyslíkové čidlo s plnicí jednotkou ponořenou v kapalně fázi bioreaktoru.

25 Obr. 21 představuje podrobné schéma a náčrt kontinuální primární fermentace piva v bioreaktoru s plynovým výtahem (podrobný popis zařízení viz tabulka 5.1).

Obr. 22 představuje schéma mechanismu želatinace karagenanu (upraveno podle Reese, 1972).

30 Obr. 23 představuje schéma využití složek sladiny imobilizovanými kvasinkami během primární fermentace.

Obr. 24 je snímek kappa–karagenanových gelových perliček, obsahujících imobilizované ležákové kvasinky, v době 0 fermentace.

35 Obr. 25 je snímek skupiny ležákových kvasinek, zachycených v kappa–karagenanové gelové perličce, po dvou dnech vsázkové fermentace, ukazující jizvy po klíčcích na jednotlivých kvasinkách.

40 Obr. 26 je snímek vnějšího okraje kappa–karagenanové gelové perličky, ukazující ležákové kvasinky po dvou měsících kontinuální fermentace.

Obr. 27 je snímek ležákových kvasinek ve vnější oblasti kappa–karagenanové gelové perličky po dvou měsících kontinuální fermentace.

45 Obr. 28 je snímek ležákových kvasinek ve středu kappa–karagenanové gelové perličky po dvou měsících kontinuální fermentace.

50 Obr. 29 je snímek celé kappa–karagenanové gelové perličky po šesti měsících kontinuální fermentace; mnoho popraskaných perliček mělo dutý střed.

Podrobný popis – Část 1:

Příprava kmene kvasinek a inokula

- 5 Fermentace používané v této práci používaly polyploidní kvasinky z čeledi *Saccharomyces cerevisiae* (označované také jako *Saccharomyces uvarum* a/nebo *Saccharomyces carlsbergensis*). Pivovarnická obec tyto kvasinky obvykle označuje jako kvasinky pro spodní kvašení, produkující piva typu ležák. Tato charakteristika se zakládá na schopnosti ležákových kvasinek usadit se a oddělit se od kapaliny po dokončení fermentace. Pivovarské kvasinky, na rozdíl od ležákových, stoupají k vrcholu fermentační nádoby, a jsou proto známy jako kmen pro vrchní kvašení.
- 10 Schopnost kvasinek se usazovat nebo stoupat není nutně závislá na tom, zda jde o ležákový nebo pivovarský typ, ale je specifická pro kmen. Ležákové kvasinky typicky nekvasí při teplotách nad 34 °C, zatímco pivovarské kvasinky nemohou zkvašovat melibiózu. Tuto charakteristiku používají vědci k rozlišení ležákových a běžných pivovarských kvasinek (McCabe, 1999).
- 15 Jak při fermentacích se samovolně se shlukujícími volnými kvasinkami, tak při fermentacích s imobilizací κ -karagenanem byl použit středně flokulentní kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 3021 ze sbírky kultur Labatt Culture Collection. Pro pokusy s použitím superflokulentních kvasinek jako imobilizantu byla použita varianta kmene LCC3021, totiž kmen LCC290.
- 20 Čisté kvasinkové kultury byly kryogenně skladovány při –80 °C v mrazáku umístěném v odd. technologického vývoje firmy Labatt. Podle potřeby byla aerobně předpěstována sterilní očka kvasinkové kultury při 21 °C na agarových plotnách PYG (3,5 g peptonu, 3,0 g kvasinkového extraktu, 2,0 g KH_2PO_4 , 1,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20,0 g glukózy a 20,0 g agaru, rozpuštěno v destilované vodě do objemu 1 litru). Izolované kolonie kvasinek pak byly přeneseny
- 25 do zkumavek obsahujících 10 ml pasterizované sladiny a inkubovány 24 h za míchání při 21 °C. Toto inokulum bylo postupně zvětšeno až na objem 5 l přidáváním výše uvedené kultury k příslušnému objemu sladiny (10 ml k 190 ml, 200 ml k 800 ml a 1 l ke 4 l). Tato násada pak byla přenesena centrifugační nádobky a podrobena odstředění při 10 000 min^{-1} a 4 °C po dobu 10 min. Ze získaných vlhkých pelet pak byla odebírána požadovaná hmota pro všechny další fermentace (30 % w/v).
- 30

Fermentační médium

- 35 Jako živné prostředí pro všechny fermentace byla použita ležáková sladina průmyslové kvality, vyrobená v pivovaru Labatt London. V této práci se odkazuje na měrnou hustotu sladiny, vyjadřovanou ve stupních Plato (°P). Vztah mezi měrnou hustotou a °P popisuje rovnice 4.1.

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

- 40 Sladina, používaná vždy v této práci, měla 17,5 °P, což odpovídá měrné hustotě 1,072.

- 45 Tabulka 4.1 poskytuje typický uhlohydrátový profil této sladiny, měřeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), popisovanou v sekci 4.7.2. Přibližně 73 % sacharidů v této sladině je zkvasitelných, přičemž kvasinky použité v této studii nemohou snadno zpracovat 27 % sacharidů s delším řetězcem.

Tabulka 4.1. Typické uhlohydrátové složení sladiny použité ve fermentačních pokusech. Sladina byla vyrobena pivovarem Labatt London a měla měrnou hustotu naměřenou jako 17,5 °P.

	průměr (g/l)	variační koeficient (%)	zkvasitelné (%)	nezkvasitelné (%)
fruktóza	3,3	18,0	1,9	
glukóza	16,5	4,3	9,3	
maltóza	87,7	10,1	47,8	
maltotrióza	25,2	10,8	14,2	
maltotetróza	6,4	18,3		3,6
polysacharidy	41,1	9,1		23,2
celkem	177,2		73,2	26,8

5 Variační koeficient pro většinu analyzovaných látek se pohybuje mezi 10 % a 20 %. Tato variabilita je z velké části důsledkem použitého průmyslového procesu, stejně jako variability surovin od várky k várce.

Typy imobilizace

10 Během tohoto výzkumu byly testovány tři typy – imobilizace – zachycení, adsorpce a samoshlukování. Pro nosiče z průmyslových zdrojů jsou nejprve uvedena data dodavatele a pak jsou doplněna vlastní laboratorní analýzou. Snímky a distribuce velikostí zkoumaných nosičů (pokud jsou k dispozici) jsou zde uvedeny na jiném místě.

15 V poloprodučním bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou byly testovány dva typy adsorpčních matic. Zde jsou uvedeny snímky obou těchto nosičů. Nosič z perliček sintrovaného skla, Siran[®], poskytl Schott Engineering. Vybrané částice měly průměr 1 až 2 mm, měly otevřené póry pro imobilizaci kvasinek s objemem pórů 55 až 60 % a distribucí velikosti pórů mezi 60 a 300 µm, což je vhodná velikost pro kvasinky. O tomto typu nosiče se uvádí, že je biologicky a chemicky stabilní, snadno se čistí, je opakovaně použitelný, dá se sterilizovat párou, nekompak-
20 tuje a je chuťově neutrální, a tudíž je schválen pro potraviny.

World Minerals of California dodali sférický nosič, tvořený křemelinou. Tento nosič poskytoval výhody tepelné a chemické stability, mechanické pevnosti a tuhosti. Křemelina, základní surovina, se v pivovarském průmyslu běžně používá pro filtraci piva. Nosič Celite[®] R-632 byl navr-
25 žen specificky pro imobilizaci celých buněk.

Specifikace dodavatele:

Rozmezí velikosti: 0,595 mm až 1,41 mm (frakce 14/30 mesh)
Střední průměr pórů: 7,0 µm
30 Celkový objem pórů: 1,19 cm³/g
Hustota zhuštěného lože: 0,334 kg/m³

35 Kappa-karagenanové gelové perličky, nosič zachycovacího typu, byly vyrobeny v laboratořích Labatt Brewing Company Ltd. Výrobní proces je popsán v sekci 5.2 a výsledky tohoto výrobního procesu jsou uvedeny v sekci 6.2.1.

Nejjednodušší typ imobilizace, samoshlukování (autoagregace), byl umožněn volbou kmenů kvasinek, které jsou schopny vločkovat. Průmyslové ležákové kvasinky LCC3021 mají přiroze-

nou schopnost vložkování a považují se za středně flokulentní kmen. Jak fermentace postupuje, tvoří se v kapalném prostředí malé chomáčky kvasinek, o rozměru od 0,5 mm do 1,0 mm. Kvasinky LCC290, což je varianta ležákových kvasinek LCC3021, tvoří mnohem větší vločky (od 1,0 mm do 5,0 mm v závislosti na intenzitě míchání), a proto se označují jako superflokulentní kvasinky. Snímky různých vloček kvasinek jsou zde uvedeny.

Postup odebrání vzorků

Jak fermentace postupovaly, bylo nutno v různých časových intervalech odebírat vzorky z fermentující kapaliny. Za tím účelem byly od Scandi-brew® zakoupeny sterilní vzorkovací ventily. Tyto ventily jsou vyrobeny z nerezové oceli a jsou vybaveny komorou (vymezenou horním a spodním vstupem), v níž je možno uchovávat ethanol za účelem udržení aseptického prostředí. Před odebráním vzorku se ethanol z komory vypustí odstraněním pojistného uzávěru ze spodního hrdla. Komora se propláchne čerstvým ethanolom (75 % obj.) a pak se umístí uzávěr na horní vstup ventilu. Pak se vytáhne páka ventilu a do sterilizované nádoby se odebere přibližně 50 ml kapalného vzorku. Druhý vzorek se odebere pro fermentace s použitím superflokulentních kvasinek, aby bylo možno před spočtením buněk provést řádnou deflokulaci. Jakmile je odebrání vzorků dokončeno, promyje se komora ventilu horkou vodou a peroctovou kyselinou a pak nakonec ethanolom. Na spodní hrdlo se umístí pojistný uzávěr a komora se naplní ethanolom, čímž je připravena pro příští odběr vzorků.

Mikrobiologické monitorování

Počítání a životnost volných kvasinek metodou methylenové modři

Nejprve se výše uvedenou metodou z fermentačního média odeberou kapalně vzorky obsahující volně suspendované kvasinky. Pro počítání počtu kvasinek se použije přístroj Hemacytometer společnosti Hauser Scientific Company s objemem 10^{-4} ml ve spojení se světelným mikroskopem. Kapalně vzorky se ředí destilovanou vodou tak, aby bylo dosaženo celkového počtu 150 až 200 kvasinek ve sledovaném poli. Různé faktory, které ovlivňují charakteristiky životnosti a životaschopnosti kvasinek, popisuje Heggart et al. (1999).

Ke stanovení životnosti ve vorku byla použita metoda barvení methylenovou modří, popsaná American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Živé kvasinky mohou skvrnu methylenové modři oxidovat, a tak ji odbarvit. Naпротив tomu mrtvé kvasinky se barví modře. Při přípravě methylenové modři pro stanovení životnosti byly použity tyto chemikálie:

Roztok A: 0,1 g methylenové modři v 500 ml destilované vody

Roztok B: 13,6 g KH_2PO_4 v 500 ml destilované vody

Roztok C: 2,4 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml destilované vody

Pak byla připravena methylenová modř s pufrům Fink-Kuhles smísením 500 ml roztoku A s 498,75 ml roztoku B a 1,25 ml roztoku C na konečnou směs o pH 4,6.

Ve zkumavce byla připravena směs zředěné suspenze buněk a důkladně promíchána. Poté, co byla ponechána několik minut odpočinout (zajišťuje kontakt mezi kvasinkami a barvivem), byla kapka kapaliny umístěna mezi počítací sklo hemacytometru a krycí destičku (definovaný objem). Procento životaschopných kvasinek bylo vypočteno spočtením živých i mrtvých kvasinek ve čtecím poli a podělením počtu živých kvasinek jejich celkovým počtem.

4.5.2. Počítání imobilizovaných kvasinek – autoagregace

Použijí-li se kvasinky s tendencí tvořit vločky, stává se přesné určení počtu kvasinek, přítomných v kapalném vzorku, obtížným, protože kvasinky mají tendenci se usazovat v odběrní nádobě. Pro

získání reprezentativního vzorku bylo použito deflokulační činidlo. Za účelem získání reprezentativního počtu bylo při těchto experimentech použito 0,5 % obj. roztoku kyseliny sírové k destabilizaci flokulovaných kvasinek. Byl použit stejný postup počítání a stanovení životnosti jako v sekci 4.5.1, přičemž destilovaná voda jako ředidlo byla nahrazena kyselinou sírovou.

5

Počítání imobilizovaných kvasinek – gelové perličky

Předtím, než bylo provedeno počítání buněk kvasinek zachycených na gelu, bylo nutno gelovou maticí narušit pomocí zařízení Polytron® (Brinkmann Instruments). Vzorek perliček se nejprve 10 nechal projít sterilním sítím (velikost ok 500 µm mesh) a pak se propláchl sterilní vodou. Do 50 ml kontejneru na vzorky se pak přidal 1 ml gelových perliček se zachycenými kvasinkami a 19 ml destilované vody. Pomocí zařízení Polytron® se pak gel fyzicky rozrušil a uvolnil kvasinky do roztoku. U tohoto vzorku pak bylo provedeno počítání a zjišťování životnosti, popsané v sekci 5.5.1.

15

Monitorování kontaminace

Všechny fermentace, prováděné v této práci, byly pravidelně monitorovány z hlediska kontaminace. Monitorovací program sestával z alespoň jedné kontroly kapaliny v 50l kontinuálních fermentorech a sladiny v zásobních nádobách za týden. Vzorky kapaliny byly odebrány aspekticky 20 a pak nanášeny na kultivační plotny s agarem Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories) a 10 mg/l cykloheximidu. Tyto zkušební vzorky pak byly až 10 dní inkubovány při 28 °C jak v aerobních, tak anaerobních podmínkách. Požadované anaerobní prostředí pro růst bylo vytvořeno tak, že se vybrané plotny umístily do nádob obsahujících balíček AnaeroGen® (Oxoid), který 25 odstraňuje z nádoby veškerý zbylý kyslík. Použití indikátorového proužku (barví se růžově, je-li přítomen kyslík) nám umožnilo ověřit, že prostředí je opravdu anaerobní. Touto metodou lze detekovat bakteriální příměsi, jsou-li v kapalném vzorku přítomny.

Detekce divokých či nepivovarských kvasinek vyžadovala zvláštní růstové médium, které 30 nepodporuje růst bakteriálních či pivovarských kvasinek. Pro selektivní umožnění růstu potenciálních divokých kvasinek byly použity nálevové plotny preparované kvasinkovým médiem (YM, Difco Laboratories), doplněným 0,4 g/l CuSO₄ (inkubace při 25 °C po dobu 7 dní). Po 7 dnech inkubace kapalného vzorku, naneseného na agaru PYN (Peptone Yeast-Extract Nutrient, Difco Laboratories) při 37°C byla možná detekce neležákových pivovarských kvasinek. Růst ležákových 35 kvasinek je při teplotách nad 34 °C inhibován, takže pokud dojde na těchto plodinách k růstu, indikuje to kontaminaci běžnými pivovarskými kvasinkami.

Analytické metody

40 Veškeré relevantní zařízení bylo podrobeno příslušné kalibraci, jak předepisují standardní průmyslové postupy.

Ethanol

45 Koncentrace ethanolu v pivu a fermentujících vzorcích byla analyzována metodou plynové chromatografie podle Technical Committee a Editorial Committee, American Society of Brewing Chemists (1992). Odplyněný vzorek kapaliny byl kombinován s vnitřním standardem 5 % v/v isopropanolu a 0,2 µl této směsi bylo nastříknuto do plynového chromatografu Perkin Elmer 8500. Přesné nastavení GC je patrné z dále uvedeného seznamu:

50 Plamenový ionizační detektor (FID)

Automatický vzorkovač Dynatech

Náplň Chromosorb 102, 80–100 mesh

Nosný plyn helium s průtokem 20 ml/min

Teplota injektoru 175 °C, teplota detektoru 250 °C, teplota kolony 185 °C isotermně.

Uhlohydráty

Koncentrace glukózy, fruktózy, maltózy, maltotriózy, maltotetrózy, polysacharidů a glycerolu byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (systém Spectra–Physics SP8100-XR HPLC). K oddělování těchto sacharidů při jejich vymývání v systému byla použita kationto-
 5 výměnná kolona (Bio–rad Aminex HPX–87K) s dihydrogenfosforečnanem draselným jako mobilní fází. Pak bylo stanoveno množství sloučenin pomocí detektoru indexu lomu s vytvořením příslušných píků sloučenin. HPLC byla prováděna s protitlakem 5 520 kPa (800 psi), teplotou kolony 85 °C a teplotou detektoru 40 °C. Vzorky byly odplyněny a zředěny na příslušnou úroveň. Do systému pak byla zavedena injekce 10 µl s průtokem 0,6 ml/min.

10 V pivovarském průmyslu se ke stanovení celkové hladiny sacharidů v kapalině běžně používá jiné metody. Pomocí densimetru Anton Paar DMA–58 byla změřena specifická hmotnost kapaliny, vyjádřená ve stupních Plato. Přefiltrované a odplyněné vzorky pak byly přeneseny do speciální skleněné trubky tvaru U, která pak byla podrobena elektronické oscilaci. Byla měřena frekvence oscilace v kapalině a pak korelována se specifickou hmotností kapaliny (g/100 g nebo °P).
 15 Je třeba zdůraznit, že toto měření je aproximací celkové koncentrace uhlohydrátů ve vzorku (nebo specifické hmotnosti), protože kalibrace se provádějí na vodných roztocích sacharózy při 20 °C, jejichž specifická hustota je stejná jako měřené sladiny.

20 Vicinální diketony

Celkové koncentrace diacetylu (2,3–butandionu) a 2,3–pentandionu byly stanoveny pomocí plynového chromatografu Perking Elmer 8310, opatřeného detektorem elektronového zachytu. Jako nosný plyn bylo použito 5 % methanu v argonu s průtokem 1,0 ml/min a vzorek byl nanesen na kolonu J & W DB–Wax. Teplota injektoru se udržovala na 105 °C, zatímco teplota detektoru
 25 byla nastavena na 120 °C. Analýza byla usnadněna automatickým horním vzorkovačem Hewlett Packard 7694E. Kvantifikace byla provedena odhadnutím plochy píku zvolené složky vzorku a vztážením na kalibrační křivku vnitřního standardu 2,3–hexandionu.

Pro zjištění „celkové“ koncentrace těchto sloučenin bylo nejprve nutno vzorky kalibrovat na
 30 65 °C a pak je na této teplotě 30 min ponechat. Takovéto zpracování vzorků před analýzou umožnilo přeměnu α–acetolaktátu a α–hydroxybutyrátu na odpovídající diketony, diacetyl a 2,3–butandion.

Estery a vyšší alkoholy

35 Některé nejvýznamnější chuť dodávající sloučeniny, detekované v pivu, byly měřeny pomocí plynové chromatografie. Acetaldehyd, ethylacetát, isobutanol, 1–propanol, isoamylacetát, isoamylalkohol, ethylhexanoát a ethyloktanoát byly kvantifikovány s použitím n–butanolu jako vnitřního standardu. Byl použit plynový chromatograf Hewlett Packard 5890, vybavený plamenovým ionizačním detektorem, horním automatickým vzorkovačem HP 7994 a kapilární kolonou
 40 J&W DB–Wax. Teplota injektoru byla nastavena na 200 °C a teplota detektoru byla 220 °C. Teplotní profil píčky byl následující: 40 °C po dobu 5 min, vzestup ze 40 °C na 200 °C rychlostí 10 °C/min, vzestup z 200 °C na 220 °C rychlostí 50 °C/min a nakonec prodleva při 220 °C po dobu 5 min. Heliový nosný plyn s průtokem 6,0 ml/min byl doplněn heliovým doplňkem 30 ml/min (193 kPa, 28 psig), proudem vodíku 50 ml/min (172 kPa, 25 psig) a proudem vzduchu
 45 300 ml/min (241 kPa, 35 psig). Celkový cyklus GC pro smyčku vzorku 1 ml činil 40 minut.

Další analýzy

Na kapalině z fermentoru, která byla podrobena stárnutí a balení, bylo podle potřeby prováděno několik dalších analytických měření. Analýzy dokončeného produktu byly prováděny oddělením
 50 kvality firmy Labatt podle standardů hotového piva. Základem těchto měření byly metody popsané Technical Committee a Editorial Committee, American Society of Brewing Chemists (1992). Seznam těchto analýz, stejně jako stručný popis příslušných měření, je uveden v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2. Analýza kontroly kvality

Specifikace	Popis
Vzduch	Celkový vzduch vnesený během balicího procesu; specifikace je méně než 1 ml
Oxid uhličitý	Hladina saturace zanesená do produktu; udávaná jako % se specifikací 2,75 %
Oxid siřičitý	Množství oxidu siřičitého v pivu měřené pomocí GC; cíl <10 mg/l
Dimethylsulfid	Množství dimethylsulfidu (vůně vařené kukuřice) v pivu měřeno GC; cíl <70 µg/l
Hořkost	Množství hořčin dodaných pivu chmelem; měření alfa-kyselin v pivu; 1 jednotka hořkosti (BU) je ekvivalentní ~1 mg/l alfa-kyselin.
Barva	Barva piva měřená spektrofotometricky; absorbance vzorku při 430 nm pro světelnou dráhu 12,7 mm (0,5 inch)
pH	Měřeno kalibrovaným pHmetrem; $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$
Zdánlivý extrakt	Množství dostupného rozpustného podílu v kapalině bez kompenzace vlivu alkoholu na relativní hustotu kapaliny; měřeno hydrometrem a udáváno jako °P; AE
Skutečný extrakt	Totéž jako zdánlivý extrakt kromě toho, že pro tento experiment se bere v úvahu alkohol; RE
Vypočtený původní extrakt	Založeno na Ballingově experimentu, že 2,0665 g extraktu produkuje 1,0000 g alkoholu; $\text{COE} = 100 * [(2,0665 * (\% \text{ w/w alkohol}) + \text{RE}) / (100 + 1,0665 * (\% \text{ w/w alkohol}))]$
Zákal za tepla	Zákal přítomný v pivu při pokojové teplotě (21 °C) bez narušení sedimentu; hodnotí se nefelometrickou metodou založenou na rozptylu světla a udává se jako jednotky turbidity Formazin (Formazin Turbidity Unit, FTU); specifikace je < 200 FTU
Počáteční zákal za studena	Zákal vzniklý v pivu, jestliže se ochladí z pokojové teploty (21 °C) na 0 °C bez narušení sedimentu; měřicí

	metoda jako výše; specifikace je <100 FTU
Pěna	Měření pěničího potenciálu piva pomocí zařízení NIBEM; pěna se tvoří kontrolovaným způsobem a zaznamenává se rychlost padání pěny; specifikace >170 vteřin

Měření sedimentace kvasinek – lcc290

5 Příprava zkušební vzorku kvasinek

Superflokulentní kvasinky (LCC290) byly pěstovány ve sladince, jak je popsáno v sekci 4.1. Toto inokulum pak bylo odstředováno 15 min při 4 °C a 10000 min⁻¹ za účelem získání pelety kvasinek pro další inokulaci. Sladina byla, jak je popsáno v sekci 4.2, pasterizována 60 min při 100 °C a pak byl 1 l asepticky přenesen do 6 X 2l sterilizovaných třepacích baněk. Každá třepací banka byla naočkována 4 g odstředěných kvasinek. Baněk byly umístěny na třepačku běžící rychlostí 135 min⁻¹ (okolní teplota 21 °C) a ponechány fermentovat. V časových intervalech 24 h, 40 h, 48 h, 64 h, 71 h a 192 h byla odebrána jedna banka. V každém intervalu byl odebrán malý vzorek kapaliny pro analýzu uhlohydrátů a měření koncentrace a životaschopnosti kvasinek (použité metody jsou popsány v kapitole 4). Zbylá směs kapaliny a kvasinek byla podrobena měření sedimentace kvasinek, popsanému v sekci 4.7.2.

Měření sedimentace kvasinek

Rychlost usazování kmene LCC290 superflokulentních kvasinek byla měřena následující metodou. Každý vzorek byl ponechán fermentovat až do požadovaného intervalu, jak je popsáno v sekci 4.7.1. V předepsaném okamžiku byla odebrána příslušná banka se vzorkem. Vzorky byly promíchány, aby se zajistilo, že všechny částice jsou suspendovány. Obsah banky pak byl okamžitě přenesen do 1000 ml odměrného válce. Jak se vločky usazovaly, byla měřena v 30sekundových intervalech vzdálenost mezi povrchem kapaliny a rozhraním vločka–kapalina. Rychlost usazování (settling rate) byla vypočtena podle následující rovnice:

$$\text{Settling rate} = \frac{\Delta H}{\Delta t} = \frac{(H_0 - H_t)}{(t - t_0)} \quad (5.1)$$

Pomocí standardní Kynchovy metody (1952) byla z křivek usazování získaných pro každý interval fermentace sestavena křivka rychlosti usazování versus koncentrace kvasinek.

Metody měření cirkulace a rychlostní míchání

Za účelem měření doby míchání a rychlosti cirkulace uvnitř třífázového bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou byl použit systém vstřikování kyseliny napojený na systém shromažďování dat. Při aplikaci pulsu silné kyseliny do bioreaktoru bylo možno vypočítat jak rychlost cirkulace, tak dobu míchání na základě monitorování změn pH v průběhu času a jejich přiřazení rovnicím uvedeným v sekci 3.2.2. Systém shromažďování dat sestával z:

pH sondy Ingold (Cole–Parmer, kat. #P–05990–90), napojené na čidlo pH Ingold na bázi mikroprocesoru (Model 2300)
karty pro překlad dat DT2805
osobního počítače 386DX

a programu shromažďování dat Quick Basic (autoři C. Hudson a J. Beltrano, 1994, modifikace N. Mensour, 1998).

5 Do prstencové sekce bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou bylo těsně pod umístěním sondy pH nastříknuto 10 ml 10 N kyseliny chlorovodíkové (diagram na obr. 5.5). Tato vzdálenost odpovídala výšce 26 cm pod horní deskou. Před zahájením veškerých experimentů smícháním byla pH sonda podrobena dvoubodové kalibraci ověřenými standardními pufrů (zelený pufr Beckman pH 7,0 a červený pufr Beckman pH 4,0). Proud 4 až 20 mA, produkovaný pH-metrem, byl napojen na svorkovnici, kde byl proud přeměněn na napětí, které pak bylo měřeno kartou pro shromažďování dat, umístěnou uvnitř počítače. Program shromažďování dat byl zahájen současně s nástřikem kyseliny. Doba sběru dat byla 5 min při frekvenci odběru vzorků 50 Hz. Velikost pole v programu byla nastavena na 3750 (celkem sebráno 15000 bodů) se ziskem 1 nastaveným pro kartu shromažďování dat.

15 Shromážděná data byla přenesena z laboratoře na silnější počítač (mikroprocesor Pentium II) pro další analýzu. Pro analýzu dat byl použit program TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Kanada), který je schopen pracovat s velkými soubory dat a kromě toho má četné zabudované funkce pro manipulaci s daty (vyrovnávání dat, konstrukce křivek atd.). K eliminaci šumu byl na původní data aplikován algoritmus Sevizky–Golay, metoda vyrovnávání v časové oblasti založená na bikvadratickém polynomiálním vyrovnávání metodou nejmenších čtverců v pohyblivém okně. Vyvážená data pak byla nastavena tak, aby odrážela změnu pH místo skutečně naměřené hodnoty pH. Nastaveným datům pak byla přizpůsobena slábnoucí sinusoidová funkce. Z přizpůsobovacích parametrů pak byly vypočteny doby míchání a rychlosti cirkulace.

25 Tyto míchací experimenty byly prováděny při skutečných fermentacích uvnitř bioreaktoru s plynovým výtahem o objemu 50 l, ve kterém byl přítomen jeden ze tří imobilizačních nosičů (superflokulentní kvasinky LCC290, středně flokulentní kvasinky LCC3021 nebo κ -karagenanové gelové perličky). Kapalnou fází tvořilo fermentované pivo o specifické hustotě 2,5 °P a plynná fáze byla tvořena oxidem uhličitým. Teplota fermentace byla kontrolována na 15 °C. Povrchová rychlost distribuovaného plynu se pohybovala mezi 2,0 a 6,0 mm/s. Systém se ponechal 10 min ekvilibrovat při daném průtoku plynu. Pak byl zahájen test nástřiku kyseliny, který byl třikrát opakován. Byla zvolena další hodnota průtoku plynu a pH směsi uvnitř reaktoru bylo nastaveno zpět na výchozí hodnotu.

35 Konstrukce bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou v pilotním měřítku

Fementační systém bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou

40 Systémy fluidního lože se sací trubicou (draft tube fluidized bed, DTFB) prokázaly svou hodnotu pro použití ve trojfázových systémech. V experimentálním pivovaru společnosti Labatt Brewing Company Ltd. byly za účelem provedení experimentální části pro tuto práci navrženy, postaveny a instalovány dva identické bioreaktory s plynovým výtahem a sací trubicou v pilotním měřítku. Kromě toho bylo několik existujících nádob modifikováno pro skladování sladiny a odběr piva. Celkový proces, použitý v těchto poloprovozních experimentech s kontinuální fermentací, je znázorněn na proudovém schématu na obr. 1 a v tabulce 5 je zařízení zobrazené na obr. 1 podrobněji popsáno.

55 S
ladina byla dodávána ze závodu London Brewing potrubím z nerezové oceli o průměru 5,08 cm a vedena do skladovacích tanků o pracovním objemu 1600 l (WT1 a WT2). Systém dvou tanků umožňoval kontinuální dodávku živného prostředí do poloprovozních kontinuálních fermentorů (R1 a R2). Každá nádrž je vybavena rozdělovacím systémem pro oxid uhličitý pro kontrolu kyslíku a homogenity a chladicím pláštěm s glykolovým systémem pro kontrolu teploty. Tento centrální zdroj živné půdy byl nastaven tak, aby pomocí rozdělovacího systému (V7, V8 a V9) obsluhoval až 3 nezávislé fermentory. Dodávání předepsaného množství sladiny do pilotních bioreaktorů (R1 a R2) bylo prováděno pomocí peristaltických čerpadel Masterflex (P1 a P2).

Tabulka 5.1. Popis jednotlivých částí zařízení zobrazeného na obr. 5.1

<i>Položka</i>	<i>Popis</i>
Vzduch	Dodávka 690 kPa (100 psig) ze závodu London
CO ₂	Dodávka 690 kPa (100 psig) oxidu uhličitého ze závodu London
F1	Sterilní filtr na vstupu oxidu uhličitého
F2	Sterilní filtr na vstupu oxidu uhličitého
F3	Sterilní filtr na odvětrávacím ventilu WT1
F4	Sterilní filtr na odvětrávacím ventilu WT2
F5	Sterilní filtr na vstupu míchacího plynu
F6	Sterilní filtr na vstupu míchacího plynu
F7	Sterilní filtr na výstupu WBT1
GLR	Zpětné potrubí glycerolu; 173 kPa (25 psig)
GLS	Příváděcí potrubí glycerolu; 311 kPa (45 psig)
NV1	Jehlový ventil oxidu uhličitého
NV2	Jehlový ventil oxidu uhličitého
NV3	Jehlový ventil na vstupu vzduchu
NV4	Jehlový ventil na vstupu oxidu uhličitého
NV5	Jehlový ventil na vstupu vzduchu
NV6	Jehlový ventil na vstupu oxidu uhličitého
P1	Peristaltické napájecí čerpadlo Masterflex pro R1
P2	Peristaltické napájecí čerpadlo Masterflex pro R2
PR1	Tlakový regulátor oxidu uhličitého
PR2	Tlakový regulátor oxidu uhličitého
PR3	Tlakový regulátor vzduchu
PR4	Tlakový regulátor oxidu uhličitého
PR5	Tlakový regulátor vzduchu
PR6	Tlakový regulátor oxidu uhličitého
R1	Pilotní bioreaktor s plynovým výtahem a sací trubicí; pracovní objem 50 l

<i>Položka</i>	<i>Popis</i>
R2	Pilotní bioreaktor s plynovým výtahem a sací trubicou; pracovní objem 50 l
RM1	Rotametr oxidu uhličitého; stupnice 0 až 20 scfh
RM2	Rotametr oxidu uhličitého; stupnice 0 až 20 scfh
RM3	Rotametr vzduchu; stupnice 0 až 2,5 scfh
RM4	Rotametr oxidu uhličitého; stupnice 0 až 10 scfh
RM5	Rotametr vzduchu; stupnice 0 až 2,5 scfh
RM6	Rotametr oxidu uhličitého; stupnice 0 až 10 scfh
V1,V2,V3	Klapkové uzávěry na vstupu/výstupu WT1
V4,V5,V6	Klapkové uzávěry na vstupu/výstupu WT2
V7,V8,V9	Kulový ventil na rozdělovací hlavě sladiny
V10,V11	Kulové ventily na vstupu sladiny do R1
V12	Pohotovostní odpojovací ventil na vstupu míchacího plynu
V13	Klapkový uzávěr na výstupu R1
V14,V15	Kulové ventily na vstupu sladiny do R2
V16	Pohotovostní odpojovací ventil na vstupu míchacího plynu
V17	Klapkový uzávěr na výstupu R2
V18	Klapkový uzávěr na výstupu WBT1
WBT1	Tank na vyfermentovanou půdu; pracovní objem 200 l
WT1	Skladovací tank sladiny opatřený glykolovým pláštěm a zařízením pro probublávání; pracovní objem 1600 l
WT2	Skladovací tank sladiny opatřený glykolovým pláštěm a zařízením pro probublávání; pracovní objem 1600 l

5 Plyný oxid uhličitý a vzduch byly do systému plynového výtahu vháněny trubkovými rozdělovači z nerezové oceli (obr. 7). Průtok nástříků do systému se monitoroval rotamery (RM3, RM4, RM5 a RM6). Na plynových potrubích byly instalovány sterilní filtry (velikost oka 0,2 μm), aby se zabránilo vstupu kontaminujících nečistot do bioreaktorů. Produkt odtékal z reaktoru přepadovým systémem (obr. 4). Dobu zdržení kapaliny tedy kontrolovalo pouze napájecí čerpadlo. Oba reaktory (R1 a R2) byly napojeny na tank na vyfermentovanou půdu (WBT1), který jímá přepadající kapalinu. Pro jímání produktu a zpracování podle potřeby byly použity speciální 50l tanky.

10 Podrobnější diagramy a přesné rozměry tohoto 50l pilotního bioreaktoru jsou uvedeny v sekci 5.1.1. Postup zpracování a skladování sladiny je uveden v sekci 5.1.2 a postup čištění a sterilizace systému kontinuální fermentace jsou diskutovány v sekci 5.1.3. Sekce 5.1.4 popisuje postup fermentace, používaný v celém tomto textu.

15 Konstrukce a specifikace reaktoru

20 Bioreaktor o pracovním objemu 50 l, navržený pro tuto práci, byl zhotoven výhradně z nerezové oceli 304L se čtyřmi plexisklovými průzory, umístěnými v tělese reaktoru tak, aby bylo možno pozorovat pohyb částic a tekutin. Konstrukční materiál byl zvolen pro svou odolnost vůči dezinfekčním chemikáliím (louh a kyselina), stejně jako vůči sterilizaci párou. Dalším významným aspektem konstrukce byla minimalizace závitových součástí v přímém kontaktu s fermentační

půdou. Místo toho byly vstupy svařeny, a kde to bylo nutné, byly použity sanitární armatury TriClover. Reaktor byl konstruován s rozšířenou horní oblastí pro maximalizaci uvolňování plynu a tím podporu lepšího přenosu hmoty kapalina–pevná látka (Chisti & Moo–Young, 1993). Spodní část reaktoru byla konstruována s kuželovým úhlem 90° pro minimalizaci usazování pevného podílu na dně.

Obr. 2 představuje schematický diagram 50l poloprovozních systémů, které byly instalovány v pokusném pivovaru společnosti Labatt. Tento diagram znázorňuje umístění vstupu míchacího plynu, vstupu kapaliny, glykolového chladicího pláště, výstupu produktu, systému snímání a kontroly teploty, a rovněž umístění dvou sanitárních vzorkovacích vstupů. Obr. 3 je schéma stejného GLDT bioreaktoru s rozměry uvedenými v cm. Obr. 4 až 6 jsou podrobné nákresy 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou v řezu a obr. 7 je schéma rozdělovacího zařízení plynu, použitého v těchto experimentech.

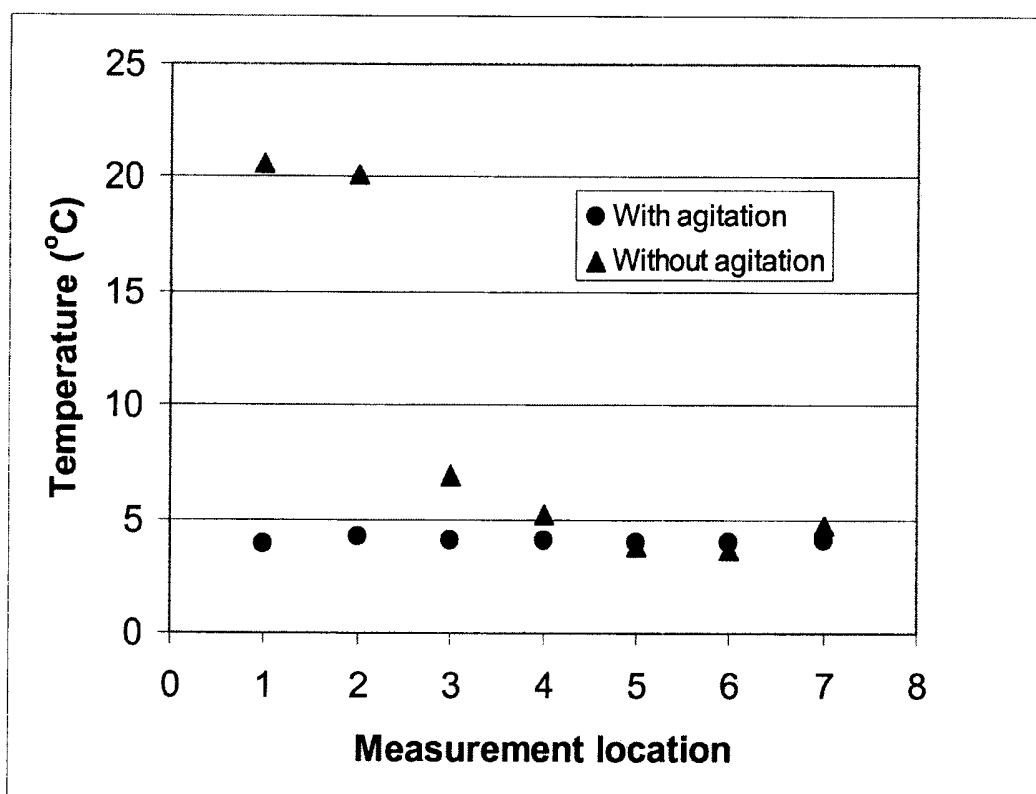
Vnitřní sací trubka a rozdělovač částic (narážka) jsou zobrazeny na obr. 3. Na základě údajů z literatury (Chisti, 1991) byl zvolen poměr průměru sací trubky k průměru reaktoru 2/3. Rozměry rozdělovače částic byly zvoleny tak, aby umožňovaly lepší oddělení plynu od směsi kapalina–pevná látka. Zvětšením průměru tohoto usměrňovacího zařízení (20,32 cm oproti průměru sací trubky 10,16 cm) je možno získat větší diferenciál mezi rychlostí stoupání bublin a rychlostí sestupu směsi kapalina–pevná látka. Strhávání plynu do prstence systému sací trubky se sníží a dosáhne se lepšího přestupu hmoty pevná látka–kapalina.

K nástřiku míchacího oxidu uhličitého do sekce sací trubky byl navržen trubkový rozdělovač (obr. 7). Do rozdělovače o průměru 1,27 cm bylo navrtáno celkem 160 otvorů o průměru 0,16 cm. Otvory byly rozmístěny s podélnou roztečí od středu ke středu 0,8 cm a šířkovou roztečí mezi středy 0,6 cm (8 řad po 20 otvorech). Průměr otvoru 0,16 cm byl vybrán proto, že primární funkcí plynu je míchání.

Postup zpracování a skladování sladiny

V tradiční kvasné praxi se sladina neuchovává delší dobu, aniž by byla zakvašena kvasinkami. Okysličená sladina je vynikajícím růstovým médiem pro mnoho organismů včetně kvasinek. Protože postup fermentace pro kontinuální systémy s plynovým výtahem vyžadoval přítomnost velkého množství sladiny, bylo nutno vyvinout postupy dopravy a uchovávání sladiny. Názor výzkumníků byl, že neokysličenou sladinu je možno skladovat až dva týdny, aniž by došlo k poškození kontaminací, jestliže se sladina řádně přenesla do uskladňovací nádoby.

Bylo rovněž považováno za nutné zajistit, aby u sladiny, jakmile je v uskladňovací nádobě, byla řádně kontrolována teplota. Tanky, které byly k dispozici v pokusném pivovaru, byly původně navrženy pro kvašení, nikoli pro uchovávání sladiny. Byl proveden test schopnosti těchto tanků uchovávat teplotu nepohybující se kapaliny. Obr. 2 zřetelně ukazuje, že tyto tanky nemohou být používány bez míchání, má-li být dodržena konstantní teplota 4 °C. Do tanků byla vnesena sladina při teplotě 4 °C. Na několika místech po celé nádobě byla prováděna měření teploty za účelem lepšího pochopení skutečných teplotních poměrů. Pokud byla kapalina ponechána v nádobě 24 h bez míchání, stoupla její teplota blízko hladiny na přibližně 20 °C. Teplota kapaliny ve středu tanku rovněž mírně stoupla ($\Delta T \sim 3$ °C), zatímco v kuželovém dně tanku zůstala blízko původním 4 °C.



OBR. 5.8. ÚČINEK MÍCHÁNÍ PLYNEM NA TEPLOTNÍ PROFIL VE VÁLCOVĚ-KUŽELOVÉM TANKU NA SLADINU. SLADINA BYLA DO TANKU UVEDENA PŘI TEPLOTĚ 4 °C. MĚŘENÍ BYLA PROVÁDĚNA 24 H PO NAPLNĚNÍ TANKU. OXID UHLIČITÝ BYL DO NÁDOBY VHÁNĚN S PRŮTKEM 0,113 CM³/H. TEPLOTA OKOLÍ BYLA 19,8 °C. UMÍSTĚNÍ MĚŘIDEL: (1) VRCH TANKU U STĚNY; (2) VRCH TANKU VE STŘEDU; (3) STŘED TANKU U STĚNY; (4) STŘED TANKU VE STŘEDU; (5) VRCH KUŽELOVÉHO DNA U STĚNY; (6) VRCH KUŽELOVÉHO DNA VE STŘEDU; (7) DNO KUŽELOVÉ ČÁSTI

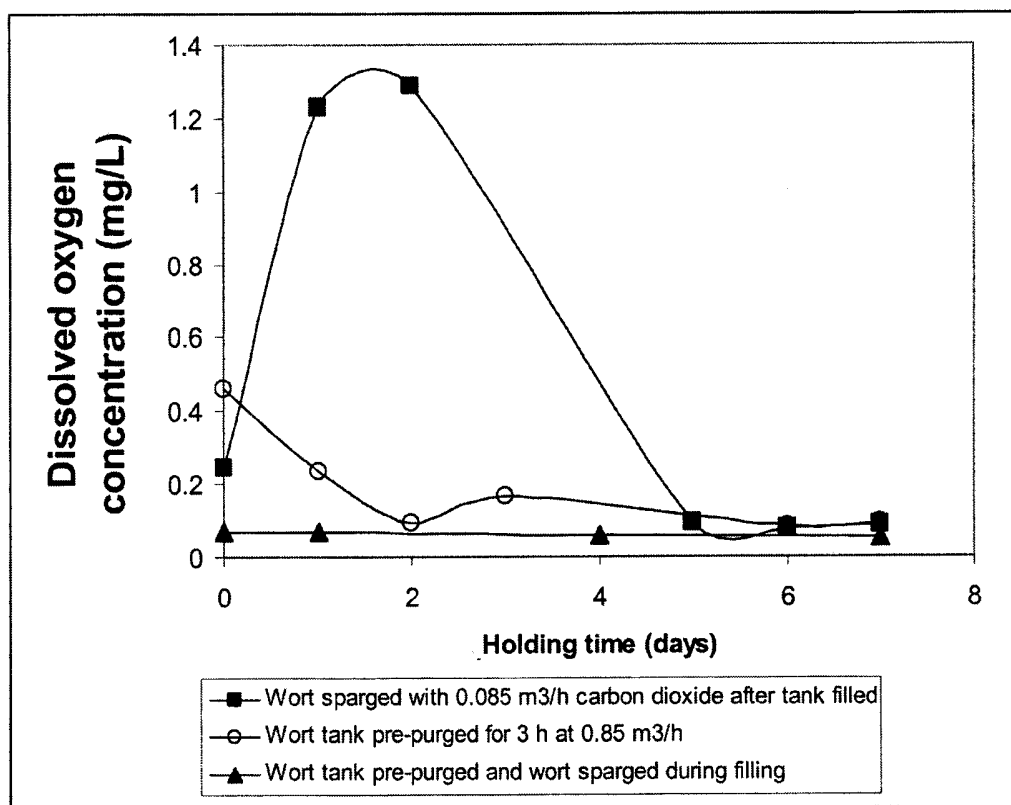
Zavedením mírného míchání vstřikováním oxidu uhličitého s průtokem 0,133 cm³/h bylo možno udržovat teplotu sladiny ve skladovací nádobě na 4 °C. Na základě těchto zjištění byly obě skladovací nádoby na sladinu vybaveny na spodu kuželové části sanitárním potrubím 2,54 cm určeným pro míchání sladiny.

Neprovzdušněná sladina pak byla ze zařízení Labatt London převedena trubkou z nerezové oceli 5,08 cm do vyrovnávací nádrže. Z této nádrže procházela sladina přes bleskový pastér do jednoho z uchovávacích tanků na sladinu (WT1 nebo WT2), kde byla skladována až 2 týdny při 2 °C. Tento pasterizační krok byl zařazen jako předběžné opatření pro eliminaci nežádoucích mikroorganismů ve sladině během celé doby uchovávání. Při použití neokysličené sladiny je minimalizováno poškození sladiny kyslíkem (tvorba aldehydů). Navíc bylo možno pomocí vzduchu přiváděného spolu s míchacím plynem přísně kontrolovat přívod kyslíku do kontinuálních fermentorů.

Měření rozpuštěného kyslíku bylo prováděno vzápětí poté, jakmile byla sladina umístěna do uchovávací nádoby. Obr. 5.9 znázorňuje koncentraci rozpuštěného kyslíku ve sladině v závislosti na čase po přemístění sladiny třemi postupy. V prvním případě byla sladina přenesena do uchovávací nádoby a bylo zahájeno přivádění oxidu uhličitého (0,085 m³/h) k zajištění správné kontroly teploty. Koncentrace kyslíku, rozpuštěného ve sladině, během prvního dne rostla až na při-

bližně 1,3 mg/l a pak se postupně snižovala až na přibližně 0,1 mg/l pátý den. Při druhém pokusu byla uchovávací nádoba na sladinu před naplněním 3 h proplachována proudem 0,85 m³/h oxidu uhličitého. Počáteční pohlcování kyslíku se silně snížilo a sladina se žádoucím obsahem kyslíku (< 0,1 mg/l) byla získána během 2 dní.

5



OBR. 5.9. KONTROLA ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU VE SLADINĚ BĚHEM PŘENOSU ZE ZAŘÍZENÍ LONDON PLANT. BYLY HODNOCENY TŘI POSTUPY, Z NICHŽ TŘETÍ BYL PROSTOU KOMBINACÍ OBOU PŘEDCHOZÍCH. TEPLOTA SLADINY BYLA UDRŽOVÁNA NA 4 °C.

V konečném pokusu byl tank předem propláchnut výše popsáním způsobena při procesu plnění, stejně jako po dobu uchovávání byl přiváděn nepřetržitý proud oxidu uhličitého (0,085 m³/h). Během fáze uchovávání byl obsah rozpuštěného kyslíku udržován na minimu (<0,1 mg/l). Tato metoda pak byla aplikována jako závazný postup pro veškerý další odběr sladiny.

10

5.1.2. Postup čištění a sterilizace

15 Tanky na uchovávání sladiny byly podrobeny cyklu čištění, který zahrnoval předběžné mytí horkou vodou (85 °C), čištění louhem (40% louh o teplotě 60 °C) a následné mytí opět horkou vodou (85 °C). Dezinfekce nádob byla prováděna kontaktem stěn s roztokem kyseliny peroctové (2 % w/v). Potrubí pro rozvod sladiny bylo podrobeno stejnému režimu čištění a dezinfekce.

20 50l bioreaktory byly čištěny a sterilizovány odlišným postupem. Systémy byly propláchnuty horkou vodou (60 °C) a pak naplněny až nahoru vodou 40 °C teplou. K této vodě pak byl přidán průmyslový čistící prostředek Diversol CX/A (DiverseyLever, Kanada), aby vytvořil roztok 2 % w/v. Do dna reaktoru byl vháněn vzduch s povrchovou rychlostí plynu 5 mm/s pro zajištění řádného rozpuštění a řádného kontaktu s reaktorem. Po 1 h kontaktu byl reaktor vyprázdněn a propláchnut pitnou vodou. Tento čistící postup byl opakován ještě podruhé a nakonec byly provedeny dva cykly naplnění studenou pitnou vodou a vyprázdnění.

25

Odpadní a vyfermentovaná půda byla čištěna 2% w/v roztokem Diversol CX/A. Na rozdíl od bioreaktorů s plynovým výtahem nebylo použito míchání plynem, protože WBT nebyl opatřen rozdělovačem. Mechanické míchání bylo prováděno nakláněním nádoby na bok. Cyklus byl opakován dvakrát a následovaly dva cykly naplnění vodou a vyprázdnění.

5

Před parní sterilizací byly 50l bioreaktory napojeny na nádobu na vyfermentovanou půdu a byl odpojen přívod sladiny, stejně jako přívod míchacího plynu. Ventily V10, V11, V12, V13, V14, V15, V16, V17 a V18 byly otevřeny a filtry F5, F6 a F7 byly odstraněny. Tato plynová potrubí a filtry byly odděleny autoklávovány po dobu 15 min při 121 °C. K ventilům V12 a V16 byl připojen přívod páry. Parní ventil byl otevírán pomalu, aby se minimalizovalo poškození zařízení, a pečlivě byla monitorována teplota uvnitř reaktoru. Jakmile bylo dosaženo vnitřní teploty 100 °C, byla provedena 1–h sterilizace. Nejprve byly uzavřeny ventily V10, V11, V14, V15 a V18. Pak byl uzavřen přívod páry a byl připojen sterilizovaný filtr F7. K přívodnímu potrubí plynu byly okamžitě připojeny sterilizované filtry F5 a F6 a byl zahájen přívod oxidu uhličitého s povrchovou rychlostí 3 mm/s. Tento proud plynu nejen zajišťuje, že se reaktory nezhroutí během chlazení, ale rovněž vytěsňuje veškerý vzduch, přítomný v 50l bioreaktorech s plynovým výtahem.

10

Přívodní potrubí sladiny bylo k reaktoru připojeno, jakmile bylo dosaženo vnitřní teploty 20 °C. S ventily V2, V5, V10 a V14 v dosud uzavřené poloze a s otevřenými ventily V6, V7, V8, V9, V11 a V15 byl přívod páry napojen buď na V3 nebo V6, podle použitého přívodu sladiny. Parní cyklus trval 1 h, po které byly ventily V9, V11 a V15 uzavřeny současně s přívodem páry. Jakmile potrubí dosáhlo teploty místnosti (20 °C), byly ventily V3 a V6 uzavřeny a byl odpojen přívod páry. V tomto okamžiku byl celý systém kontinuálního kvašení, včetně zásoby sladiny, 50l bioreaktorů a tanku na vyfermentovanou půdu, sterilní a připraven ke kvašení.

25

5.1.3. Postup fermentace

30

Pro kontinuální primární kvašení pivovarské sladiny na pivo byly použity poloprovozní 50l bioreaktory s plynovým výtahem a sací trubicou. Kontrola teploty byla zajištěna glykolovým tepelným pláštěm, přičemž cílem byla teplota kapaliny během celé fermentace 15 °C. Každý reaktor byl vybaven teplotní sondou pro účely měření a tepelným termočlánekem a glykolovým solenoidovým ventilem pro nastavení přítoku glykolu do reaktoru. Tyto fermentory s plynovým výtahem byly vybaveny také plynem pro primární míchání (oxid uhličitý nebo dusík), stejně jako přívodem kyslíku pro dávkování kyslíku. Požadovaná směs plynů byla zvolena nastavením příslušné kombinace rotometru a jehlového ventilu a průchodem této plynné směsi sterilním filtrem (Millipore, Millex®-FG₅₀, filtrační jednotka 0,2 µm) a do sací trubky bioreaktoru. Vzduch byl pro všechny fermentace do reaktoru nastříkovan s povrchovou rychlostí 0,39 mm/s (0,4 scfh), zatímco průtok primárního míchacího plynu byl nastaven tak, aby odpovídal konkrétnímu typu imobilizace.

40

Před zahájením kontinuálního provozu bylo v 50l bioreaktoru s plynovým výtahem aplikováno tradiční vsázkové zahájení. Po vyčištění a sterilizaci postupem popsáním v sekci 5.1.2 byl bioreaktor s plynovým výtahem naplněn 50 l sladiny z uchovávacích tanků na sladinu (WT1 nebo WT2) a pak bylo sterilním vzorkovacím vstupem Scandi-Brew® nastříknuto 200 g kvasinek (4 g/l). V případě κ-karagenanových gelových perliček bylo do reaktoru nastříknuto 20 l perliček, což poskytlo počáteční koncentraci středně flokulentních kvasinek LCC3021 4 g/l. Z bioreaktorů byly denně odebírány vzorky a pečlivě byl monitorován vývin diacetylu a specifická hmotnost kapaliny. Jakmile dosáhla specifická hmotnost minimální hodnoty a koncentrace diacetylu poklesla pod 30 µg/l, byl systém posouzen jako vhodný pro zahájení kontinuálního provozu.

50

Fermentační médium (sladina) bylo kontinuálně přiváděno ze dna reaktoru, zatímco mladé pivo přepadávalo nálevkou na vrchu reaktoru. Jakmile se ustálil pracovní objem reaktoru, byla průměrná doba zdržení kapaliny regulována průtokem čerstvé sladiny do reaktoru. Z reaktoru byly denně odebírány pomocí sterilního vzorkovacího ventilu (Scandi-Brew®) vzorky kapaliny pro chemickou a mikrobiologickou analýzu (metody jsou popsány v kapitole 4).

55

Ve zvolených časových intervalech byl z 50l fermentačního bioreaktoru odebírán produkt fermentace ve větším množství (40l sterilní nádoby z nerezové oceli) a podroben dokvašovacímu zpracování za účelem získání hotového prodejného piva pro hodnocení a srovnání s průmyslově vyrobeným kontrolním pivem. Zvolený 50l bioreaktor byl odpojen od nádoby na vyfermentovanou 5
půdu a ihned napojen na jímací nádobu na pivo. Jakmile byla zachycena požadovaná kapalina, byl bioreaktor napojen opět na nádobu na vyfermentovanou půdu. Odebraná mladina byla podrobena dokvašovací prodlevě za účelem snížení obsahu diacetylu v kapalině pod 30 µg/l. Kvasinky, unášené kapalinou, byly ponechány se usadit a kapalina (koncentrace kvasinek ~ 1 až 10
5 milionů kvasinek/ml) byla ponechána zrát v chladném skladu (7 dní při 2 °C). Po ukončení zrání byla kapalina přefiltrována, zředěna na 5 % obj. alkoholu, nasycena oxidem uhličitým a plněna do pivních lahví o objemu 341ml. Veškerá takto balená kapalina pak byla podrobena pasteurizaci v zařízení závodu Labatt.

5.2. Kontinuální postup výroby gelových perliček

15 Cílem této sekce experimentální práce bylo zhodnotit kontinuální postup výroby perliček pro výrobu gelových perliček inokulovaných kvasinkami pro dodávání imobilizovaných kvasinek LCC3021 do 50l kontinuálních bioreaktorů s plynovým výtahem a sací trubicou, popsanych v sekci 5.1.

20 Výrobní proces (obr. 8) zahrnoval nejprve vytvoření emulze mezi nevodnou kontinuální fází (rostlinný olej) a vodnou dispergovanou fází (κ–karagenanový gelový roztok smíchaný s kvasinkami) s použitím statických míchadel. Po tomto stupni následovalo rychlé ochlazení k vyvolání gelovatění polymeru. Vzniklé perličky pak byly uvedeny do roztoku chloridu draselného, který 25
podpořil vytvrzení a zároveň oddělení perliček do olejové fáze.

Tvorba emulze κ–karagenanových gelových perliček byla prováděna ve vodní lázni s kontrolovanou teplotou 37 °C, aby se zabránilo předčasnému zgelovatění karagenanového gelu. Před zahájením imobilizace byl sterilizovaný polymer udržován na vodní lázni s kontrolovanou teplotou 30
37 °C a kvasinkové inokulum bylo uchováváno při 20 °C. Gel a suspenze kvasinek byly s použitím peristaltických čerpadel Masterflex (Cole Parmer Company, USA), čerpány skrze 24 prvků statického míchadla o průměru 6,4 mm, aby se zajistila rovnoměrná dispergace kvasinek v gelu. Sterilizovaný olej, skladovaný při teplotě místnosti, byl čerpán (peristaltické čerpadlo Masterflex) do horké vodní lázně, aby se dosáhlo též teploty 37 °C.

35 Inokulovaný polymer (vodná fáze) byl pak v další řadě statických míchadel smísen s olejem (kontinuální fáze) na požadovanou emulzi. Tato vzniklá emulze byla v lázni voda/led rychle ochlazená na 5 °C, což vyvolalo gelovatění kapiček polymeru na perličky. Perličky pak byly vedeny do sterilního roztoku chloridu draselného o koncentraci 22 g/l, který podpořil jejich vytvrzení a umožnil jejich oddělení od olejové fáze. Použitá olej byl recyklován zpět do procesu a 40
vodná fáze (perličky a roztok chloridu draselného) byla před napuštěním do 50l bioreaktorů přenesena do zvláštní nádoby pro velikostní klasifikaci.

5.2.1. Statické míchadlo – typ Kenics

45 V centru tohoto nového výrobního procesu perliček jsou statická míchadla Kenics (Cole Parmer Instrument Company, Niles, Illinois, USA). Jsou tvořena řadou statických prvků, umístěných v trubce, jejíž vnitřní průměr je ekvivalentní průměru statického míchadla. Tyto prvky tvoří zkřížené kanálky, které podporují rozdělování a podélnou rekombinaci kapaliny proudící statickým 50
míchadlem. Tímto míchacím systémem je dále provokováno příčné lámání těchto jemně vytvořených proudových linií do stále homogennější emulze. Tabulka 5.2 shrnuje tři typy statických míchadel, která byla použita v této studii.

Tabulka 5.2. Popis použitých statických míchadel Kenics (dodal Cole Parmer)

Model	Průměr statického míchadla D (mm)	Počet prvků (N_r)
G-04667-04	6,4	12
G-04667-06	9,5	12
G-04667-08	12,7	12

5 5.2.2. Materiály pro výrobu gelu

Dvěma hlavními surovinami pro výrobu gelových perliček byly olej a polymer. κ -Karagenan (typ X-0909, lot 330360, Copenhagen Pectin, Dánsko), polysacharidový polymer získávaný z řas ruduch, byl laskavým darem od Copenhagen Pectin A/S. Tento polymer má jedinečnou vlastnost tepelného gelování, kdy je jeho teplota želatinace závislá na koncentraci κ -karagenanu ($[Car]$) i chloridu draselného ($[KCl]$). Polymer byl rozpuštěn na koncentraci 30 g/l v destilované vodě o teplotě 80 °C, obsahující 2,0 g/l KCl. Vzniklý gelový roztok měl teplotu gelování 28 °C. Gel byl 1 h autoklávován při 121 °C a pak umístěn na vodní lázeň 40 °C, aby neztvrdl. Kukuřičný olej technické kvality (Pasquale Bros. Inc., Kanada) byl také sterilizován 1 h při 121 °C a pak do použití uchováván při teplotě místnosti (20 °C). Suspenze kvasinek byla připravena postupem popsaným v sekci 4.1.

5.2.3. Měření průměru perliček

Vzorky perliček byly odebírány na výstupu z tepelného výměníku 5 °C do baněk obsahujících 100 ml roztoku KCl o koncentraci 22 g/l. Perličky byly ponechány ponořené v tomto roztoku 2 h, aby se podpořilo jejich vytvrzení. Olej byl z vodné fáze odstraněn postupným vymýváním roztokem chloridu draselného. Pak byly vzorky do analýzy uchovávány při 4 °C k zamezení mikrobiální kontaminace.

Měření průměru perliček bylo prováděno s použitím softwaru pro analýzu obrazu Optimas (Version 4.02, BioScan, Inc. USA) napojeného na videokameru (Pentax Macro 50 mm). Vzorek perliček byl přenesen na Petriho misku obsahující tenký film vody (použitý k separaci perliček) a pak umístěn pod kameru. Pomocí tohoto systému bylo změřeno celkem 300 až 400 perliček. Spolehlivost softwaru Optimas leží mezi 100 μ m a několika mm s maximální absolutní chybou 30 μ m. Data získaná z Optimas byla dále analyzována pomocí Microsoft Excel. Získané distribuce velikostí vzorků byly charakterizovány středním průměrem vzorku (D_B) a variačním koeficientem (COV).

35 5.2.4. Hodnocení systému perliček – plán experimentu

Byly porovnány celkem 3 průměry statického míchadla ($D_s = 6,4$ mm, 9,5 mm a 12,7 mm) za účelem zjištění, jaký typ populace perliček bude produkován, měřeno středním průměrem perličky ve vzorku a variačním koeficientem distribuce velikostí. Počet prvků statického míchadla (N_s) se pohyboval mezi 12 a 120 a byla studována objemová frakce polymeru (ϵ_c) mezi 8,3 % v/v a 50 % v/v gelu v olejovém roztoku. Nad ϵ_c 50 % se převrátí dispergovaná (gel) a kontinuální (olej) fáze, tzn. vznikne inkluze olejových kapiček v polymerní matici místo gelových kapiček v olejové matici. Povrchová rychlost kapaliny emulze olej/gel v řezu emulzí byla nastavena v rozmezí 3,6 cm/s až 17,8 cm/s. Povrchová rychlost kapaliny (V_{SL}) ve statickém míchadle emulze byla vypočtena z rovnice:

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

kde S je plocha průřezu potrubí, které obsahuje statické míchadlo, Q_{oil} je objemový průtok olejové fáze a Q_{car} je objemový průtok karagenanového gelového roztoku.

Výsledky a diskuse: fermentace a dynamika míchání v 50l bioreaktorech s plynovým výtahem

Použití imobilizovaných kvasinek pro výrobu ethanolu bylo publikováno. V posledních dvou desetiletích se výzkumníci pokoušejí proces výroby ethanolu optimalizovat spojením technologie imobilizovaných kvasinek s kontinuálním procesem (Kuu, 1982; Gil, 1991; Maiorella, 1983). Mnozí dosáhli značného úspěchu a použití kontinuálních systémů s imobilizovanými kvasinkami se začalo průmyslově používat. Aplikace takového kontinuálního postupu v pivovarnickém průmyslu pro primární kvašení piva však není tak jednoduchá. Pivo není tvořeno jen ethanolom, ale i bezpočtem chutí dodávajících sloučenin, které finálnímu produktu dodávají jak komplexnost, tak hloubku. Následující kapitola popisuje výsledky, získané autorem při zkoumání výroby vyrovnaného piva v poloprovozním fermentoru GLDT.

6.1. Periodické kvašení v pilotním systému gltd

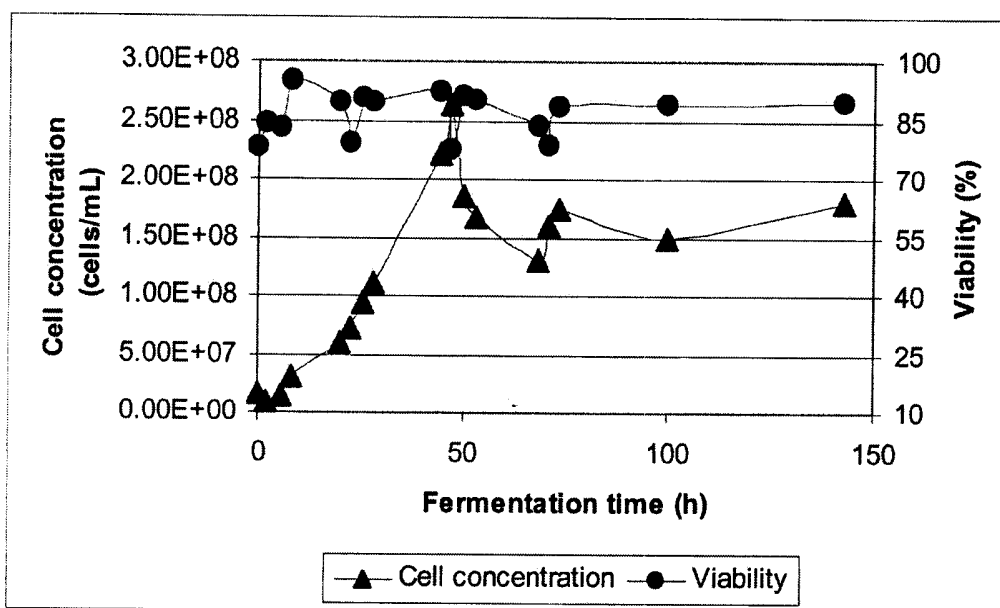
Periodické kvašení s volně suspendovanými kvasinkami bylo prováděno v 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou poloprovozního (pilotního) měřítka. Tyto pokusy poskytly příležitost zhodnotit schůdnost použití takového systému pro kvašení sladiny na pivo. Kromě toho tyto pokusy posloužily ke stanovení kritéria pro budoucí porovnání s nepřetržitým kvašením. V 50l bioreaktoru byla provedena dvě periodická (vsázková) kvašení s použitím kmene ležákových kvasinek z Labatt Culture Collection (LCC3021). V průběhu kvašení byla sledována rychlost růstu kvasinek, stejně jako spotřeba živin a vylučování produktu.

Obr. 6.1 a 6.2 znázorňují profily koncentrace a životnosti kvasinek pro periodické kvašení 1, resp. 2. V obou případech růst kvasinek sledoval klasické parametry publikované v literatuře. Životnost, měřeno methylenovou modří, zůstávala stále vysoká a hodnoty zůstávaly v okolí téměř 90 %. Profil koncentrace uhlohydrátů pro vsázku 1, resp. 2 je uveden na obr. 6.3, resp. 6.4. Jako první pohlcovaly kvasinky jednoduché cukry, glukózu a fruktózu, a pak došlo na spotřebu maltózy a maltotriózy. Hladiny maltotetrózy a větších polysacharidů zůstaly v průběhu kvašení nezměněny.

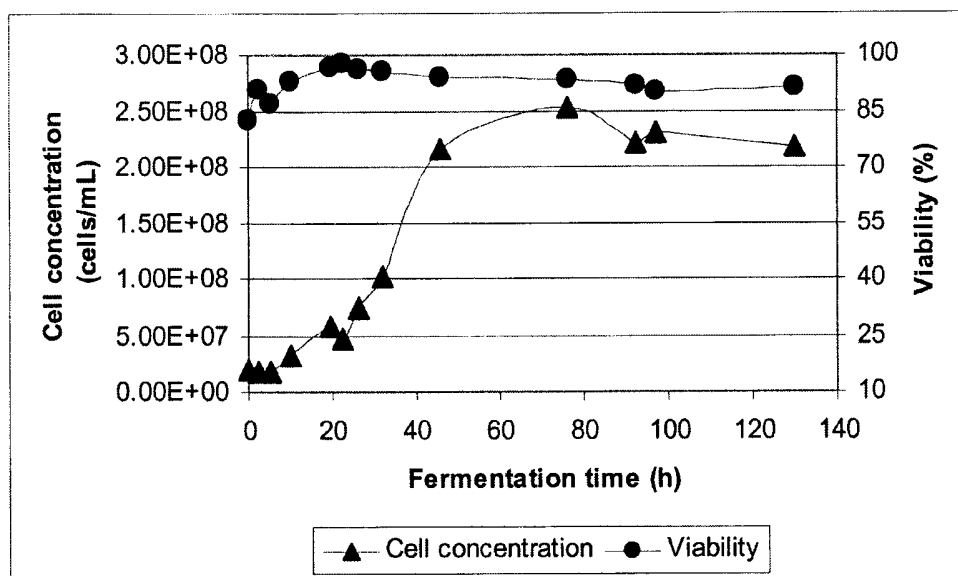
Jedním z nejdůležitějších vedlejších produktů metabolismu kvasinek je ethanol. Optimalizovaným anaerobním kvašením vznikne asi 48 g ethanolu a 47 g oxidu uhličitého na 100 g metabolizované glukózy. Dále vznikne malé množství glycerolu (3,3 g na 100 g glukózy), protože tento vedlejší produkt se účastní udržování redox rovnováhy ve fermentujících kvasinkách a rovněž podporuje osmotickou rovnováhu kvasinek, zejména v hypertonickém prostředí. Obr. 6.5 a 6.6 ilustrují vývoj koncentrace ethanolu a glycerolu v průběhu kvašení. Hladina ethanolu stoupá na počátku kvašení velmi pomalu v důsledku přítomnosti kyslíku ve fermentačním prostředí, protože kvasinky jsou v aerobní fázi svého růstu. Jakmile se kyslík spotřebuje, stoupá hladina ethanolu exponenciálně až do spotřebování zkvasitelných cukrů, a v tomto okamžiku se koncentrace ustálí. Velmi významnými vedlejšími produkty metabolismu kvasinek jsou dále vicinální diketony. Celkové koncentrace diacetylu a pentandionu pro vsázky 1 a 2 jsou uvedeny na obr. 6.7 a 6.8. Tyto sloučeniny stoupaly během kvašení až asi do 40 h, což odpovídá maximální koncentraci kvasinek, a jsou výsledkem syntéz aminokyselin, kterým kvasinky podléhají během své růstové fáze. V poslední části kvašení jsou diacetyl, pentandion a jejich prekursor α -acetolaktát a α -ketobutyráty kvasinkami přeměňovány na odpovídající, méně chuťově výrazné dioly.

Z výsledků uvedených v této sekci se jeví, že obě periodická kvašení proběhla v bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou normálně. Růst kvasinek a pohlcování uhlohydrátů probíhalo očekávaným způsobem stejně, jako tomu bylo u vedlejších produktů ethanolu, diacetylu a pentandionu. Porovnání dat z jednotlivých vsázek ukazuje, že obě vsázky kvasily velmi podobným způsobem. Obr. 6.9 porovnává koncentraci ethanolu ze vsázek 1 a 2. Jednotlivé křivky sledují stejný profil, přičemž se mnohé body navzájem překrývají, což naznačuje úroveň reprodukovatel-

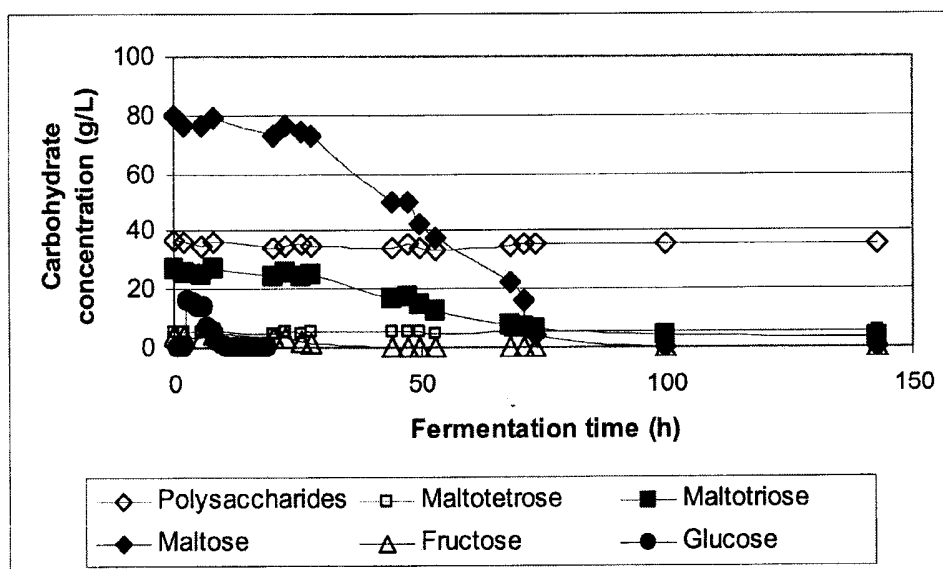
- nosti. I když se mnohé body navzájem překrývají, což naznačuje úroveň reprodukovatelnosti. I když se však pořadí spotřeby substrátů a následné vylučování produktů v systému s plynovým výtahem nezměnilo, změnila se rychlost kvašení. Dokončení primárního kvašení, reprezentovaného maximální koncentrací ethanolu, bylo u obou vsázek dosaženo po asi 80 až 85 h. Snížení diacetyl pod $30 \mu\text{g/l}$ bylo dosaženo za dalších 20 h. Tyto výsledky naznačují, že primární kvašení vysokostupňové sladiny je možno dokončit během asi 100 h oproti 120 až 168 h při tradičním periodickém kvašení ležáku. K tomuto zkrácení doby kvašení přispělo promíchávání v bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou v důsledku zvýšeného přestupu hmoty, který tento systém umožňuje. Na základě těchto informací byly další fermentační pokusy prováděny s předpokladem, že bioreaktor s plynovým výtahem a sací trubicou nemění významně fermentační metabolismus kvasinek a že fermentace s volně suspendovanými kvasinkami v tomto systému může zkrátit dobu kvašení o alespoň 20 h.



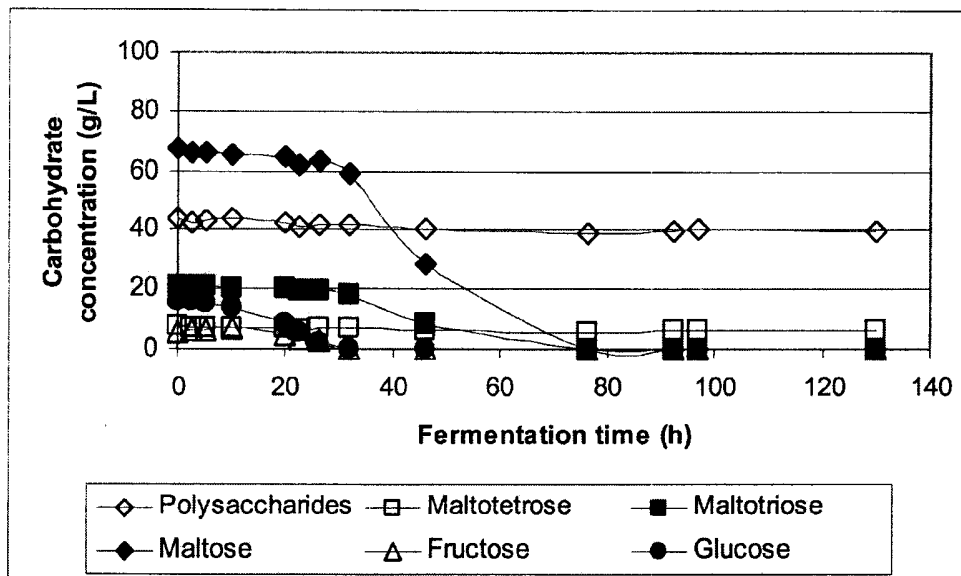
OBR. 6.1. CELKOVÁ KONCENTRACE A ŽIVOTNOST KVASINEK VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 1 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



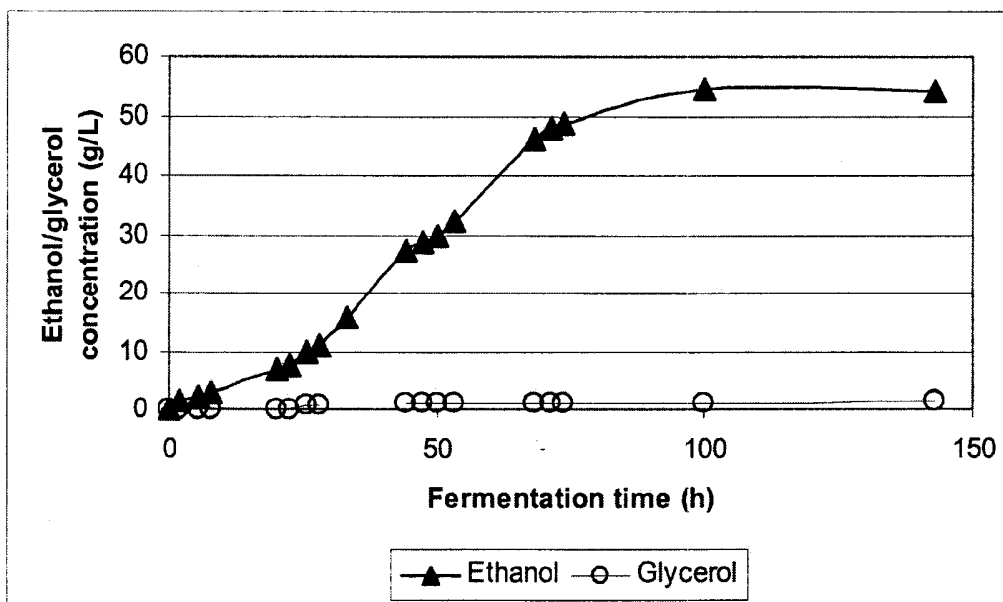
OBR. 6.2. CELKOVÁ KONCENTRACE A ŽIVOTNOST KVASINEK VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 2 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



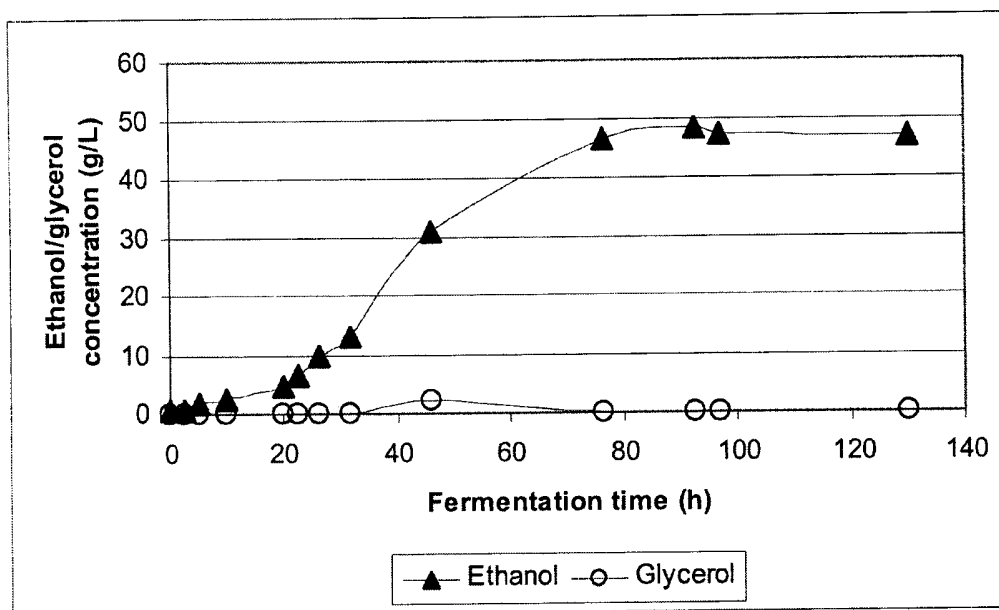
OBR. 6.3. PROFIL KONCENTRACE UHLOHYDRÁTŮ VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 1 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



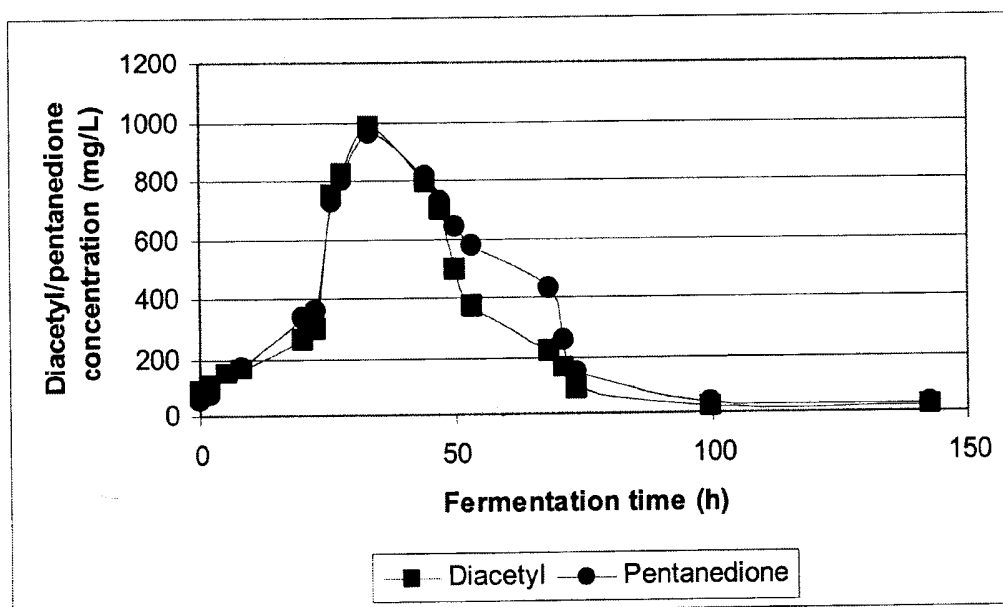
OBR. 6.4. PROFIL KONCENTRACE UHLOHYDRÁTŮ VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 2 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



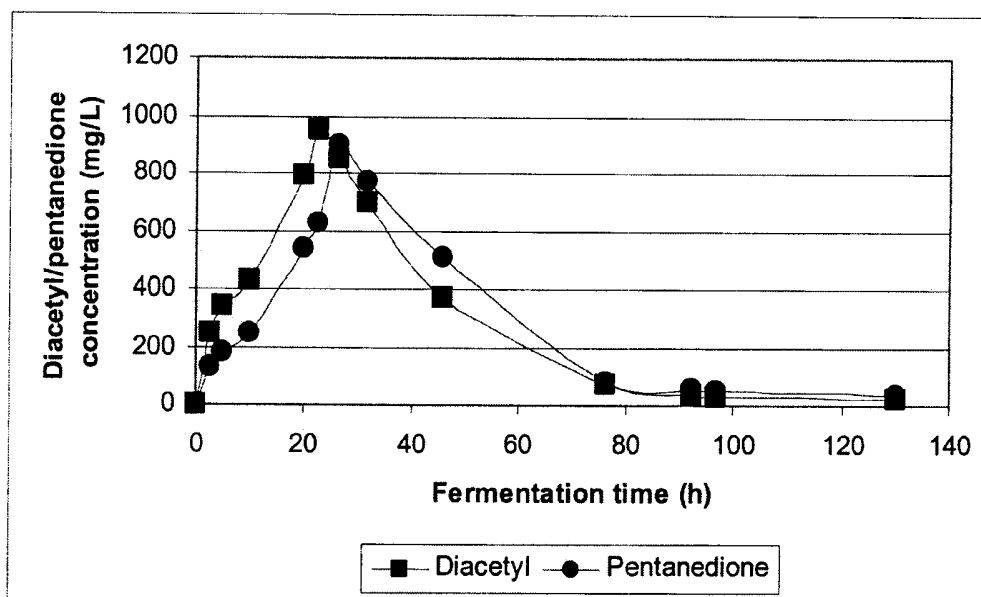
OBR. 6.5. KONCENTRACE ETHANOLU A GLYCEROLU VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 1 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



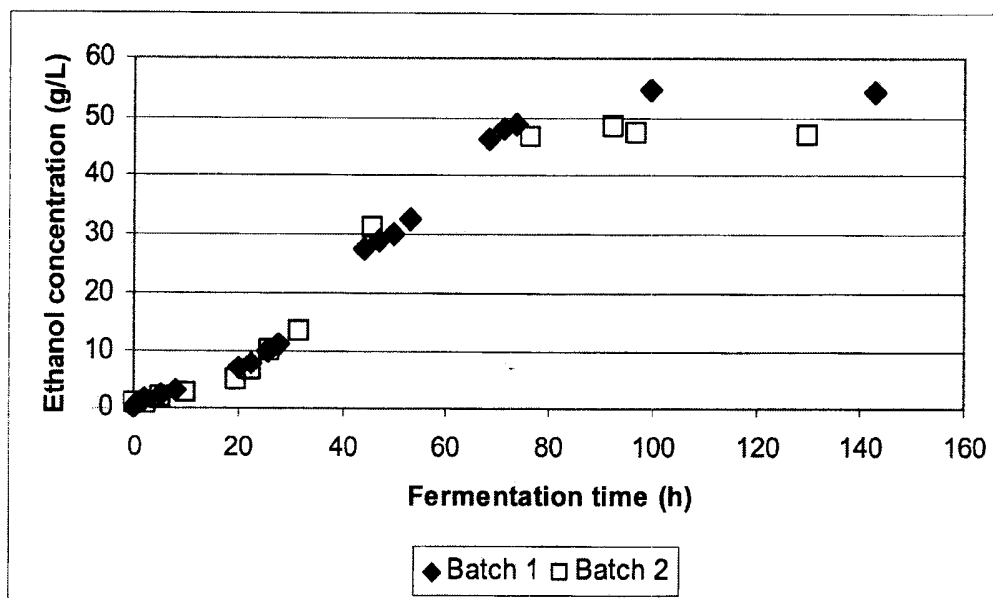
OBR. 6.6. KONCENTRACE ETHANOLU A GLYCEROLU VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 2 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



OBR. 6.7. KONCENTRACE DIACETYLU A PENTANDIONU VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 1 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



OBR. 6.8. KONCENTRACE DIACETYLU A PENTANDIONU VERSUS DOBA FERMENTACE PRO VSÁZKOVOU FERMENTACI 2 S KVASINKAMI LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.



OBR. 6.9. POROVNÁNÍ KONCENTRACE ETHANOLU PRO VSÁZKU 1 A VSÁZKU 2 VERSUS DOBA FERMENTACE. BYLY POUŽITY KVASINKY LCC3021 V PILOTNÍM GLDT BIOREAKTORU.

6.2 Imobilizační nosiče

Během tohoto výzkumného projektu bylo zkoumáno několik nosičů za účelem identifikace nej-
slibnějších alternativ pro budoucí vývojové práce. V 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací
5 trubkou byly testovány tři odlišné způsoby imobilizace. Byly hodnoceny dva komerčně dostupné
adsorpční nosiče s velikostí v rozmezí mezi 1 a 2 mm. Testovány byly výrobky Siran[®], nosič ze
skleněných perliček, dodávaný firmou Schott Engineering (obr. 9), a Celite[®], perličky z lože roz-
sivkové zeminy, poskytované firmou World Minerals (obr. 10), pro svou uváděnou snadnou ma-
nipulovatelnost a svou komerční dostupnost. Nosiče na adsorpční bázi poskytují možnost více
10 aseptického provozu, protože reaktor lze nejprve naplnit nosičem, na místě sterilizovat a nakonec
naočkovat kvasinky přímo do reaktoru. Z průmyslového hlediska je tato alternativa velmi atrak-
tivní, protože nosič nevyžaduje speciální uskladnění a zařízení nemusí významně měnit svou
inokulační praxi.

Počáteční výsledky fermentace s oběma těmito nosiči v 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a
sací trubkou byly nepříznivé. Problémy, které vznikly, byly většinou důsledkem vysoké hustoty
15 částic produktů Siran[®] a Celite[®] v porovnání s kapalným médiem. Trojfázové systémy s plyno-
vým výtahem a sací trubkou fungují nejlépe, udržuje-li se poměr hustoty kapaliny a nosiče blízko
jedné. V případě Siran[®] byl poměr 1,34, zatímco poměr pro Celite[®] byl 1,31. Důsledkem takové-
20 hoto velkého rozdílu hustot mezi pevnou a kapalnou fází bylo významné zvýšení minimální rych-
losti fluidizace plynu nutné k provozu 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubkou. Pro 4
l nosiče Siran[®] (pevný podíl 8% v/v), byla k dosažení cirkulace nutná rychlost plynu 21,5 mm/s
(vztaženo na průměr sací trubky). Tato vyšší rychlost plynu nebyla vážným problémem, pokud se
test prováděl ve vodném roztoku, avšak jakmile byla kapalným médiem sladina, došlo v systému
25 plynového výtahu se sací trubkou (GLDT) ke katastrofickému selhání. Požadovaná rychlost ply-
nu způsobila v reaktoru nadměrné pění, které nakonec snížilo hladinu kapaliny až pod sací
trubku, čímž se zastavila cirkulace kapaliny a pevného podílu. Podobné selhání jako v případě
nosiče Siran[®] nastalo, když byl jako imobilizační materiál použit Celite[®]. Kvůli těmto výsledkům
bylo v dalších testech fermentace s plynovým výtahem od těchto nosičů na adsorpční bázi upuš-
30 těno.

Použití nosiče na bázi záhytu, jako je κ -karagenan, umožnilo plnit systém 40 % (v/v) pevného
podílu a pro jeho fluidizaci a následnou cirkulaci pak byla vyžadována rychlost plynu asi 0,17
m³/h (povrchová rychlost plynu 5,8 mm/s). Pozitivní výsledky, získané při provozu systému
35 s perličkami kvasinek, zachycených na karagenanu, byly důsledkem nižší hustoty nosiče (asi
1100 kg/m³) a z toho vyplývající snadnosti fluidizace. Podobně bylo dosaženo požadované nápl-
ně pevného podílu u autoagregujících kvasinek LCC 3021 (středně flokulentní) a LCC290 (su-
perflokulentní) při rychlosti fluidizace plynu přibližně 3 mm/s, nutné k zajištění správné cirkula-
ce. Sekce 6.2.1 popisuje podrobněji κ -karagenanový gelový nosič a sekce 6.2.2 popisuje au-
toagregující kvasinky – vločky LCC3021 a vločky LCC290, které byly hodnoceny jako imobili-
zační matrice pro kontinuální primární fermentaci v 50l fermentoru GLDT.
40

6.2.1. κ -Karagenanové gelové perličky

Imobilizační metody na bázi záhytu vyžadují uzavření kvasinek v matrici před jejich vnesením
do fermentační nádoby. Protože inokulace in-situ v reaktoru není v současnosti proveditelná, je
nutno tyto gelové perličky získat před zahájením fermentace. Není dosud jasné, jaké účinky má
na inokulované gelové perličky dlouhodobější skladování. Aby se minimalizoval jakýkoli možný
negativní vliv skladování, bylo rozhodnuto zhotovit velké množství gelových perliček během
50 krátké doby (8 h). Pro tento účel byl proto použit proces výroby perliček se statickým mícha-
dlem, popsáný v sekci 5.2. Ideální perličky by měly mít průměr částic (D_B) mezi 0,8 mm a 1,4
mm s variačním koeficientem (COV) distribuce velikostí udržovaným na minimu. Pro získání
požadovaného množství a konzistence perliček bylo nutno upravit několik parametrů procesu
výroby perliček. V následující sekci je shrnut výběr parametrů procesu výroby perliček a v sekci
6.2.1.2 jsou popsány perličky použité v testech kontinuální fermentace.
55

6.2.1.1. Proces výroby perliček. Volba proměnných

Charakterizace procesu výroby perliček byla provedena ve spolupráci s dalšími výzkumníky s důrazem kladeným na tyto parametry procesu: průměr statického míchadla (D_s), počet prvků statického míchadla (N_s), povrchový průtok kapaliny (V_{SL}) a objemová frakce polymeru (ϵ_c).
 5 Výsledky získané během experimentů jsou shrnuty v obr. 6.12 až 6.21.

Obr. 6.12 znázorňuje typickou distribuci velikostí částic získanou procesem imobilizace kvasinek karagenanovým gelem se statickým míchadlem. V tomto příkladu byly použity následující parametry: průměr statického míchadla 12,7 mm, 60 prvků statického míchadla, povrchová rychlost kapaliny 10,5 cm/s a objemová frakce polymeru 0,25. Byl naměřen střední průměr perliček 701 μm s variačním koeficientem 45 %. Kumulativní distribuce velikostí, znázorněná na obr. 6.13, se zdá odpovídat normální kumulativní distribuci, vypočtené ze střední a standardní odchylky vzorku. K testování normality byla použita de Kolmogorofova–Smirnovova metoda (Scheaffer et
 10 McClave, 1990). Maximální rozdíl mezi experimentálními daty a daty upravenými (K–S statistika D) byl vypočten na 0,0274. Modifikovaná D hodnota odpovídající datům podle normální distribuce musí ležet pod 0,895 s hladinou spolehlivosti 95 %. V našem případě byla vypočtena D hodnota 0,174, tedy bezpečně pod 0,895, a lze odvodit, že naše data odpovídají normální distribuci.
 15

Všechna data, získaná z tohoto procesu výroby perliček, vykazala distribuci velikostí s pouze jedním píkem. Poncelat et al. (1992) však popsali pro alginátové perličky, získané dispergací v míchaném tanku, výskyt satelitních píků a/nebo sekundárního píku, odpovídajícího perličkám s průměrem menším než 200 μm . Je možné, že malé perličky, vzniklé při našem procesu, prostě
 20 zmizely během stupně promývání perliček, a tudíž se v našich datech z distribuce velikostí neobjevují.
 25

Účinky povrchové rychlosti kapaliny a průměru statického míchadla na střední průměr perliček a na variační koeficient distribuce velikostí jsou znázorněny na obr. 6.14, resp. 6.15. Střední průměr perliček klesá se vzrůstem povrchové rychlosti u všech tří průměrů statického míchadla s výraznějším efektem pro statické míchadlo 12,7 mm. Se statickými míchadly s menšími průměry (6,4 mm a 9,5 mm) se při všech testovaných rychlostech kapaliny nezískaly perličky se středním průměrem větším než 700 μm , zatímco se statickým míchadlem o průměru 12,7 mm se perličky větší než 700 μm získaly při rychlostech kapaliny pod 11 cm/s. Všechny tři průměry statického míchadla vedly k variačnímu koeficientu mezi 38 % a 58 %. Zdálo se rovněž, že při zvyšování rychlosti variační koeficient ve všech třech případech klesal. V variační koeficient se měnil s průměrem statického míchadla, přičemž nejnižších hodnot se dosahovalo s nejnižším průměrem statického míchadla.
 30
 35

Při povrchové rychlosti kapaliny 3,5 cm/s se zdálo, že objemová frakce polymeru ovlivňuje střední průměr perliček, zatímco rychlosti nad 7 cm/s nezpůsobují relativně žádný rozdíl v experimentálních hodnotách ϵ_c pohybujících se mezi 0,083 a 0,5 (obr. 6.16). Při zvyšujících se povrchových rychlostech kapaliny se zdál být malý nebo vůbec žádný efekt objemové frakce polymeru na variační koeficient (obr. 6.17).
 40
 45

Obr. 6.18 a 6.19 znázorňují vliv povrchové rychlosti kapaliny a počtu prvků statického míchadla na střední průměr perliček. Se zvyšující se rychlostí kapaliny střední průměr perliček klesal pro všechny obměny počtu prvků statického míchadla (obr. 6.18). Střední průměr perliček při dané rychlosti kapaliny byl podobný pro 24 až 120 prvků, zatímco konfigurace s 12 prvky vedla k průměru perliček většímu než ostatních 5 testovaných konfigurací. Obr. 6.19 rovněž ukazuje, že střední průměr perliček dosahuje minima nad 24 prvky statického míchadla.
 50

Obr. 6.20 znázorňuje vliv povrchové rychlosti kapaliny na variační koeficient různých počtů prvků statického míchadla. Zdá se, že rychlost kapaliny v testovaných konfiguracích variační

koeficient neovlivnila. Vliv počtu prvků statického míchadla na variační koeficient byl výraznější (obr. 6.21). Variační koeficient klesal se vzrůstem počtu prvků statického míchadla a dosáhl maxima 45 % při 60 prvcích a výše. Tyto výsledky jsou konzistentní pro povrchové rychlosti kapaliny v rozmezí 3,6 cm/s až 17,8 cm/s.

5

Mělo se za to, že zvětšení průměru statického míchadla (D_s) by mělo v míchadle vytvořit heterogenitu smykových sil, která by vedla ke zvýšení rozptylu velikostí, měřeno variačním koeficientem. Současně by zvětšení D_s snížilo intenzitu smykových sil, a tak zvětšilo střední průměr perliček. Oba tyto efekty byly v experimentech pozorovány, přičemž statické míchadlo s nejmenším průměrem produkovalo perličky s nejmenším středním průměrem (400 μm až 500 μm) a nejnižší variační koeficient (přibližně 40 %) nebo rozptyl velikostí.

10

Energie nutná k vytvoření emulze je úměrná ploše rozhraní tvořené polymerem a olejovou fází. Čím menší je velikost částic, tím větší je energie nutná k jejímu vytvoření. Berkman a Calabrese (1988) ukázali, že zvýšení průměrné povrchové rychlosti kapaliny (V_s) provokuje vzrůst disipované energie na jednotku hmoty tekutiny, což upřednostňuje zmenšení velikosti perliček. Zvýšení průměrné povrchové rychlosti kapaliny (testované mezi 3,6 cm/s a 17,8 cm/s) vedlo ke snížení průměrné velikosti perliček. Takovéto zvýšení rychlosti vyvolává tlakový diferenciál mezi vstupem a výstupem statického míchadla. Tento tlakový diferenciál je úměrný disipované energii na jednotku hmoty kapaliny. Zvýšení rychlosti proto vyvolává zvýšení disipované energie systému, které podporuje zmenšení velikosti perliček. Zmenšování průměru perliček D_B bylo pozorováno se zvyšováním povrchových rychlostí kapaliny. Al Taweel a Walker (1983) prokázali, že při vysokých rychlostech, odpovídajících úrovni významné turbulence, se ustavuje dynamická rovnováha mezi tvorbou perliček a koalescencí mezi perličkami. Při konstantním průměru statického míchadla (D_s) a počtu prvků (N_s) měla povrchová rychlost malý vliv na variační koeficient. Rychlost je proto parametrem, který umožňuje manipulaci a volbu středního průměru perliček bez významné modifikace rozptylu velikostí.

15

20

25

V rozsahu tohoto výzkumu měla objemová frakce karagenanového gelu (ϵ_c) malý vliv jak na střední průměr perliček, tak na variační koeficient s výjimkou nejmenší studované rychlosti 3,6 cm/s, kdy střední průměr perliček klesal s poklesem ϵ_c . Audet a Lacroix (1989) studovali tento parametr pro výrobu karagenanových perliček ve dvoufázovém disperzním systému (vsázkový míchaný tank, nikoli kontinuální proces se statickým míchadlem) a vyvodili, že pro roztok polymeru s koncentrací karagenanu 3 % hmotn. nemá ϵ_c žádný vliv na střední průměr perliček. Konkrétní vliv koncentrace κ -karagenanového gelu na distribuci velikostí perliček zkoumali Audet a Lacroix (1989), kteří ukázali, že tento parametr distribucí velikostí silně ovlivňuje. Zvyšující se koncentrace gelu měly za následek zvyšující se střední průměr perliček (D_B) a variační koeficient (COV). Zaznamenaný efekt byl přisouzen zvýšené viskozitě gelu při vyšších koncentracích, vedoucí k nižším smykovým rychlostem na emulzi a tudíž k větším perličkám. I když v této práci nebyl studován vliv koncentrace gelu na velikost perliček, může být v případě potřeby použit jako další prostředek regulace velikostí perliček.

30

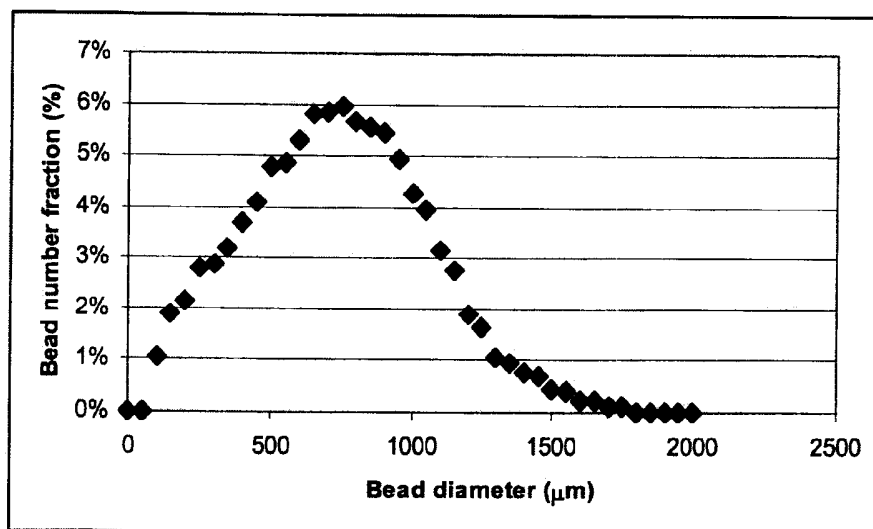
35

40

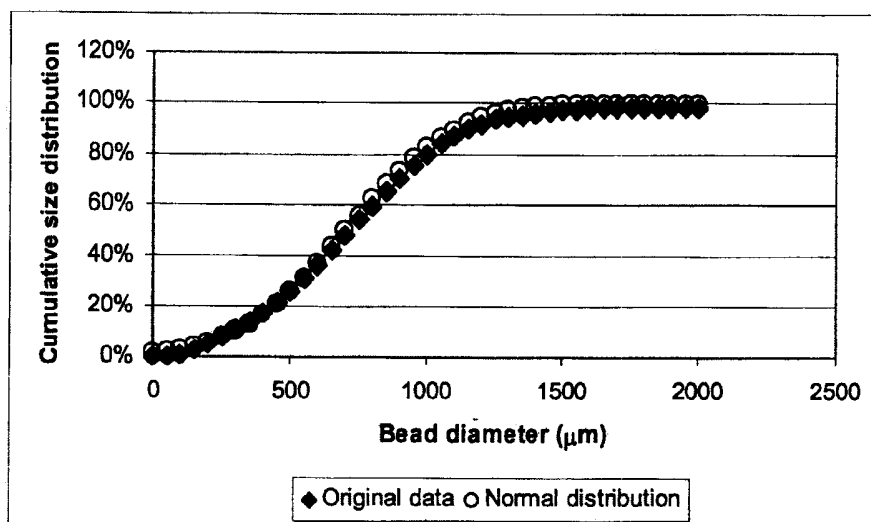
Zvýšení počtu míchacích prvků (N_s) zvyšuje průměrnou dobu zdržení, kterou stráví prvek tekutiny uvnitř statického míchadla, což vede k homogennější směsi a tudíž ke vzniku menších a těsněji dispergovaných perliček. Během experimentů byla dosažena v disperzi rovnováha (měřeno variačním koeficientem) kolem 60 až 72 prvků. Middleman (1974) ukázal, že v případě emulzí s nízkou viskozitou (0,6 až 1,0 cP) postačuje k dosažení takové rovnováhy 10 prvků. Karagenanový roztok, použitý v těchto experimentech [3% w/v], měl průměrnou viskozitu 200 cP a viskozita oleje byla 25 cP. V důsledku toho tato vyšší viskozita vyžadovala pro dosažení pseudohomogenity delší dobu zdržení v míchadle.

45

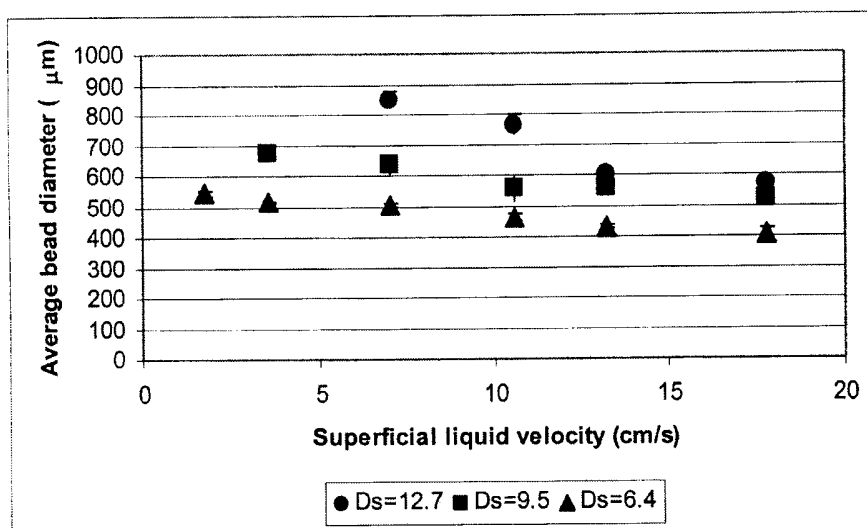
50



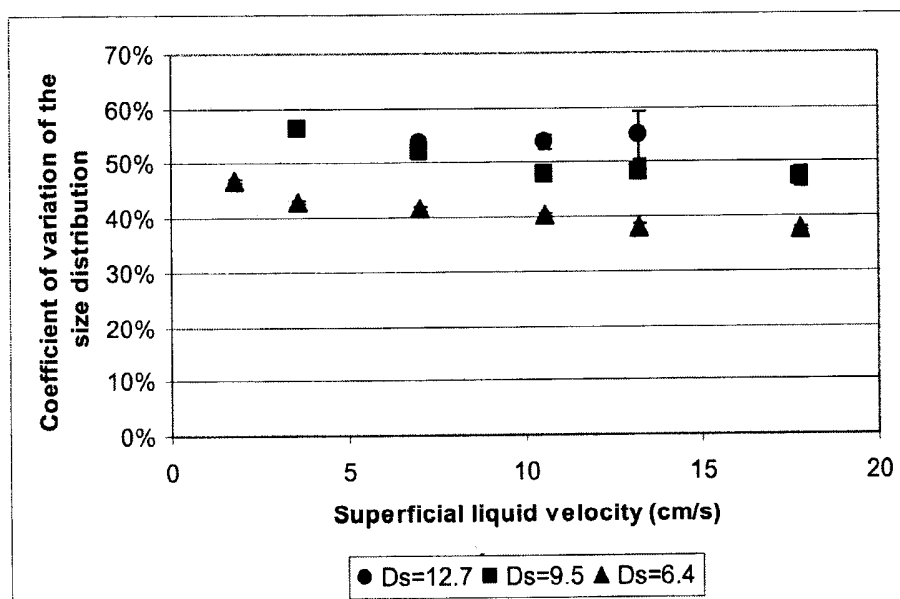
OBR. 6.12. TYPICKÁ DISTRIBUCE VELIKOTÍ PERLIČEK ZÍSKANÝCH PROCESEM S POUŽITÍM STATICKÉHO MÍCHADLA. PARAMETRY PROCESU V TOMTO PŘÍKLADU: $D_S = 12,7$ MM, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10,5$ CM/S A $\epsilon_C = 0,25$.



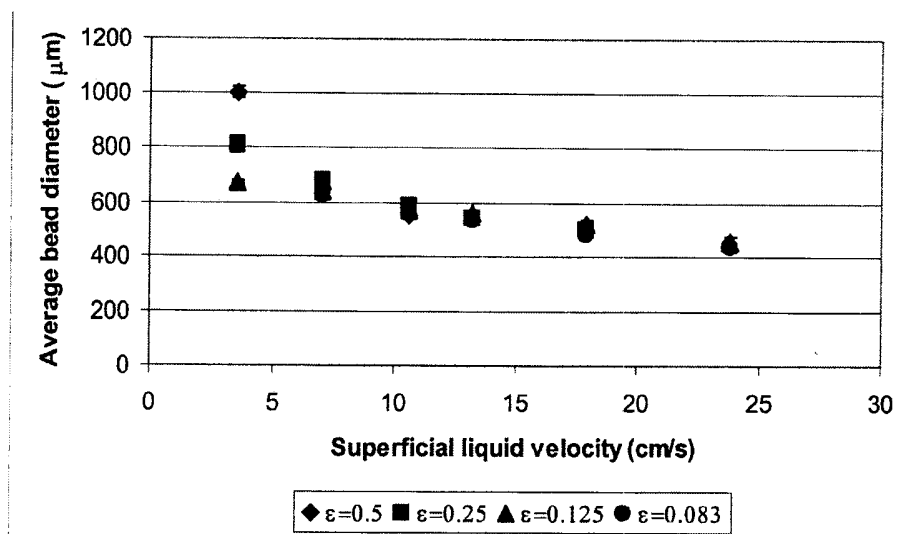
OBR. 6.13. TYPICKÁ KUMULATIVNÍ DISTRIBUCE VELIKOSTÍ PERLIČEK ZÍSKANÝCH PROCESEM S POUŽITÍM STATICKÉHO MÍCHADLA. PARAMETRY PROCESU V TOMTO PŘÍKLADU: $D_S = 12,7$ MM, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10,5$ CM/S A $\epsilon_C = 0,25$.



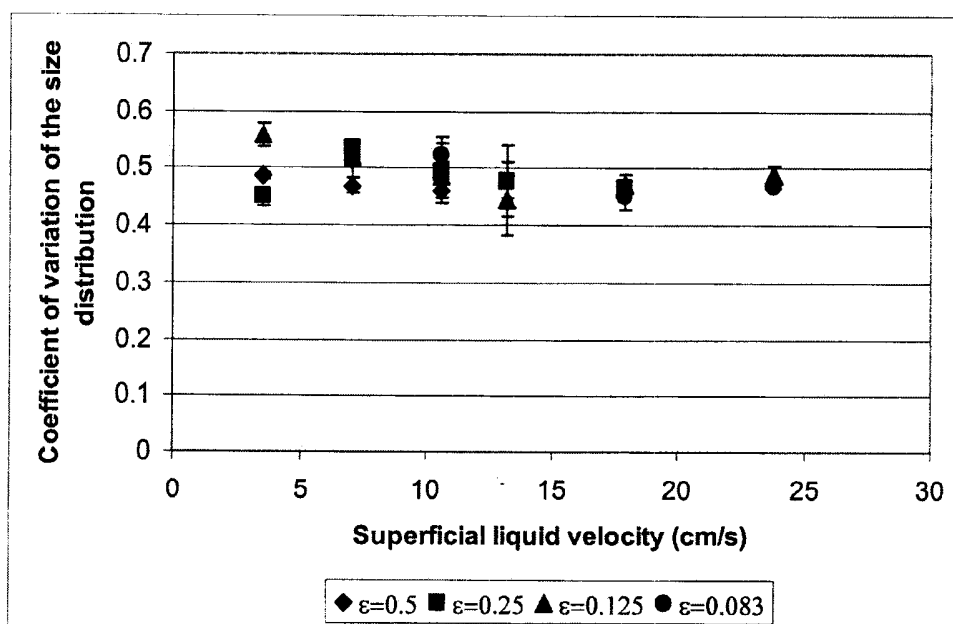
OBR. 6.14. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) PROTI STŘEDNÍMU PRŮMĚRU PERLIČEK (μM). BYLY HODNOCENY TŘI RŮZNÉ PRŮMĚRY STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s 12,7 MM, 9,5 MM A 6,4 MM). POČET PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s) BYL UDRŽOVÁN KONSTANTNĚ NA 48 A POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_c) BYLA NASTAVENA NA 0,25.



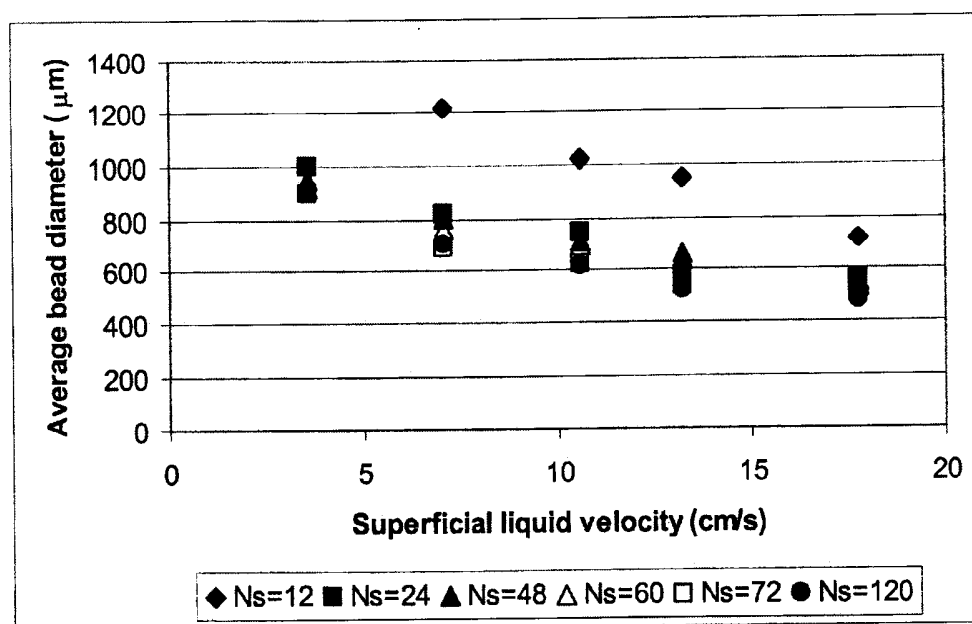
OBR 6.15. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) PROTI VARIAČNÍMU KOEFICIENTU PRŮMĚRU PERLIČEK (%). BYLY HODNOCENY TŘI RŮZNÉ PRŮMĚRY STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s 12,7 MM, 9,5 MM A 6,4 MM). POČET PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s) BYL UDRŽOVÁN KONSTANTNĚ NA 48 A POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_c) BYLA NASTAVENA NA 0,25.



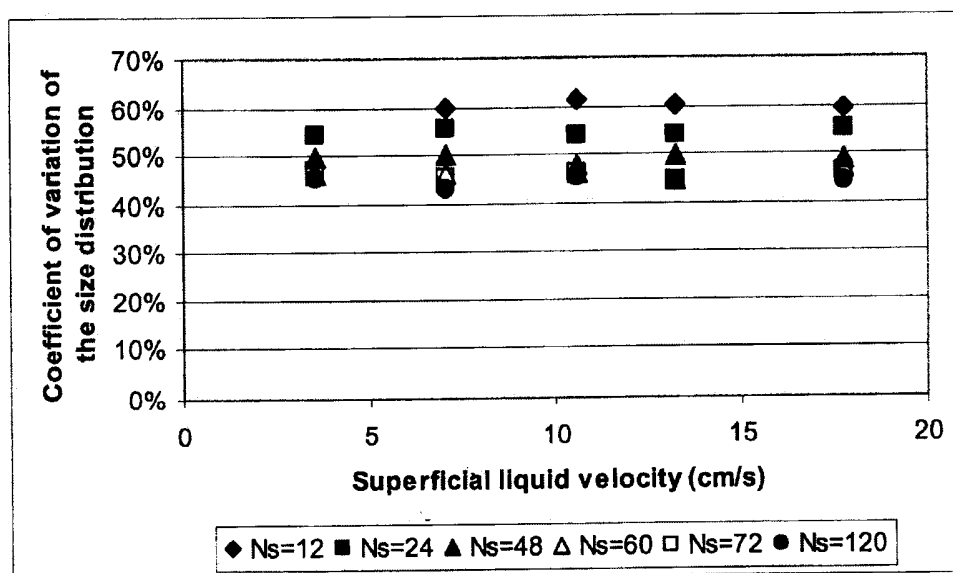
OBR. 6.16. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) PROTI STŘEDNÍMU PRŮMĚRU PERLIČEK (μM). BYLY HODNOCENY ČTYŘI POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_C 0,5, 0,25, 0,125 A 0,083). POČET PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s) BYL UDRŽOVÁN KONSTANTNĚ NA 48 A PRŮMĚR STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s) BYL NASTAVEN NA 12,7 MM.



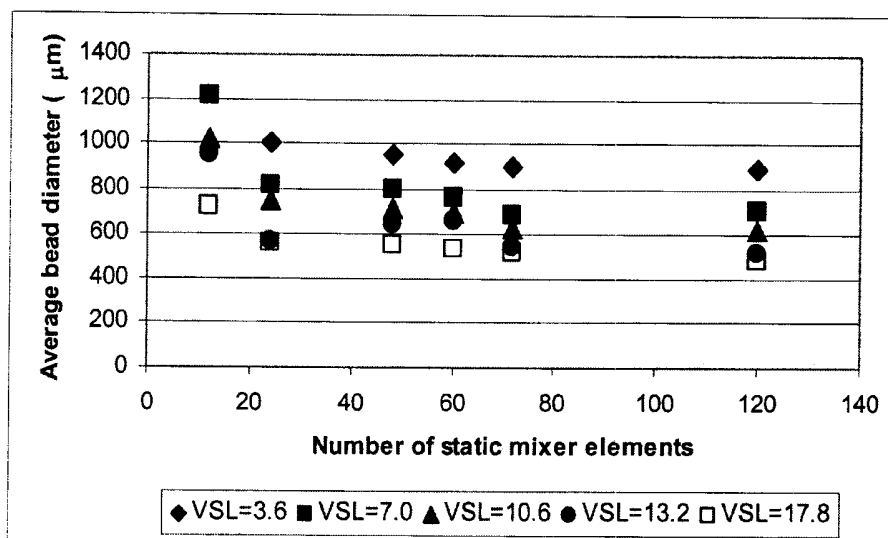
OBR. 6.17. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) PROTI VARIÁČNÍMU KOEFICIENTU PRŮMĚRU PERLIČEK (%). BYLY HODNOCENY ČTYŘI POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_C 0,5, 0,25, 0,125 A 0,083). POČET PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s) BYL UDRŽOVÁN KONSTANTNĚ NA 48 A PRŮMĚR STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s) BYL NASTAVEN NA 12,7 MM.



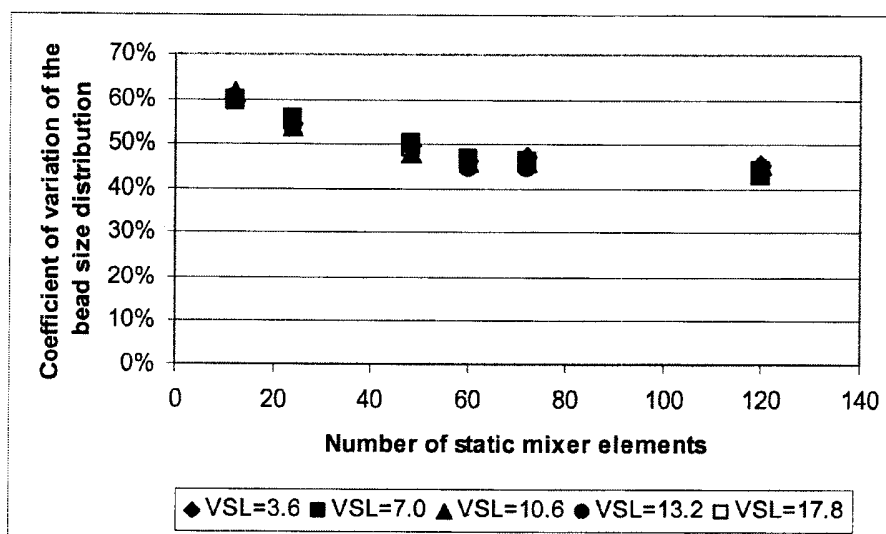
OBR. 6.18. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) PROTI STŘEDNÍMU PRŮMĚRU PERLIČEK (μm). POČET PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s) BYL MĚNĚN NA 12, 24, 48, 60, 72 A 120. POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_c) BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 0,25 A PRŮMĚR STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s) BYL NASTAVEN NA 12,7 MM.



OBR. 6.19. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) PROTI VARIÁČNÍMU KOEFICIENTU PRŮMĚRU PERLIČEK (μm). POČET PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s) BYL MĚNĚN NA 12, 24, 48, 60, 72 A 120. POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_c) BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 0,25 A PRŮMĚR STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s) BYLA NASTAVEN NA 12,7 MM.



OBR. 6.20. STŘEDNÍ PRŮMĚR PERLIČEK (μm) PROTI POČTU PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s). POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) BYLA MĚNĚNA NA 3,6, 7,0, 10,6, 13,2 A 17,8. POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_c) BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 0,25 A PRŮMĚR STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s) BYL NASTAVEN NA 12,7 MM.

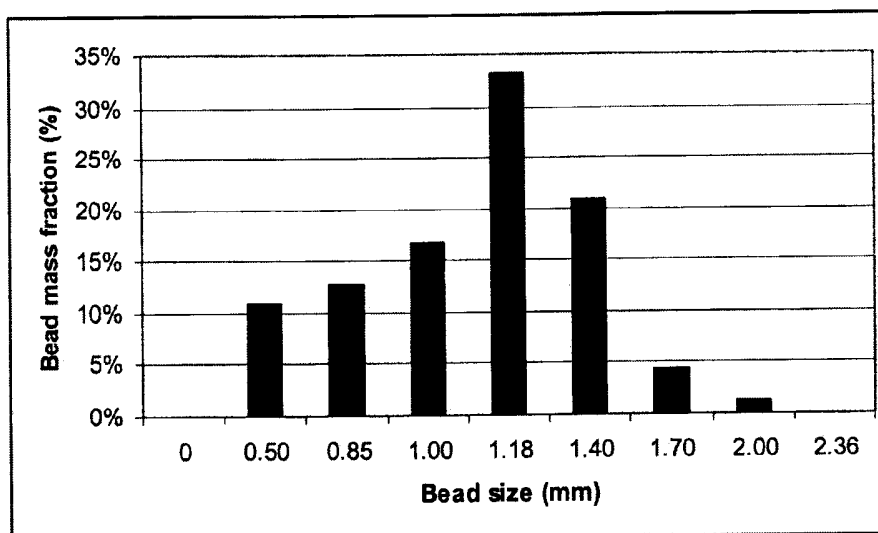


OBR. 6.21. VARIČNÍ KOEFICIENT PRŮMĚRU PERLIČEK (%) PROTI POČTU PRVKŮ STATICKÉHO MÍCHADLA (N_s). POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (CM/S) BYLA MĚNĚNA MEZI 3,6 A 17,8. POLYMERNÍ FRAKCE (ϵ_c) BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 0,25 A PRŮMĚR STATICKÉHO MÍCHADLA (D_s) BYL NASTAVEN NA 12,7 MM.

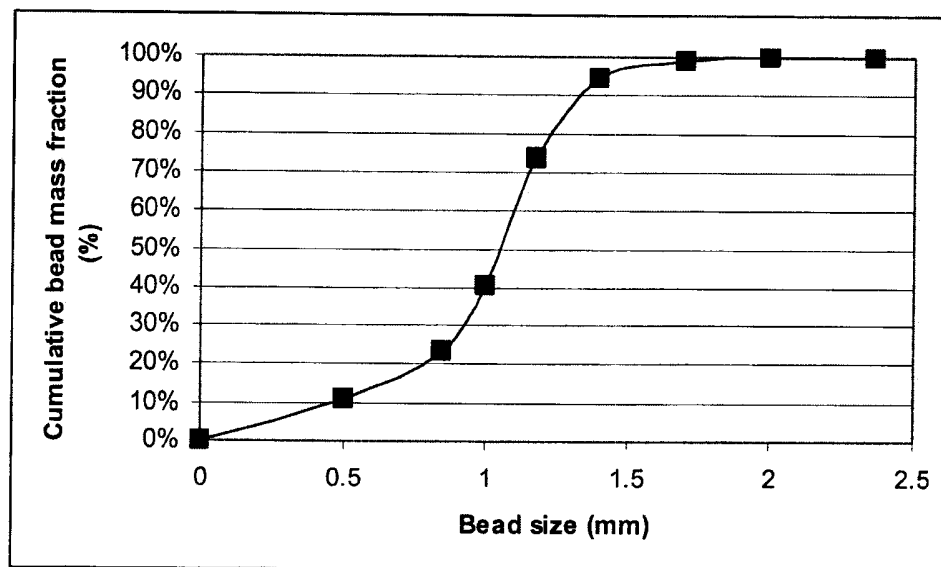
6.2.1.2. Proces výroby perliček: charakteristika κ -karagenanové perličky

Z údajů uvedených v předchozí sekci bylo možno zvolit parametry procesu výroby perliček s požadovanými charakteristikami pro fermentační pokusy. Pro minimalizaci variačního koeficientu pro konkrétní průměr statického míchadla bylo zvoleno 60 prvků k vytvoření emulze olej-gel. Byly zvoleny perličky se středním průměrem přibližně 1 mm pro minimalizaci externího přenosu hmoty a k usnadnění separace mechanickými prostředky od fermentační kapaliny. Za tím účelem bylo zvoleno největší testované statické míchadlo (12,7 mm) a nejnižší testovaná rychlost (3,6 cm/s). Protože polymerní frakce měla na variační koeficient malý vliv, byl použit poměr gelu k oleji 50/50 ($\varepsilon = 0,5$) pro maximalizaci produktivity perliček.

V laboratoři bylo s použitím postupu popsaného v sekci 5.2 s hodnotami $D_s = 12,7$ mm, $N_s = 60$, $V_{SL} = 3,9$ cm/s a $\varepsilon_c = 0,5$ vyrobeno několik šarží gelových perliček se zabudovanými kvasinkami LCC3021. Získané perličky (obr. 11) byly prosety na řadě sít k odstranění perliček větších než 2,0 mm a menších než 0,5 mm. Získaná distribuce velikosti částic je znázorněna na obr. 6.23. Obr. 6.24 ilustruje kumulativní distribuci velikostí těchto perliček. Toto byla typická distribuce použitá v 50l fermentačních pokusech s plynovým výtahem.



OB. 6.23. DISTRIBUCE VELIKOSTÍ κ -KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČEK POUŽITÝCH V KONTINUÁLNÍCH FERMANTAČNÍCH POKUSECH V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU.



OBR. 6.24. KUMULATIVNÍ DISTRIBUCE VELIKOSTÍ κ -KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČEK POUŽITÝCH V KONTINUÁLNÍCH FERMANTAČNÍCH POKUSECH V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU.

6.2.1.3. Limitace perličkového procesu s ohledem na aplikaci na průmyslové měřítku

- 5 Byl vyvinut a v poloprovozním měřítku aplikován proces produkující 10 l perliček za hodinu s použitím statického míchadla. Předtím, než může být uvažována výroba perliček v průmyslovém měřítku, vyžadují některé aspekty tohoto procesu další vývoj a/nebo optimalizaci. Nezbytné je zvýšení objemové produkty systému, aby mohl být poskytován objem imobilizovaných kvasinek, požadovaný jako vstup do velkorozměrového bioreaktoru. Například 2000hl bioreaktor
- 10 s plynovým výtahem a sací trubicou by vyžadoval přibližně 800 hl perliček. K dosažení těchto objemů je nutné zvýšení průtoku gelu i oleje. Z údajů vyplývá, že dosažené zvýšení rychlosti s použitím statických míchadel o průměru 6,4 mm až 12,7 mm vede ke vzniku perliček příliš malých na to, aby mohly být použity ve fermentačním systému. Proto by byla potřeba zvětšit průměr statických míchadel, a tak zvýšit střední průměr perliček. Avšak použitím statických míchadel s větším průměrem se ale také zvýší rozptyl velikosti perliček a vzniká větší množství
- 15 perliček s velikostí mimo požadované rozmezí.

Jinou možností by bylo použití systému se statickými míchadly střední velikosti (12,7 mm), umístěnými paralelně. Se systémem s deseti statickými míchadly jsou představitelné produktivity dosahující 100 l/h. Pro průmyslový příklad 2000 hl by proces běžel kontinuálně 800 hodin nebo

20 přibližně 34 dní, aby byl produkován požadovaný objem perliček. Bylo by možno použít různých systémů pro zkrácení produkční doby, avšak to by přidávalo navíc další úroveň složitosti. Produkční doba by se mohla stát menším problémem, kdyby bylo možno perličky po zamýšlenou dobu skladovat se zachováním životnosti kvasinek. Je představitelné, že by mohl být vyvinut

25 proces sušení perliček nebo jejich skladování ve vakuové nádobě.

Poncelet a spolupracovníci (1993) publikovali práci naznačující, že je třeba brát v úvahu typ statického míchadla, použitého k vytvoření disperze. S jejich navrhovaným systémem s použitím

30 jiného typu statického míchadla, oproti typu Kenics, použitému v tomto výzkumu, by mohlo být možné používat míchadlo většího průměru bez ohrožení velikostní distribuce perliček (se zachováním nízkého variačního koeficientu).

Další problémy dosavadního pilotního procesu zahrnují práci systému při 40 °C a použití rostlinného oleje a roztoku chloridu draselného pro produkci perliček. Z důvodu vysoké produkční teploty vyžaduje proces jak topné, tak chladicí systémy. Potenciální tepelný šok, kterému jsou vystaveny kvasinky, vyžaduje další výzkum, aby bylo možno učinit odhad možných negativních důsledků. V této studii byly produkovány perličky imobilizovaných kvasinek s vysokou životností (nad 90 %), ale nebyly zkoumány žádné další vlivy, které by proces mohl mít na populaci kvasinek.

Protože se pro vytvoření požadované emulze a následně tvorbu perliček používá olej a protože olej působí jako tenzid, a tudíž potlačuje tvorbu pěny, je problémem zbytkové množství oleje na povrchu perliček. Tento zbytek sice pomáhá během fermentačního stupně, ale jeho přenesení do konečného piva by bylo nežádoucí, protože pěna je v konečném produktu žádoucí. Pozornost vyžadují velké objemy roztoku chloridu draselného, používaného k separaci pevné fáze (perliček) od oleje, a metoda odstraňování tohoto solného roztoku ze suspenze perliček před zavedením perliček do bioreaktoru. Jinak může nastat nutnost vypláchnout tento roztok z reaktoru po přidání perliček do reaktoru.

Protože se perličky imobilizovaných kvasinek vyrábějí mimo bioreaktor, je třeba během celého procesu tvorby perliček používat aseptické metody a dodržovat sterilitu až do vnesení perliček do bioreaktoru. Příležitost pro kontaminaci poskytují různé přenosové body mezi tanky a je třeba je monitorovat, protože přítomnost nečistoty může vyústit v její imobilizaci v perličce spolu s kvasinkami. V důsledku řádné péče v laboratoři bylo možno produkovat konzistentně aseptické perličky. Prostředí v průmyslovém zařízení však nemusí být tak příznivé jako v laboratoři, a proto vyžaduje přísnější kontrolu.

6.2.2. Flokulentní kvasinky

Jednou z nejpřirozenějších forem imobilizace je autoagregace mikroorganismu do vloček buněk. Calleja a Johnson (1977) navrhli tři možné důvody, proč se buňky shlukují do agregátů, s odlišnými vazebnými vlastnostmi. První představují buňky odlišných pohlaví, které jsou navzájem přitahovány uvolňovanými feromony (faktory α a a). Tento typ vazby je dočasný a je tvořen vazbou protein–protein mezi aglutininy α a a , ukotvenými ve stěnách komplementárních buněk.

Buňky mohou rovněž agregovat tak, že nedojde k oddělení od mateřské buňky během procesu pučení. Tento nedostatek může být vlastní konkrétnímu kmenu kvasinek nebo může být způsoben nedostatkem živin nebo mutací některých genů. Tento jev se označuje jako tvorba řetězce a nikoli flokulace. Vazby mezi těmito kvasinkami je možno nevratně porušit mechanickým smykovým namáháním (Stratford, 1996).

Třetí scénář je obecně znám jako flokulace. Stewart a Russell (1981) flokulaci definovali jako vratný „jev, při němž se kvasinky shlukují do chomáčů, a buď rychle sedimentují z média, v němž jsou suspendovány, nebo stoupají k povrchu média“. Rozsáhlé důkazy naznačují, že flokulace je řízena geneticky a mechanismus flokulace spočívá na vybraných molekulách, které působí jako můstky mezi stěnami sousedních buněk. Konkrétně se má za to, že určité lektiny jsou vázány na α -mannany sousedících buněk v přítomnosti Ca^{2+} iontů (Calleja a Johnson, 1977). Tato vazba protein/uhlohydrát, je, jak se ukázalo, vratně inhibována chelatačními činidly nebo určitými cukry.

Obr. 12 znázorňuje tři možné konfigurace kvasinek, konkrétně neflokulentní kvasinky, kvasinky tvořící řetězce a flokulentní kvasinky. V případě kvasinek tvořících řetězce, i když jsou buňky agregovány, se to nepovažuje za typ flokulace, protože tyto buňky nebyly na začátku nikdy samostatné a flokulace znamená, že se samostatné buňky shlukují na hmotu v důsledku příznivých okolních podmínek (Ca^{2+} ionty a nízká hladina inhibičních cukrů). V případě flokulentních kvasinek může být konkrétní velikost vločky závislá na genetice buňky, stejně jako na hydrodynamických podmínkách, jimž je buňka vystavena (smykové působení).

Obr. 13 a obr. 14 znázorňují dva kmeny ležákových kvasinek Labatt s různými stupni flokulace. Středně flokulentní kmen kvasinek LCC3021 je znázorněn na obr. 13. V přítomnosti vápenatých iontů tvoří tento kmen agregáty 0,5 mm až 1,0 mm, jakmile se z kapalného média odstraní glukóza. Obr. 14 znázorňuje superflokulentní kmen kvasinek LCC290, který tvoří vločky o velikosti větší než 1 mm a za podmínek nízkého smyku agreguje do shluků o průměru až 5 mm. Za podmínek mírného míchání je průměr vločky LCC290 mezi 1 a 2 mm.

K hodnocení flokulace kvasinek byly navrženy různé měřicí metody (Speers & Ritcey, 1995; Akiyama–Jibiki et al., 1997; Teixeira et al, 1991; Stewart & Russell, 2000). V „Brewer’s Yeast“ (Stewart & Russell, 2000), bylo navrženo, že způsoby flokulace kvasinek je možno dále rozdělit na tři kategorie, a to sedimentační metody, metody statické fermentace a přímé pozorování tvorby vloček v živném médiu.

Sedimentační metodu, popsanou poprvé Burnsem v r. 1937, modifikoval Helm a spolupracovníci v r. 1953 a je v současnosti součástí standardních analytických metod, uznávaných výborem Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (1992). Tato metoda se označuje jako in vitro technika, protože charakteristiky usazování kvasinek se hodnotí v kalcium–sulfátovém pufru, a nikoli ve skutečném fermentačním médiu. Metoda statické fermentace (známá také jako Gillilandova metoda) spočívá v pěstování kvasinek v mladině a měření jejich flokulačních charakteristik in vivo. Obě tyto metody zahrnují měření absorbance vzorků usazených kvasinek proti vzorkům kvasinek, které byly deflokulovány, s použitím spektrofotometru UV/viditelné světlo.

Stewart a Russell (2000) popisují metodu měření flokulace kvasinek pomocí vizuálního popisu úrovně flokulace, ke které dochází ve vzorcích kvasinek pěstovaných ve skleněných lahvkách se šroubovacím uzávěrem o objemu 20 ml. Pro vyjádření stupně flokulace použili subjektivní měřítko, například: 5 – extrémně flokulentní, 4 – velmi flokulentní; 3– mírně flokulentní, 2– slabě flokulentní, 1 – hrubý a 0 – neflokulentní. Superflokulentní kmen kvasinek LCC290 obdržel klasifikaci 4 – velmi flokulentní, zatímco kvasinkový kmen LCC3021 byl klasifikován stupněm 3 – mírně flokulentní.

Flokulence je v pivovarnictví významnou charakteristikou, protože se přirozená tendence kvasinek buď sedimentovat, nebo stoupat k povrchu běžně používá jako separační metoda pro oddělení těchto kvasinek od fermentující kapaliny. Kvasinkový kmen, který flokuluje předtím, než je dokončena fermentace, je však nežádoucí, protože kapalina nedosáhne ideálního obsahu alkoholu a zbytkových cukrů. Při kontinuální fermentaci, a zejména kontinuální fermentaci s plynovým výtahem a sací trubicou, působí flokulentní kvasinky jako imobilizační matrice. Jejich tendence se usazovat je kompenzována nástřikem plynu, který je udržuje v suspenzi. U takového systému je odstraněna obava z nedokvašení kapalného média, protože pevné částice neustále cirkulují a jsou udržovány v těsném kontaktu s fermentující kapalinou.

V sekci 6.2.2.1 byly charakterizovány superflokulentní kvasinky LCC290 z hlediska svých sedimentačních vlastností a výkonu při fermentaci. Důraz byl položen na identifikaci nástupu flokulace pro tento konkrétní kmen kvasinek. Kromě toho byla stanovena rychlost usazování kvasinek, poskytující cennou informaci, která může být použita v budoucnu pro projektování usazovacích nádob na kvasinky.

6.2.2.1. Charakterizace superflokulentních kvasinek LCC290

Před provedením kontinuální fermentace se superflokulentním kmenem LCC290 v bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou bylo rozhodnuto charakterizovat kvasinky v laboratorním měřítku při fermentaci v třepáčkách. Obr. 6.28 ukazuje vývoj populace kvasinek v čase. Podle očekávání koncentrace během prvních 48 h prudce rostla, pak se vyrovnala a ke konci fermentace došlo k mírnému poklesu. Během prvních 48 h byl ve sladince přítomen dostatek živin a kyslíku pro růst kvasinek. S tím, jak kvasinky konzumují sacharidy v nepřítomnosti kyslíku, nereprodu-

kují se a namísto toho vstupují do své anaerobní fermentativní fáze. Jakmile je zásoba sacharidů spotřebována, malá populace kvasinek začíná hynout. Tento jev je znázorněn na obr. 6.29, kde životnost kvasinek klesla z přibližně 97 % na těsně nad 90 %.

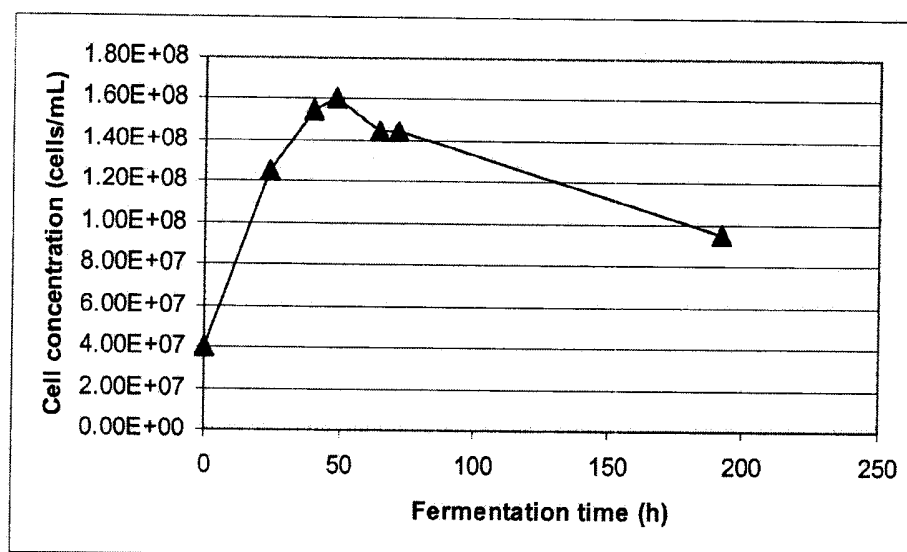
- 5 Obr. 6.30 znázorňuje spotřebu sacharidů v průběhu fermentace. Kvasinky spotřebovaly nejdříve cukry glukózu a fruktózu a pak postupně vychytávaly maltózu a maltotriózu. Pivovarské kvasinky však nejsou schopny metabolizovat ani maltotetózu ani polysacharidy s delším řetězcem (poly 1 & 2). Se snižováním celkové koncentrace sacharidů (představovaným křivkou specifické hmotnosti na obr. 6.31) úměrně vzrůstala koncentrace ethanolu. Přibližně po 37 h fermentace
10 byly koncentrace ethanolu a sacharidů stejné.

- Z hlediska růstu a metabolismu sacharidů se zdá, že superflokulentní kvasinky LCC290 se chovaly stejně jako průmyslový kmen kvasinek LCC3021. Zdálo se, že fermentace byla dokončena, když specifická hmotnost kapaliny dosáhla přibližně 2,7 °P. U flokulentních kmenů kvasinek je
15 obvyklé, že tvoří velké shluky (vločky) a před ukončením fermentace se usazují z roztoku; tento jev je v pivovarnickém průmyslu znám jako „zavěšená“ fermentace. V našich vsázkových pokusech jsme byli schopni fermentace ukončit, protože baňky byly třepány, a tak byly kvasinky udržovány v suspenzi a v těsném kontaktu se zásobou živin.

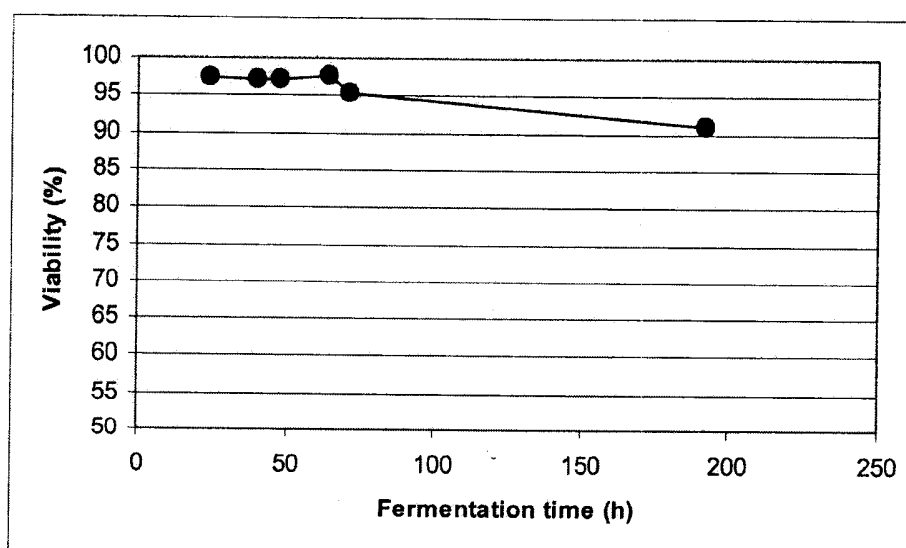
- 20 Další významnou charakteristikou, která byla zkoumána, byla schopnost kvasinek flokulovat. Zajímalo nás zejména zjištění rychlosti, se kterou se kvasinky usazují, stejně jako získání ukazatele, kdy tento konkrétní kmen kvasinek začne flokulovat. Obě tyto charakteristiky mají význam pro pokusy s kontinuální fermentací, protože hrají roli při udržování zdravé populace kvasinek ve fermentoru s plynovým výtahem. Obr. 6.32 ukazuje křivky usazování kvasinek v průběhu fermentace. K velmi malému usazování došlo u vzorku testovaného 24 h po zahájení fermentace.
25 Flokulace je inhibována přítomností určitých cukrů; známým inhibitorem je glukóza, a proto k flokulaci dojde, jen pokud se tento inhibitor odstraní. Ve vzorku po 40 h vsázkové fermentace začaly kvasinky flokulovat a odlučovat se z roztoku při testování metodou popsanou v sekci 4.7. Usazování bylo ve všech testovaných intervalech velmi rychlé s výjimkou intervalu 24 h, kde
30 k usazování nedošlo během nejpomalejšího usazovacího pokusu, provedeného po 40 h, trvalo kvasinkám 90 s, než se zcela odloučily ze zařízení. Po 71 h vyžadovalo usazení méně než 50 s.

- Výzkumníci předpokládají, že rychlost usazování je funkcí koncentrace pevného podílu (Coe a Clevenger, 1916). Na obr. 6.33 je vynesena rychlost usazování pevného podílu při dané koncentraci kvasinek. Body vytvářející tuto křivku byly generovány metodou, kterou navrhl Kynch (1952) pro data shromážděná v každém intervalu fermentace. Výsledky leží na přibližně stejné křivce, což potvrzuje stejný jev, jaký pozorovali Coe a Clevenger (1916).
35

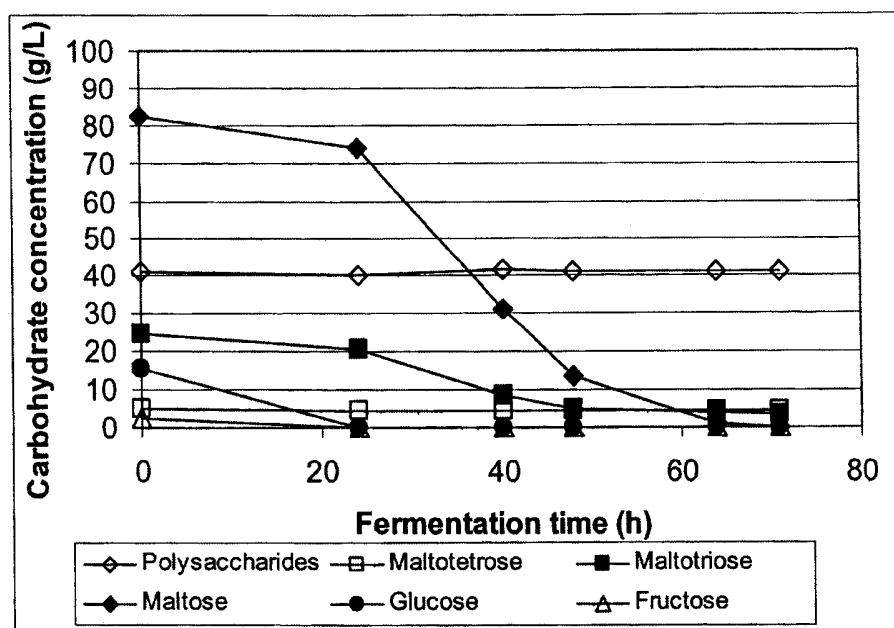
- Výsledky, získané během testu usazování, naznačují, že superflokulentní kmen kvasinek LCC290 bude flokulovat při specifické hmotnosti kapaliny 6 °P a nižší. Tato hodnota může být použita jako vodítko pro kontinuální fermentaci, naznačující, kde má být udržována specifická hmotnost pseudo–ustáleného stavu, mají-li se kvasinky udržovat flokulované. Provoz reaktoru nad 6 °P by mohl vést k destabilizaci flokulovaných buněk a případně vést k vymytí populace imobilizovaných kvasinek. Usazovací charakteristiky superflokulentních kvasinek naznačují, že se populace
40 kvasinek bude rychle odlučovat, pokud se ponechá stagnantní. S třífázovým bioreaktorem s plynovým výtahem a sací trubicou bude možno tyto kvasinky udržet v oběhu, avšak v případě poruchy systému přívodu plynu se populace kvasinek rychle odloučí a případně bude nutno k opětovnému suspendování pevného podílu zavést pomocné probublávání. pro post–fermentační zpracování je tato charakteristika rychlého usazování výhodná, protože pro odstranění velkého
45 objemu pevného podílu je možno použít separační zařízení pro pevné látky, jako jsou gravitační usazovaky. V pivovarnickém průmyslu se tím sníží zátěž odstředivacího zařízení pevným podílem, a tudíž se umožní delší běh mezi vyprazdňováním nádoby odstředivky. Je možno očekávat menší ztráty piva a minimalizaci cizích pachů (i když nepatrných), dodávaných pivu odstřediváním, v důsledku nižší hladiny biomasy kvasinek, procházející odstředivkou.
50



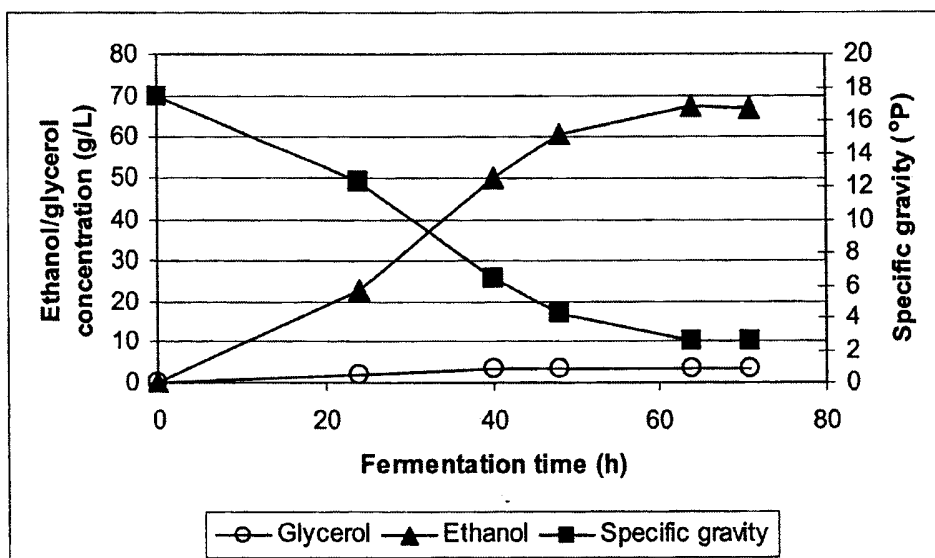
OBR. 6.28. CELKOVÁ KONCENTRACE KVASINEK LCC290 PŘI MÍCHANÉ VSÁZKOVÉ FERMENTACI PROTI DOBĚ FERMENTACE. TEPLOTA FERMENTACE BYLA UDRŽOVÁNA NA 15 °C.



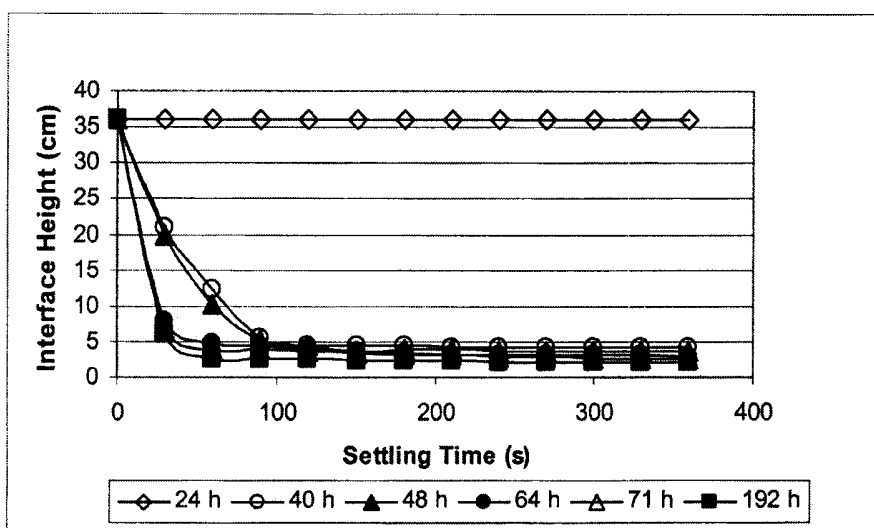
OBR. 6.29. ŽIVOTNOST KVASINEK, MĚŘENO METHYLENOVOU MODŘÍ, PROTI DOBĚ FERMENTACE.



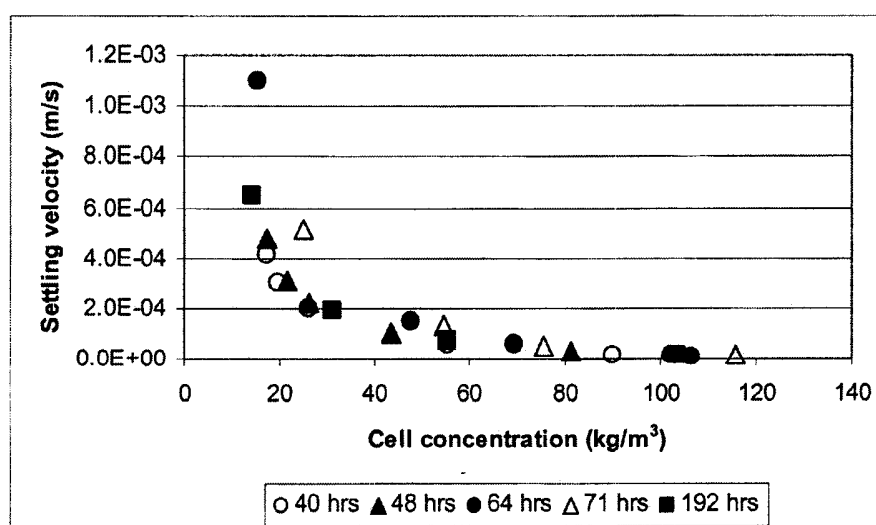
OBR. 6.30. PROFILY KONCENTRACE UHLOHYDRÁTŮ PROTI DOBĚ FERMENTACE PRO VSÁZKOVÉ FERMENTACE S KVASINKAMI LCC290.



OBR. 6.31. KONCENTRACE ETHANOLU A GLYCEROLU A SPECIFICKÁ HMOTNOST KAPALINY PROTI DOBĚ FERMENTACE PRO VSÁZKOVÉ FERMENTACE S KVASINKAMI LCC290.



OBR. 6.32. VÝŠKA ROZHRANÍ SUSPENZE KVASINEK PROTI DOBĚ USAZOVÁNÍ. HODNOTY PRO TENTO DIAGRAM BYLY ZÍSKÁNY V RŮZNÝCH FERMENTAČNÍCH INTERVALECH.



OBR. 6.33. RYCHLOST USAZOVÁNÍ SUSPENZE KVASINEK PROTI KONCENTRACI KVASINEK. HODNOTY PRO TENTO DIAGRAM BYLY ZÍSKÁNY V RŮZNÝCH FERMENTAČNÍCH INTERVALECH.

6.3. Hodnocení technologie plynového výtahu pro kontinuální fermentaci piva

5

Prvním a nejdůležitějším cílem této práce bylo zhodnotit možnost použití pilotního 50l bioreaktoru s plynovým výtahem při kontinuálním provozu s použitím κ -karagenanových gelových perliček k zachycení kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis* (popsány v sekci 6.2.1). Kromě toho bylo naším přáním zjistit, zda je možno v takovém systému produkovat ležák severoamerického

typu s přijatelnou kvalitou chuti. Rozhodli jsme se také stanovit minimální dobu zdržení, nutno pro úplné prokvašení sladiny s vysokou hmotností (17,5 °P), jakož i stanovit pracovní rozmezí pro kyslík v systému kontinuální fermentace.

- 5 Minimální doba zdržení, při které byly spotřebovány všechny cukry ze sladiny, byla 24 h. To je možno srovnat s klasickou dobou vsázkové fermentace 5 až 7 dní. Koncentrace rozpuštěného kyslíku, měřená zabudovanou Ingoldovou kyslíkovou sondou v bioreaktoru, byla blízká nule bez ohledu na kyslík přidávaný k probublávacímu plynu (pohybující se od 0 do 20 % obj.). To ukazuje, že kyslík, dodávaný do sladiny, byl buď rychle spotřebován kvasinkami, nebo byl prostě vy-
- 10 puštěn v odplynou. Množství volných kvasinek v případě piva bylo řádu 10^8 buněk na ml mladiny. Množství vicinálních diketonů, diacetylu a 2,3-pentandionu, stejně jako množství acetaldehydu, klesalo se snižujícím se poměrem kyslíku v probublávacím plynu (obr. 6.34 a 6.35). Nezdálo se, že by naměřené estery (ethylacetát a isoamylacetát) a vyšší alkoholy (propanol, isobutanol, isoamylalkohol) byly ovlivněny změnou dodávky kyslíku (obr. 6.36).

- 15 Obr. 6.37 srovnává různé chuťové aktivní sloučeniny ve dvou hotových zkušebních pivech, produkovaných s kontinuálním systémem imobilizovaných kvasinek, s kontrolním pivem, vyrobeným průmyslově (vsázková fermentace s volnými kvasinkami). Mezi kontinuálně fermentovaným pivem a kontrolou byly konzistentně pozorovány určité rozdíly v esterech (ethylacetát, iso-
- 20 amylacetát) a ve vyšších alkoholech (propanol) bez ohledu na velikost dodávky kyslíku. Chuť hotového piva, vyrobeného s 2 % kyslíku, byla zkušebním chuťovým panelem posouzena jako blízká kontrolnímu pivu (průmyslovému produktu). Pivo, vyrobené s 20 % kyslíku však bylo posouzeno jako nepříjemné se známkami oxidace pachu a s „papírovou“ a „vinnou“ chutí.

- 25 V pseudo–ustáleném stavu byl pilotní bioreaktor s dobou zdržení 24 h v provozu 6 týdnů. „Mladé“ pivo mělo přijatelný profil pachu a nebyly zaznamenány větší defekty (sirný pach). Množství kyslíku v probublávacím plynu se v těchto experimentech ukázalo být kritickým prvkem. Nejlepší chuťový profil měla piva vyráběná s 2 až 5 % kyslíku v probublávacím plynu. Tento kritický kontrolní bod vyžaduje další pozornost se soustředěním na přesnější metody měření kyslíku a
- 30 měření prováděné na větší sadě prefermentačních a post–fermentačních analytů.

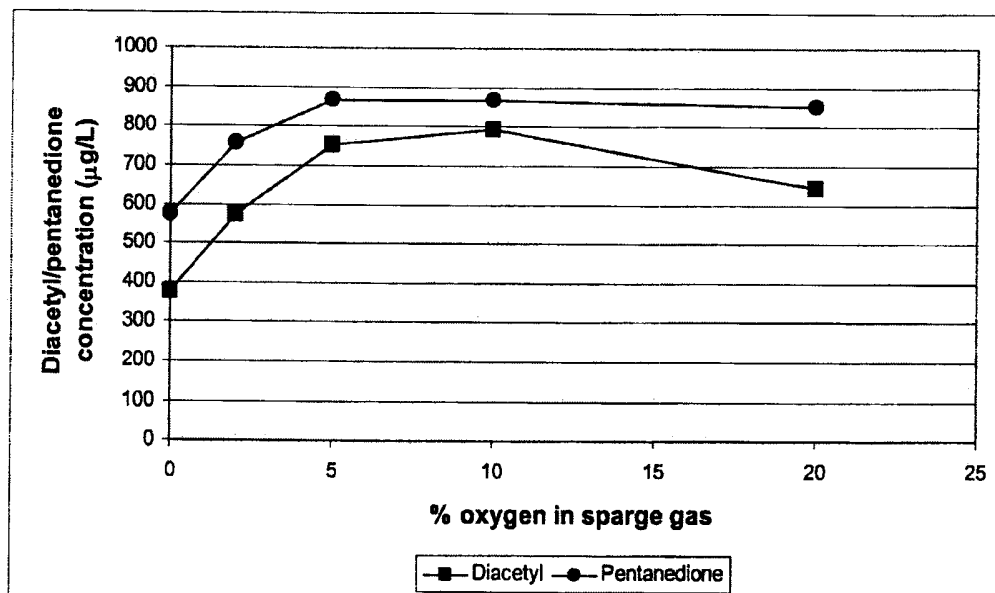
- V tradiční vsázkové primární fermentaci se do sladiny dávkuje kyslík předtím, než je převedena do fermentoru. Po inokulaci média koncentrace rozpuštěného kyslíku rychle klesá s tím, jak je kvasinky konzumují (prvních 24 h fermentace, kdy dochází k růstu kvasinek). Zbytek fermentace
- 35 se proto provádí za převážně anaerobních podmínek. Použití kontinuálního homogenního systému pro primární fermentaci tuto změnu koncentrace kyslíku v čase neumožňuje. Z toho důvodu může být velmi obtížné dosáhnout úplného vyrovnání chuti piva, produkovaného kontinuální a vsázkovou fermentací.

- 40 Bez ohledu na tyto rozdíly bylo s konfigurací bioreaktoru, testovanou v tomto počátečním hodnocení, produkováno pivo s nepříjemnou kvalitou chuti a analytickým profilem. S použitím bioreaktoru s plynovým výtahem s relativně malými perličkami (~1 mm) bylo možno zvýšit objemovou produktivitu reaktoru zkrácením doby primární fermentace o několik dní. Hladina biomasy, uvolněné v odcházejícím pivu, ukázala, že úroveň růstu kvasinek v bioreaktoru s imobilizovanými kvasinkami je za podobných podmínek ekvivalentní jako u vsázkové fermentace s volnými
- 45 kvasinkami. Tato pozorování potvrzují závislost tvorby chuti na úrovni růstu kvasinek. Tím lze vysvětlit nezdar předchozích pokusů o výrobu přijatelného piva s imobilizovanými systémy s omezeným růstem kvasinek. Přívod regulované plyné směsi může být významným nástrojem při jemném nastavování organoleptických vlastností piva při kontinuálních fermentacích s imobilizovanými kvasinkami.
- 50

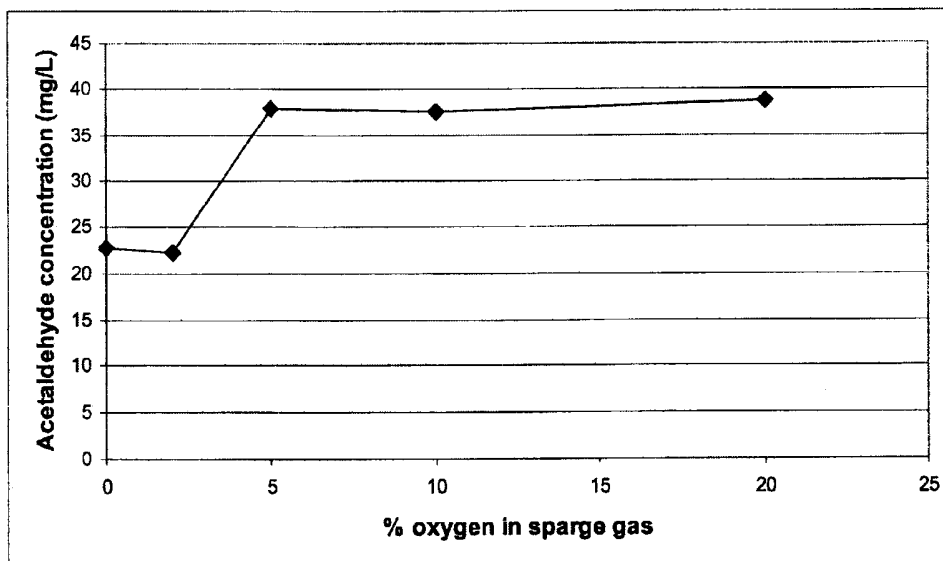
- Vysoká hladina diacetylu v odcházející kapalině byla pozorována též dalšími výzkumníky (Vir-kajarvi & Pohjala, 1999; Kronlof et al., 2000). V ležácích severoamerického typu je cílová hladina diacetylu 30 µg/l, oproti 400 až 800 µg/l v odcházející kapalině z kontinuální fermentace.
- 55 Použitím tradiční technologie zrání (zrání za studena při 2 °C po dobu 14 dní) se obsah diacetylu

snížil do žádoucího rozmezí, ale na úkor celkové produktivity procesu. Použití technologie rychlé sekundární fermentace, zmíněné v kapitole 2, napomůže snížení diacetylu bez významného snížení produktivity (2-hodinový proces). Náklady navíc však mohou být neúnosné a ne všichni pivovarníci mohou být ochotni vystavovat pivo vysokým teplotám (80 až 90 °C).

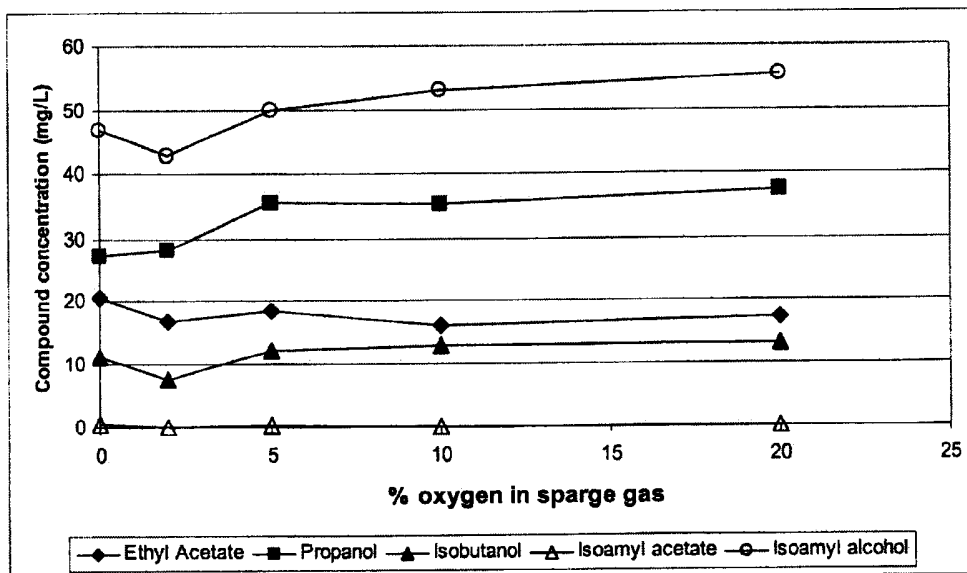
5



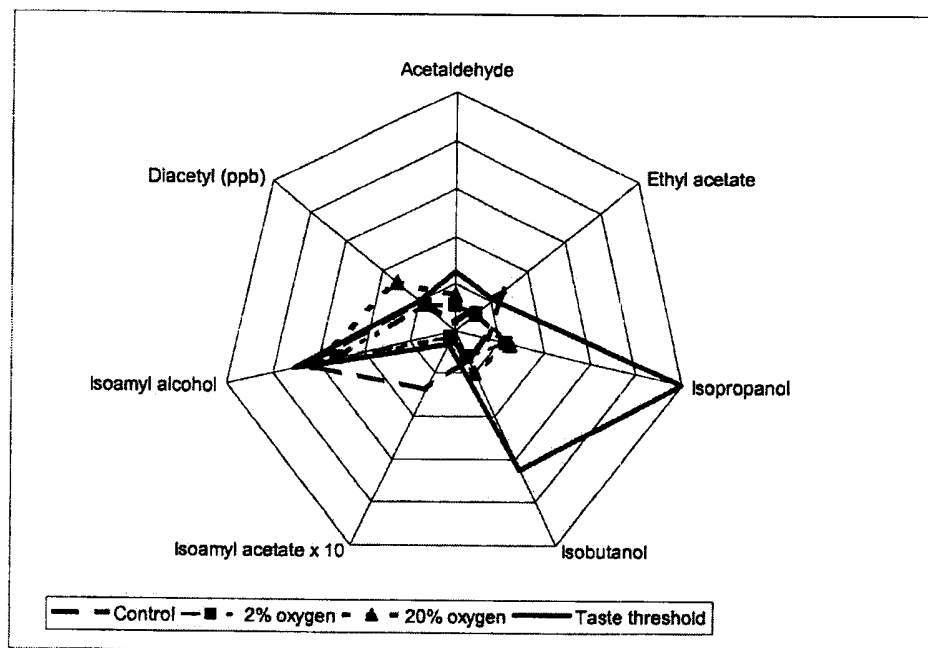
OBR. 6.34. KONCENTRACE VICINÁLNÍCH DIKETONŮ PROTI PROCENTU KYSLÍKU V PROBUBLÁVACÍM PLYNU. FERMENTACE BYLY PROVÁDĚNY V 50L SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM, PLNĚNÉM 40 % (OBJ.) KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČEK. CELKOVÁ RYCHLOST PROBUBLÁVACÍHO PLYNU BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 6,4 SCFH. DOBA ZDRŽENÍ BYLA 24 HODIN.



OBR. 6.35. KONCENTRACE ACETALDEHYDU PROTI PROCENTU KYSLÍKU V PROBUBLÁVACÍM PLYNU. FERMENTACE BYLY PROVÁDĚNY V 50L SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM, PLNĚNĚM 40 % (OBJ.) KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČEK. CELKOVÁ RYCHLOST PROBUBLÁVACÍHO PLYNU BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 6,4 SCFH. DOBA ZDRŽENÍ BYLA 24 HODIN.



OBR. 6.36. KONCENTRACE ESTERŮ A PŘIBOUDLINOVÝCH ALKOHOLŮ PROTI PROCENTU KYSLÍKU V PROBUBLÁVACÍM PLYNU. FERMENTACE BYLY PROVÁDĚNY V 50L SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM, PLNĚNĚM 40 % (OBJ.) KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČEK. CELKOVÁ RYCHLOST PROBUBLÁVACÍHO PLYNU BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 6,4 SCFH. DOBA ZDRŽENÍ BYLA 24 HODIN.



OBR. 6.37. POROVNÁNÍ DOKONČENÉHO PRODUKTU VYROBENÉHO S 2% KYSLÍKU A 20 % KYSLÍKU V PROBUBLÁVACÍM PLYNU OPROTI PRŮMYSLOVĚ VYROBENÉMU PIVU A CHUŤOVÝM PRAHŮM. PRO PRODUKTY KONTINUÁLNÍ FERMENTACE BYLY FERMENTACE PROVÁDĚNY V 50L SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM, PLNĚNÉM 40 % (OBJ.) KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČEK. CELKOVÁ RYCHLOST PROBUBLÁVACÍHO PLYNU BYLA UDRŽOVÁNA KONSTANTNĚ NA 6,4 SCFH. DOBA ZDRŽENÍ BYLA 24 HODIN.

6.4. Rychlosti míchání a cirkulace při fermentacích v třífázovém bioreaktoru s plynovým výta-
hem a sací trubicou

5

Míchací experimenty byly prováděny s použitím metody nástřiku kyseliny, popsané v sekci 4.8. Tato fáze experimentů měla dva cíle. Nejprve jsme chtěli zjistit, zda je systém s plynovým výta-
hem dobře míchán, vypočtením rychlosti cirkulace kapaliny a výsledné doby míchání pro různé
imobilizační nosiče při různých povrchových rychlostech fluidizačního plynu. Rozdíl oproti po-
kusům popsáným v literatuře spočíval v tom, že celý experiment byl prováděn na skutečném
fermentačním médiu s aktivními kvasinkami místo na modelových roztocích (systémy voda-
pevná látka–plyn). Tyto míchací systémy byly zaměřeny také na výpočet povrchových rychlostí
kapaliny, které by mohly být použity pro budoucí zvětšení měřítka pilotního systému.

10

15 6.4.1 Kalibrace sond

pH sonda, používaná ve studiích míchání, byla kalibrována pomocí metody popsané v sekci 4.8. 4–20 mA signál, vysílaný pH sondou, byl veden přes 250ohmový rezistor a transformován na 1–
5 voltový signál, který mohl být zaznamenán štítkem pro sběr dat (data acquisition card; DAC).
pH sonda byla postupně ponořována do těchto pufrů: pufr o pH 4,6, pufr o pH 4,0, pufr o pH 5,0,
pufr o pH 6,0 a nakonec do pufru o pH 7,0 (Beckmanovy osvědčené standardy, Cole Parmer).
Obr. 6.38 uvádí data získaná sběrným systémem pro reakci Ingoldovy pH sondy na 5 standard-
ních pH roztoků. Obr. 6.39 představuje kalibrační křivku pH sondy, na níž je vynesena skutečná
hodnota pH proti naměřenému napětí signálu. Optimální kalibrační křivka pro tento systém (ko-
relační koeficient 0,9996) byla definována pomocí rovnice:

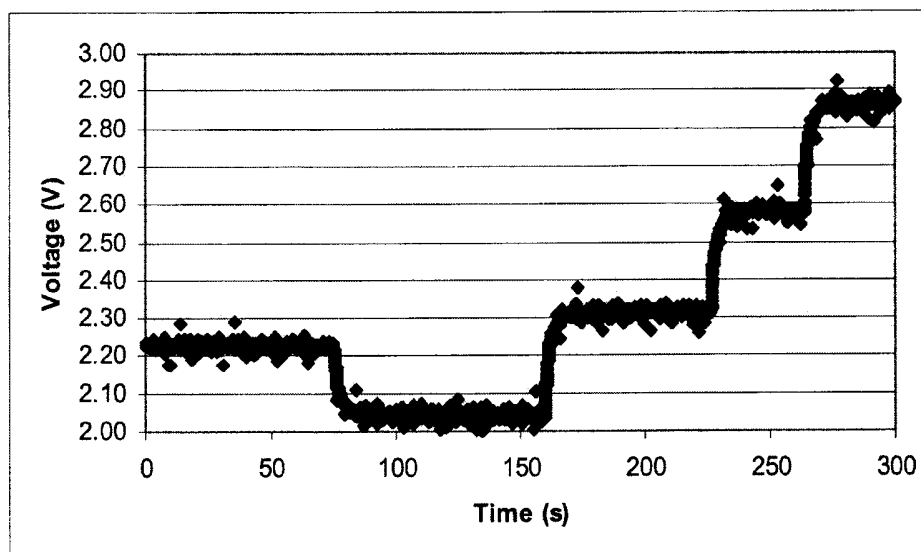
25

$$\text{pH} = 3,68 \times \text{napětí} - 3,53 \quad (6.1)$$

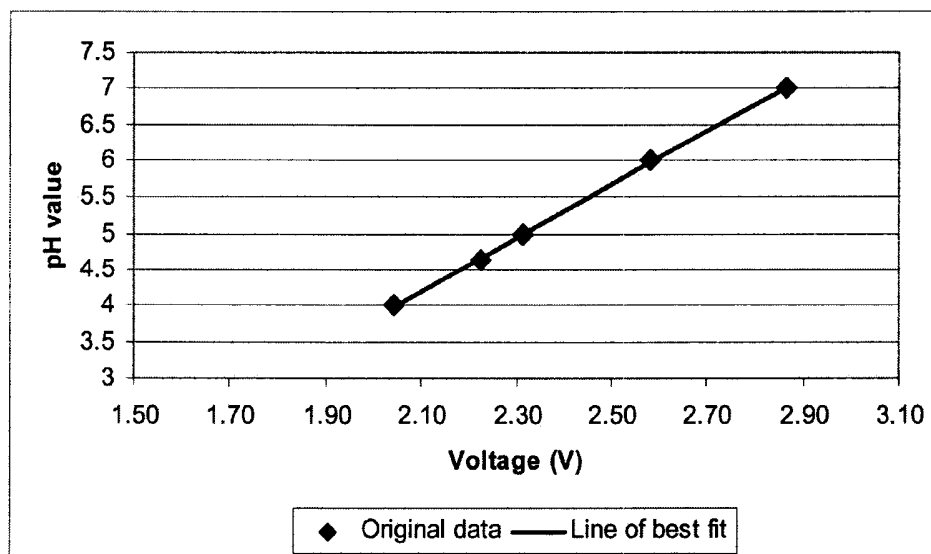
5 Získaná data o míchání byla transformována pomocí rovnice 6.1, aby odrážela skutečné hodnoty pH naměřené uvnitř bioreaktoru s plynovým výtahem.

10 Byla rovněž měřena doba reakce pH sondy na změnu pH. Obr. 6.40 až 6.43 znázorňují typickou odpověď pH sondy na různé skokové změny pH, konkrétně 0,6, 1,2, 2,3 a 3,4 jednotek. Původní data byla přizpůsobena pulsové funkci pomocí zabudovaného software pro zobrazování a analýzu dat TableCurve 2D (Jandel Scientific). Výsledné proložení křivky mělo vždy korelační koeficient vyšší než 0,994. Z těchto křivek byla vypočtena doba, za kterou sonda reaguje na 98 % skokových změn (doba reakce), a byla vynesena proti skokové změně pH (obr. 6.44). V testovaných rozmezích doba reakce klesala se skokovou změnou pH. Pro nejmenší skokovou změnu 0,6 byla reakce pH sondy ~ 6,4 sekund. Pro skokovou změnu pH 3,4 doba reakce klesla na asi 4,2 sekund.

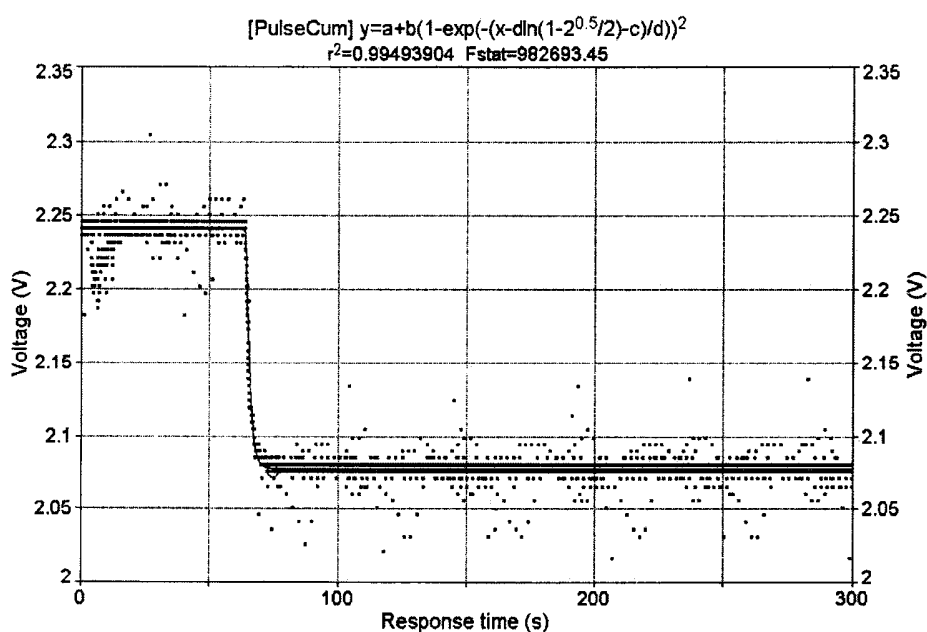
15 Tento typ charakterizace sondy je významný, zejména jestliže se systém používá pro hodnocení doby míchání a rychlosti cirkulace. Sonda by měla mít krátkou dobu reakce, aby mohla při měření odrážet změny v médiu. Doba reakce pH sondy musí být zejména menší než je rychlost cirkulace v reaktoru, má-li být při tomto měření používána přesně. Kvazi-okamžitá reakce však není
20 nutná, protože mírné zpoždění odpovědi se prostě odrazí v následných měřeních rychlosti cirkulace, a tudíž se vynuluje.



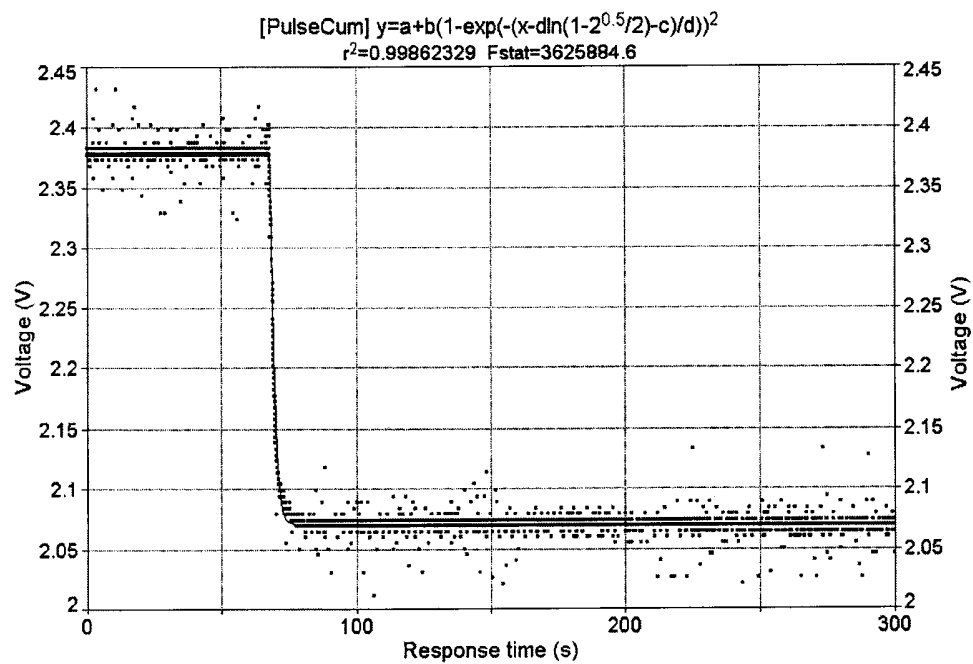
OB. 6.38. PŮVODNÍ DATA ZÍSKANÁ SBĚRNÝM SYSTÉMEM PRO ODPOVĚĎ INGOLDOVY pH SONDY NA RŮZNÉ ROZTOKY PUFRŮ PROTI ČASU. FREKVENCE SBĚRU BYLA 50 Hz PRO CELKEM 15000 BODŮ.



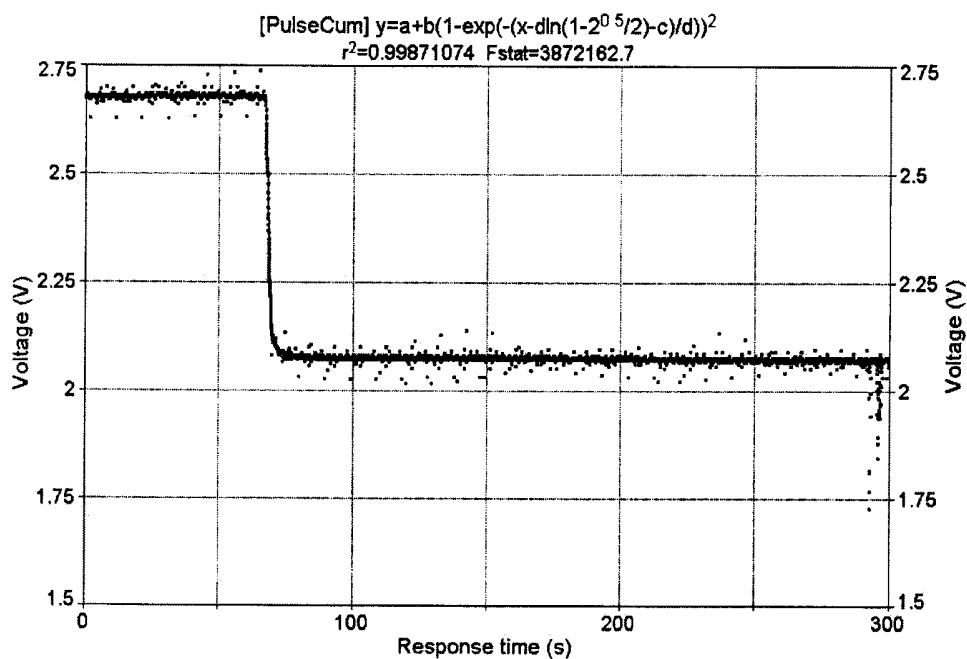
OBR. 6.39. KALIBRAČNÍ KŘIVKA pH SONDY, PŘEDSTAVUJÍCÍ pH V ZÁVISLOSTI NA NAMĚŘENÉM NAPĚTÍ (V). OPTIMÁLNÍ ČÁRA ODPOVÍDÁ ROVNICI: $\text{pH} = 3,68 \times \text{NAPĚTÍ} - 3,53$ S KORELAČNÍM KOEFICIENTEM 0,9996. (N=2500).



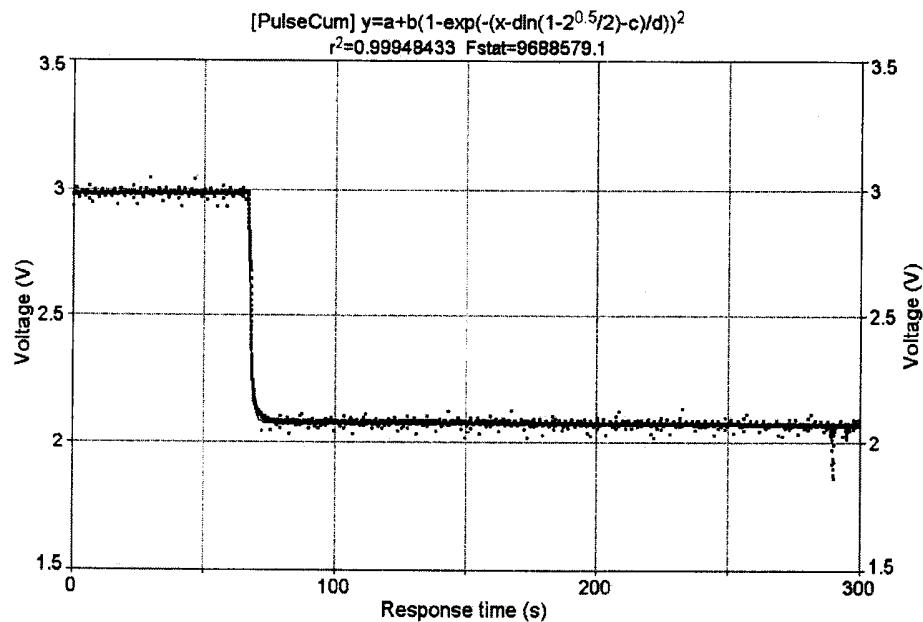
OBR. 6.40. TYPICKÁ DATA DOBY REAKCE pH SONDY NA SKOKOVOU ZMĚNU pH $\sim 0,6$. REAKCE BYLA UPRAVENA POMOCÍ SOFTWARE TABLECURVE. OPTIMÁLNÍ PULSNÍ FUNKCE MĚLA KORELAČNÍ KOEFICIENT 0,995.



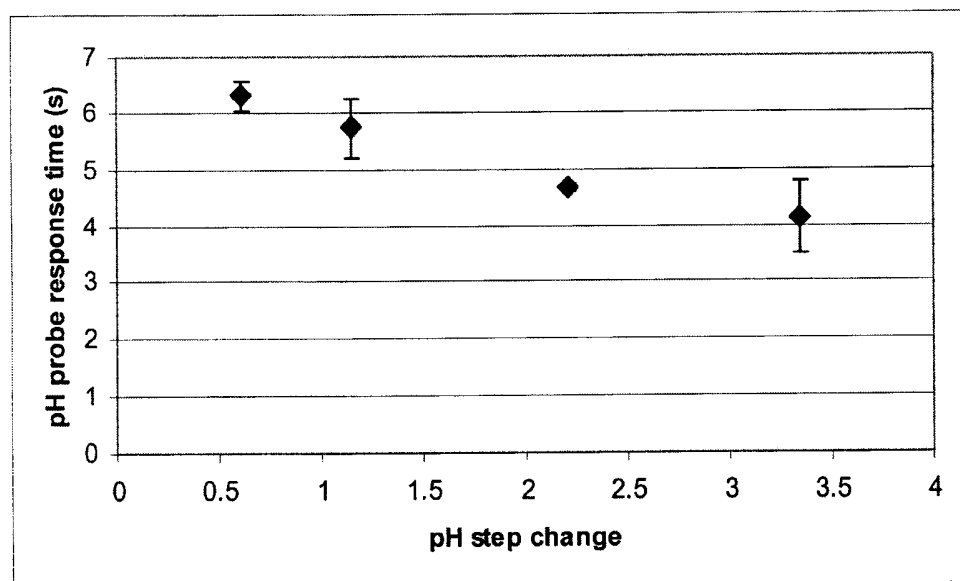
**OBR. 6.41. TYPICKÁ DATA DOBY REAKCE pH SONDY NA SKOKOVOU ZMĚNU pH ~1,2.
 REAKCE BYLA UPRAVENA POMOCÍ SOFTWARE TABLECURVE. OPTIMÁLNÍ PULSNÍ FUNKCE
 MĚLA KORELAČNÍ KOEFICIENT 0,999.**



OBR. 6.42. TYPICKÁ DATA DOBY REAKCE pH SONDY NA SKOKOVOU ZMĚNU pH ~2,3. REAKCE BYLA UPRAVENA POMOCÍ SOFTWARE TABLECURVE. OPTIMÁLNÍ PULSNÍ FUNKCE MĚLA KORELAČNÍ KOEFICIENT 0,999.



OBR. 6.43. TYPICKÁ DATA DOBY REAKCE pH SONDY NA SKOKOVOU ZMĚNU pH ~3,4. REAKCE BYLA UPRAVENA POMOCÍ SOFTWARE TABLECURVE. OPTIMÁLNÍ PULSNÍ FUNKCE MĚLA KORELAČNÍ KOEFICIENT 0,999.



OBR. 6.44. DOBA REAKCE INGOLDVY PH SONDY NA SKOKOVOU ZMĚNU (N = 3). SONDY BYLY PONOŘENY DO PUFRU S VYŠŠÍM PH A PAK IHNEDE VYSTAVENY PUFRU S NIŽŠÍM PH 4,0. PRO KAŽDOU KŘIVKU ODPOVĚDI BYLA IDEÁLNÍ KŘIVKA POUŽITA PRO VÝPOČET DOBY NUTNÉ K TOMU, ABY SONDA DOSÁHLA 98 % SKOKOVÉ ZMĚNY.

6.4.2. Doba míchání a rychlosti cirkulace

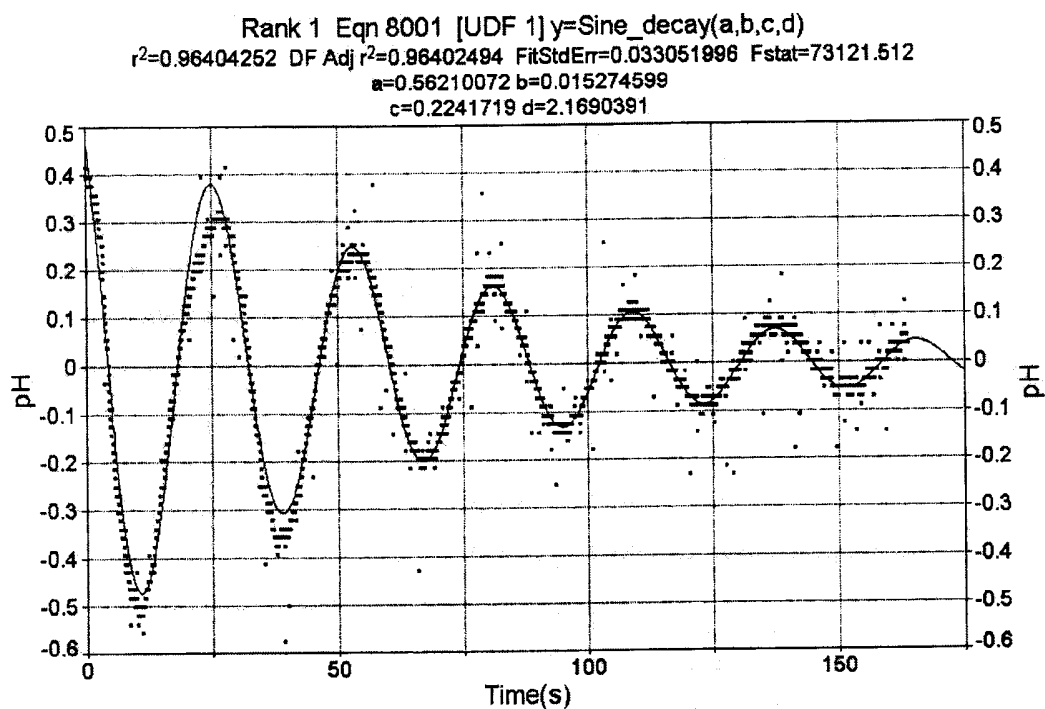
- 5 Experimenty, týkající se doby míchání a rychlosti cirkulace, byly prováděny na třech typech fermentace s imobilizovanými kvasinkami. Experimenty byly prováděny v 50l pilotním bioreaktoru se sací trubicou na modelovém vodném roztoku, neobsahujícím pevný podíl, a pak na fermentační živné půdě se specifickou hmotností 2,7 °P, obsahující buď κ -karagenanové gelové perličky, superflokulentní kvasinky LCC290 nebo středně flokulentní kvasinky LCC3021. Obr. 6.45 a 6.46 jsou vzorková zobrazení surových dat, získaných pomocí systému pH sond po nástřiku pulsu kyseliny (metoda popsaná v sekci 4.8). Obr. 6.45 znázorňuje reakci pH sondy na nástřik kyseliny do vodného roztoku, neobsahujícího pevný podíl, zatímco obr. 6.46 znázorňuje odpověď na nástřik kyseliny do fermentačního média obsahujícího vysoce flokulentní kvasinky LCC290. Signály byly přizpůsobeny útlumové sinusoidě a pro odpovídající reakce byl vypočten korelační koeficient 0,96, resp. 0,90. Parametry „b“ a „c“ v diagramech odpovídají hodnotám „a“ a „ α “ uvedeným v útlumové sinusoidě (3.1). Tyto numerické hodnoty byly použity v rovnicích 3.2 a 3.3 k výpočtu rychlosti cirkulace a doby míchání pro daný systém. Zbylá data o míchání a získání křivky pro všechny experimenty jsou uvedeny v příloze B.
- 10
- 15
- 20 Obr. 6.47 a 6.48 představují grafy doby míchání a rychlosti cirkulace pro nástřik kyseliny do vodného roztoku neobsahujícího pevný podíl. Obr. 6.49 a 6.50 představují odpovídající grafy pro míchací experimenty s vysoce flokulentními kvasinkami LCC290, zatímco výsledky míchacích testů s κ -karagenanem jsou zobrazeny na obr. 6.51 a 6.52. Konečně doby míchání a doby cirkulace pro středně flokulentní kvasinky LCC3021 jsou zobrazeny na obr. 6.53 a 6.54. Bez ohledu na typ testované pevné látky jak doba míchání, tak rychlost cirkulace klesala s odpovídajícím vzrůstem povrchové rychlosti plynu. Vztah mezi rychlostí cirkulace a povrchovou rychlostí kapaliny pro všechny testované systémy odpovídal rovnici 3.11, kterou navrhli Kennard a Janekah (1991). Doba míchání se vztahem daným rovnicí 3.11 řídila u systému voda/žádný pevný podíl a systému κ -karagenanových gelových perliček. Oba systémy s flokulentními kvasinkami jako
- 25
- 30 imobilizační maticí nevykazovaly s teoretickým modelem Kennard a Janekah silnou korelaci.

Systémy LCC290 a LCC3021 měly počáteční dobu míchání (než povrchová rychlost plynu překročila 4 mm/s) nižší, než model předpokládá. Rychlost poklesu doby míchání se však při povrchových rychlostech plynu větších než 4 mm/s zpomalila při nižších hodnotách modelu. Tabulka 6.1 poskytuje odvozené rovnice pro dobu cirkulace a dobu míchání na základě jejich vztahu k povrchové rychlosti plynu.

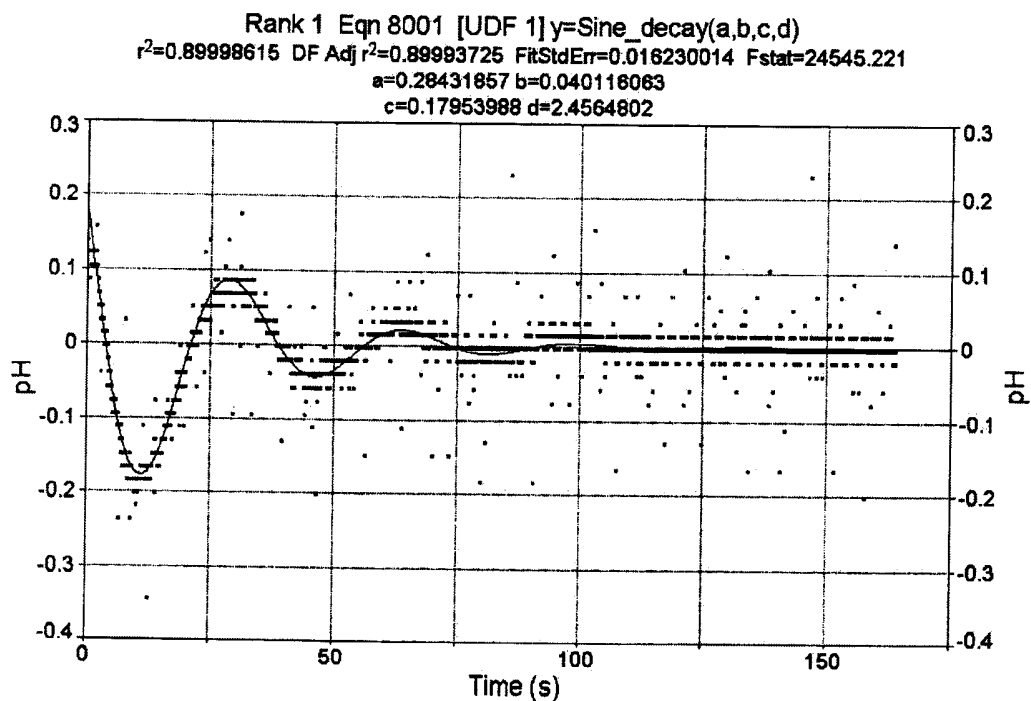
Obr. 6.55 znázorňuje vztah doby míchání proti povrchové rychlosti plynu pro všechny čtyři systémy. Scénář voda/žádný pevný podíl vykázal nejdelší dobu pro 98 % míchání pH pulsu (cca 220 sekund při V_{sg} 3 mm/s) a systém LCC290 prokázal nejlepší schopnost minimalizovat účinek pulsu kyseliny na systém (cca 110 sekund při V_{sg} 3 mm/s). Hodnoty pro systémy s LCC3021 a κ -karagenanem byly mezi těmito dvěma systémy. Pevný podíl v bioreaktoru s plynovým výtahem napomáhá dispergaci tekutých prvků kapalně fáze tím, že stimuluje tvorbu vírů a podporuje koaxiální míchání. Superflokulentní kvasinky LCC290, i když mají stejnou náplň pevných látek (16 % w/v) jako středně flokulentní kvasinky LCC3021, umožňovaly při všech testovaných povrchových rychlostech plynu rychlejší doby míchání.

Obr. 6.56 zobrazuje doby cirkulace proti povrchové rychlosti plynu pro všechny čtyři testované systémy. Při povrchové rychlosti plynu 2 mm/s se doba cirkulace pohybovala mezi 28 a 35 sekundami, přičemž systém voda/žádný pevný podíl měl největší rychlosti cirkulace a systém LCC290 vykazoval nejmenší rychlost cirkulace. Při vyšších rychlostech plynu se rozdíl mezi všemi 4 systémy snížil na přibližně 3 sekundy. Při všech testovaných rychlostech však systém LCC290 vykazoval mírně nižší rychlosti cirkulace, zatímco systém voda/žádný pevný podíl měl největší rychlost cirkulace.

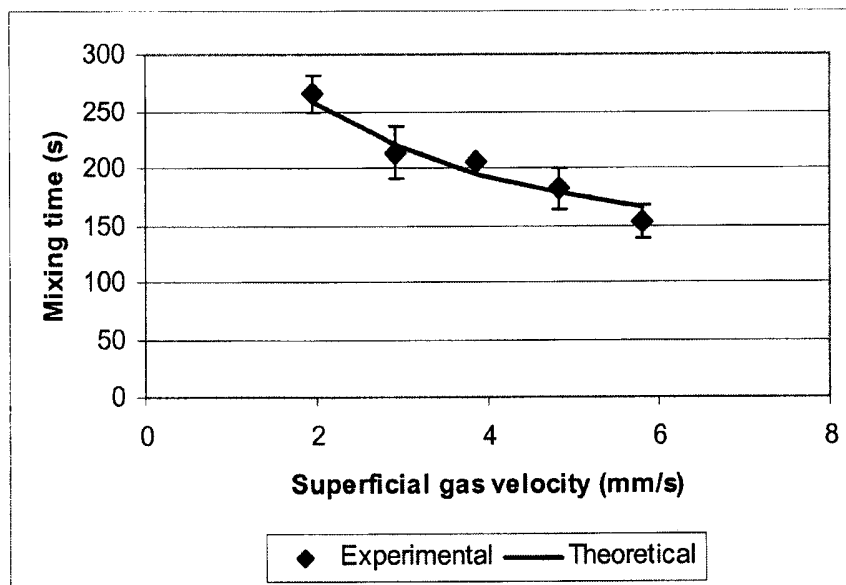
Obr. 6.57 znázorňuje vztah mezi povrchovou rychlostí plynu a povrchovou rychlostí kapaliny. Pro výpočet povrchové rychlosti kapaliny pro danou rychlost cirkulace a typ pevné látky byla použita rovnice 3.7, kterou navrhli Livingston a Zhang (1993). Povrchová rychlost kapaliny vzrůstala s odpovídajícím vzrůstem povrchové rychlosti plynu. Systémy LCC3021 a voda/žádný pevný podíl měly podobný trend, zatímco systémy s LCC290 a κ -karagenanem vykazovaly určitou podobnost. Na křivky povrchové rychlosti kapaliny proti povrchové rychlosti plynu na obr. 6.57 byla aplikována modelová rovnice, kterou navrhli Kennard a Jenekah. Na obr. 6.58 je vynešena experimentálně vypočtená povrchová rychlost kapaliny proti teoreticky vypočtené povrchové rychlosti kapaliny s použitím rovnice 3.10. Všechny čtyři systémy s navrženou rovnicí souhlasí, jak vyplývá z lineární funkce se směrnici 1 a počátkem $y = 0$. Tabulka 6.1 uvádí korelace, které byly odvozeny pro systémy, testované v této výzkumné práci.



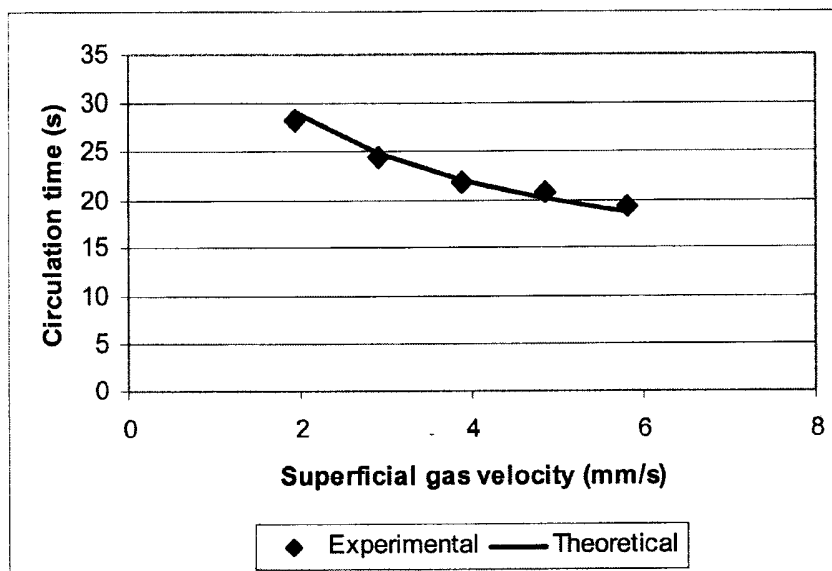
OBR. 6.45. ÚDAJE O REAKCI pH SONDY V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. DO VODNÉHO ROZTOKU NEOBSAHUJÍCÍHO PEVNÝ PODÍL BYL NASTŘÍKNUT PULS KYSELINY. POVRCHOVÁ RYCHLOST PLYNU BYLA NASTAVENA NA 1,94 MM/S. PŮVODNÍMI DATY BYLA PROLOŽENA ÚTLUMOVÁ SINUSOIDA. KOEFICIENT KORELACE BYL 0,96.



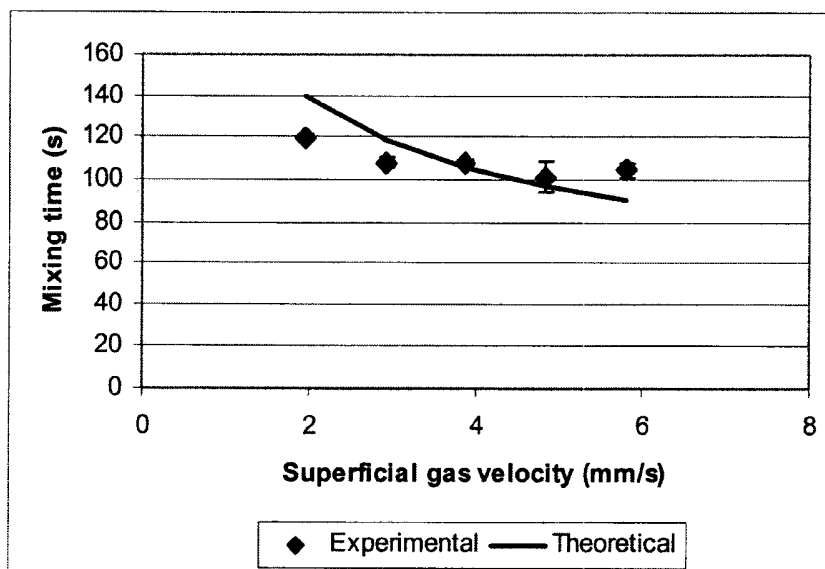
OBR. 6.46. ÚDAJE O REAKCI PH SONDY V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO VYSOCE FLOKULENTNÍ KVASINKY LCC290 BYL NASTŘÍKNUT PULS KYSELINY. POVRCHOVÁ RYCHLOST PLYNU BYLA NASTAVENA NA 1,94 MM/S. PŮVODNÍMI DATY BYLA PROLOŽENA ÚTLUMOVÁ SINUSOIDA. KOEFICIENT KORELACE BYL 0,90.



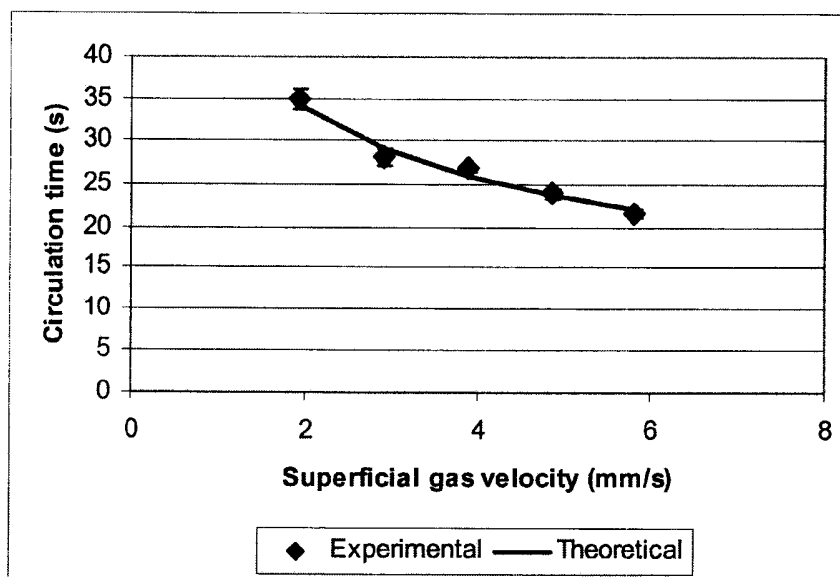
OBR. 6.47. DOBA MÍCHÁNÍ PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. DO VODNÉHO ROZTOKU NEOBSAHUJÍCÍHO PEVNÝ PODÍL BYL NASTŘÍKNUT PULS KYSELINY. DOBA MÍCHÁNÍ ODPOVÍDÁ DOBĚ NUTNÉ PRO ANULACI 98% SKOKOVÉ ZMĚNY. (N = 3)



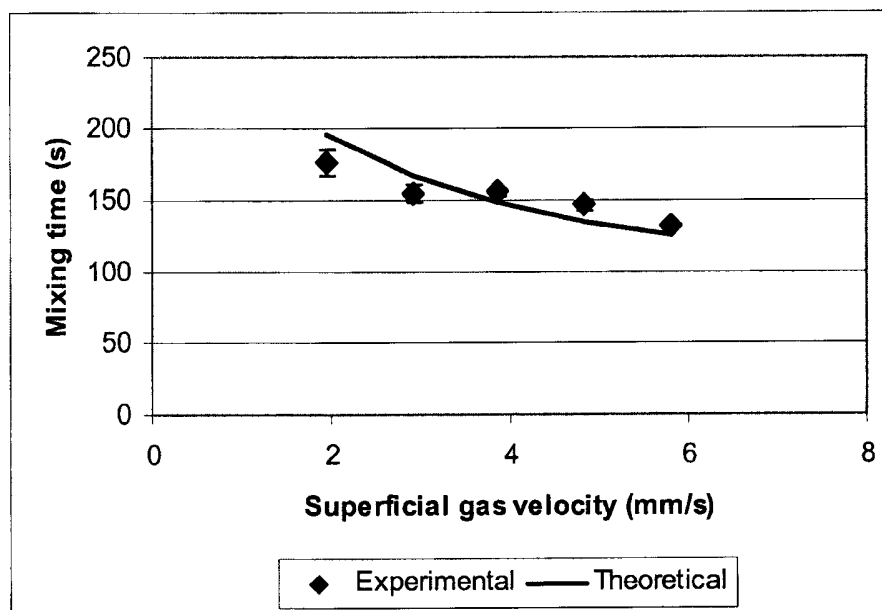
OBR. 6.48. DOBA CÍRKULACE PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. DO VODNÉHO ROZTOKU NEOBSAHUJÍCÍHO PEVNÝ PODÍL BYL NASTŘÍKNUT PULS KYSELINY. (N = 3)



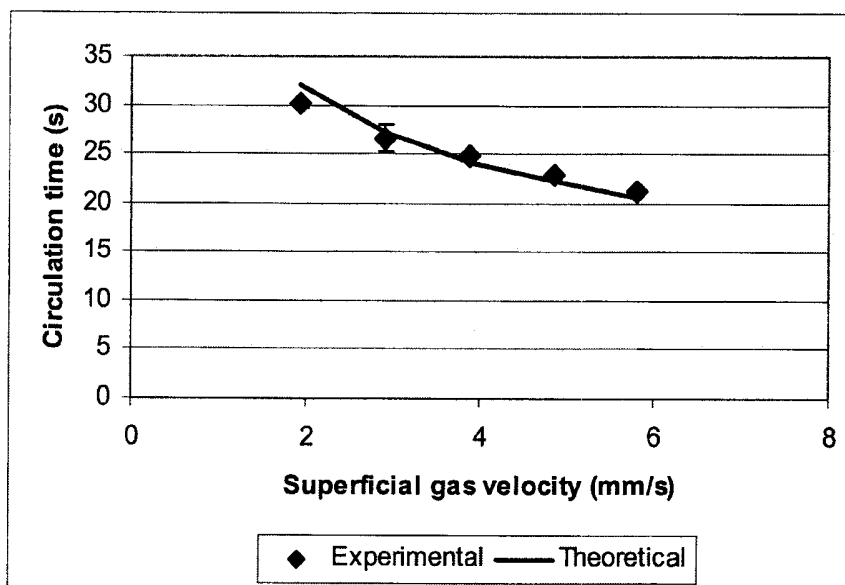
OBR. 6.49. DOBA MÍCHÁNÍ PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO VYSOCE FLOKULENTNÍ KVASINKY LCC290 (VELIKOST VLOČKY > 1,0 MM) BYL NASTŘÍKNUT PULS KYSELINY. DOBA MÍCHÁNÍ ODPOVÍDÁ DOBĚ NUTNÉ PRO ANULACI 98 % SKOKOVÉ ZMĚNY. (N = 3)



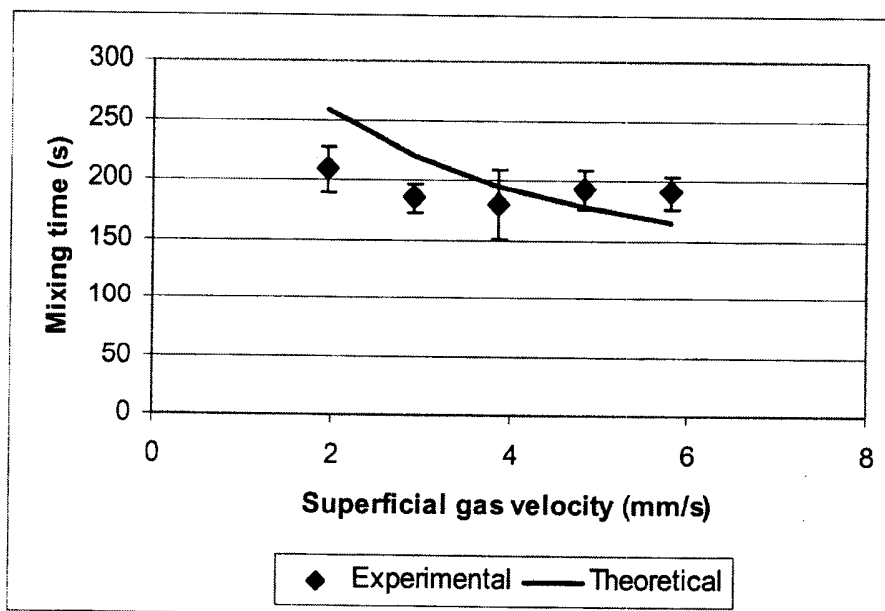
OBR. 6.50. DOBA CÍRKULACE PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO VYSOCE FLOKULENTNÍ KVASINKY LCC290 (VELIKOST VLOČKY > 1,0 MM). (N = 3)



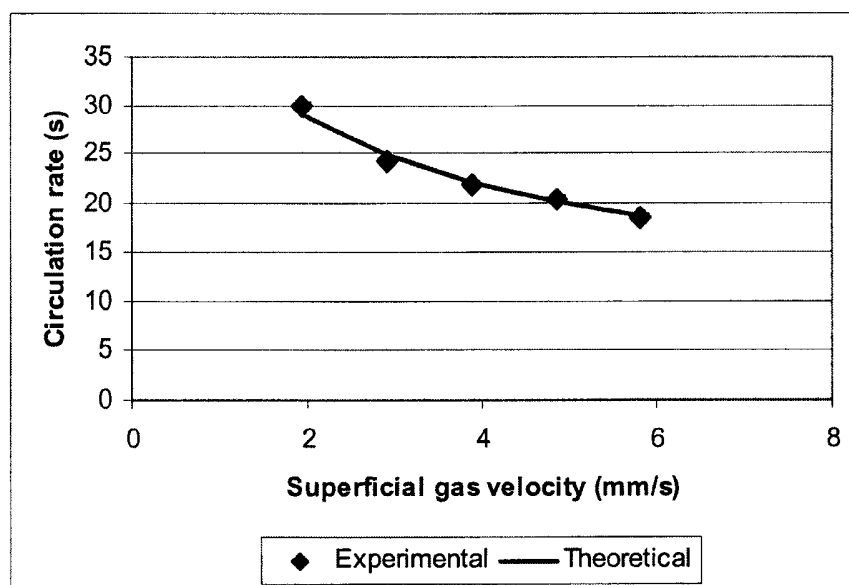
OBR. 6.51. DOBA MÍCHÁNÍ PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO KVASINKY LCC3021, IMOBILIZOVANÉ V κ -KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČKÁCH (VELIKOST PERLIČEK 1 až 2 MM). DOBA MÍCHÁNÍ ODPOVÍDÁ DOBĚ NUTNÉ K ANULACI 98 % SKOKOVÉ ZMĚNY. (N = 3)



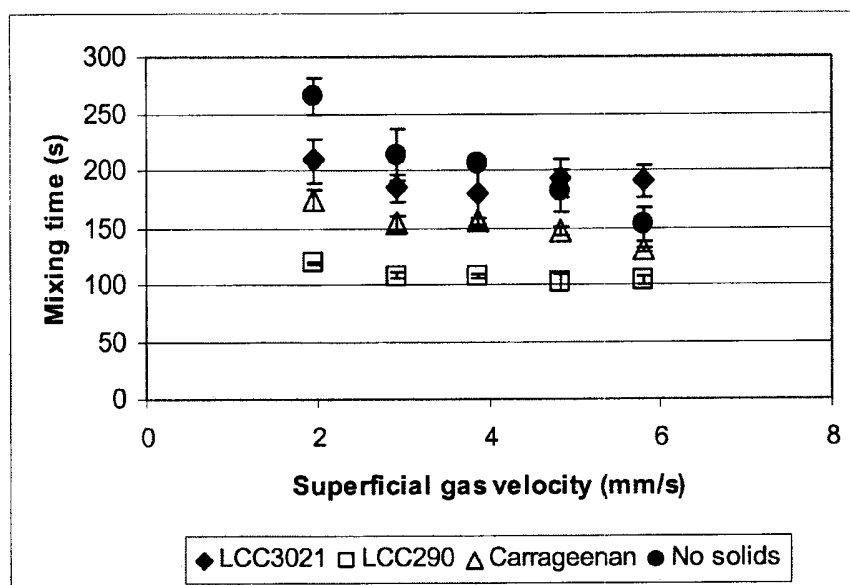
OBR. 6.52. DOBA CÍRKULACE PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO KVASINKY LCC3021, IMOBILIZOVANÉ V κ -KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČKÁCH (VELIKOST PERLIČEK 1 až 2 MM). (N = 3)



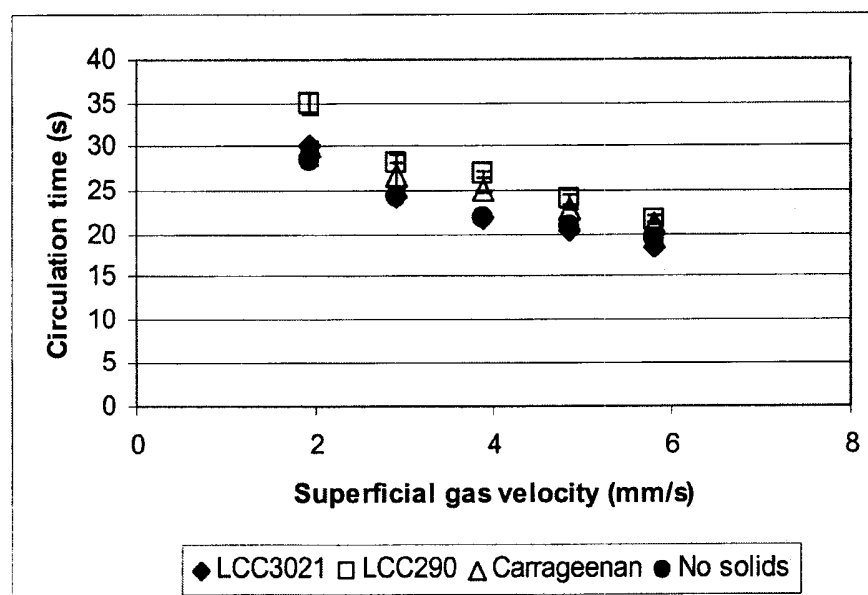
OBR. 6.53. DOBA MÍCHÁNÍ PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO STŘEDNĚ FLOKULENTNÍ KVASINKY LCC3021 (VELIKOST VLOČKY < 0.5 MM). DOBA MÍCHÁNÍ ODPOVÍDÁ DOBĚ NUTNÉ K ANULACI 98 % SKOKOVÉ ZMĚNY. (N = 3)



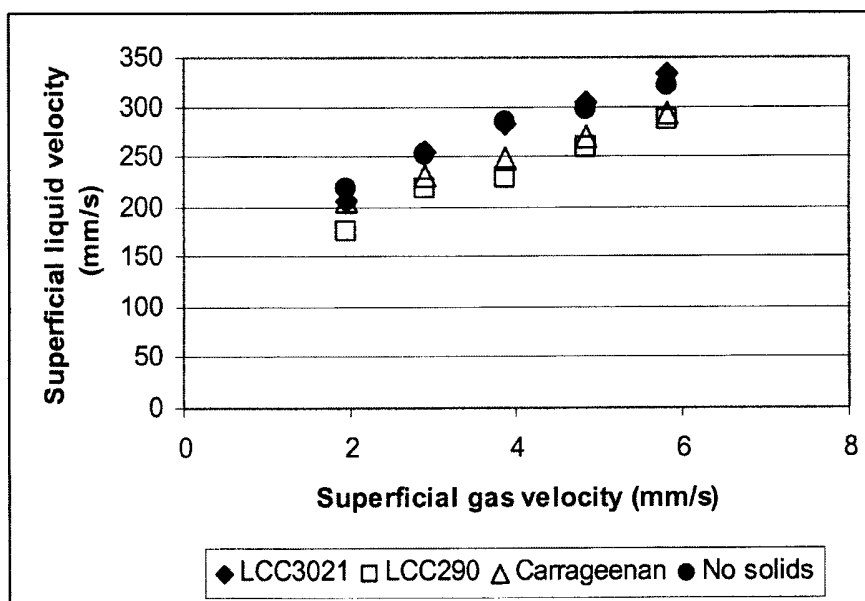
OBR. 6.54. DOBA CÍRKULACE PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO STŘEDNĚ FLOKULENTNÍ KVASINKY LCC3021 (VELIKOST VLOČKY < 0.5 MM). (N = 3)



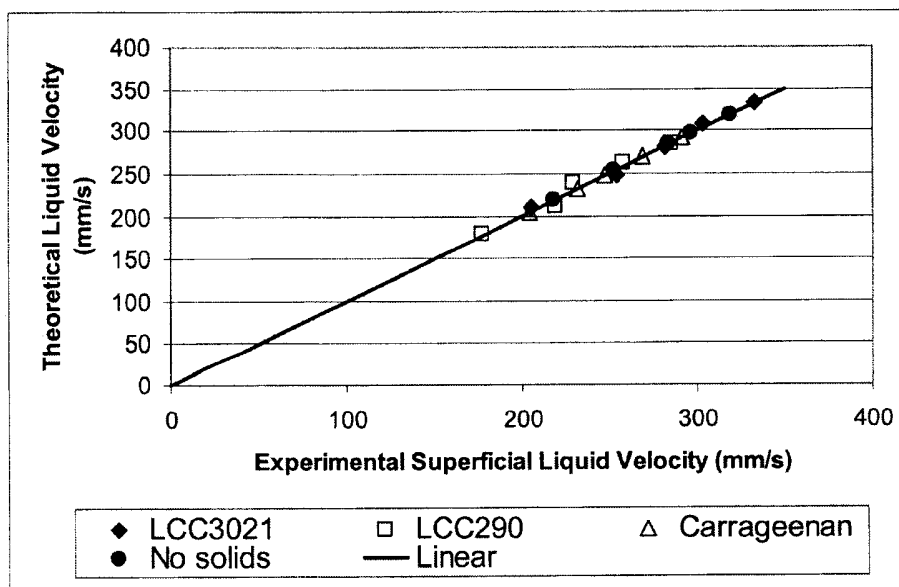
OBR. 6.55. DOBA MÍCHÁNÍ PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO RŮZNÉ PEVNÉ LÁTKY. DOBA MÍCHÁNÍ ODPOVÍDÁ DOBĚ NUTNÉ K ANULACI 98 % SKOKOVÉ ZMĚNY. (N = 3)



OBR. 6.56. DOBA CÍRKULACE PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU V 50L BIOREAKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU. PULS KYSELINY BYL NASTŘÍKNUT DO FERMENTAČNÍHO MÉDIA OBSAHUJÍCÍHO RŮZNÉ PEVNÉ LÁTKY. (N = 3)



OBR. 6.57. POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (MM/S) PROTI POVRCHOVÉ RYCHLOSTI PLYNU (MM/S) PRO ČTYŘI TESTOVANÉ SYSTÉMY – KVASINKY LCC3021, KVASINKY LCC 290, KARAGENANOVÉ GELOVÉ PERLIČKY A SYSTÉM VODA/ŽÁDNÝ PEVNÝ PODÍL. TESTOVÁNÍ BYLO PROVÁDĚNO UVNITŘ 50L PILOTNÍHO BIOREKTORU S PLYNOVÝM VÝTAHEM A SACÍ TRUBKOU.



OBR. 6.58. TEORETICKÁ POVRCHOVÁ RYCHLOST KAPALINY (MM/S) PROTI EXPERIMENTÁLNÍ POVRCHOVÉ RYCHLOSTI KAPALINY (MM/S) PRO ČTYŘI TESTOVANÉ SYSTÉMY. TEORETICKÁ HODNOTA BYLA VYPOČTENÁ S POUŽITÍM VZTAHU, KTERÝ NAVRHLI KENNARD A JANEKAH (1991): $V_{SL} \propto V_{SG}^M$. LINEÁRNÍ KŘIVKA MĚLA SMĚRNICI 1 A PRŮSEČÍK $y = 0$.

Tabulka 6.1. Souhrn vypočtených korelací pro dobu míchání, rychlost cirkulace a povrchovou rychlost kapaliny pro čtyři testované systémy

	dobu míchání	rychlost cirkulace	povrchová rychlost kapaliny
voda/žádný pevný podíl	$t_m = 336.04 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 37.94 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 189.06 V_{SG}^{0.283}$
kvasinky LCC290	$t_m = 181.55 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 44.67 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 134.75 V_{SG}^{0.419}$
κ -karagenanový gel	$t_m = 254.68 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 41.73 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 171.92 V_{SG}^{0.283}$
kvasinky LCC3021	$t_m = 322.07 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 37.90 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 158.12 V_{SG}^{0.427}$

Pro povrchovou korelaci kapalin navrhli Kennard a Janekah (1991) exponent 0,41 v destilované vodě a 0,64, pokud roztok obsahoval karboxymethylcelulózu a ethanol. Systémy LCC290 a LCC3021 měly exponent 0,419, resp. 0,427, zatímco κ -karagenanový systém a systém voda/žádný pevný podíl měly exponent 0,283.

Základní předpoklad u technologie s plynovým výtahem a sací trubicou je, že systém je schopen poskytnout adekvátní míchání, tak, aby prvek tekutiny, opouštějící reaktor, byl dokonale promíchán. Při provozu 50l pilotních systémů jako kontinuálních fermentorů bylo do spodku reaktoru nastříkáváno čerstvé živné médium s průtokem 36 ml/min do celkového objemu reaktoru 50 l. To představuje přibližně 1000–násobné zředění složek suroviny. Při míchacích charakteristikách vypočtených pro systém s kvasinkami LCC290 je prvek tekutiny míchán v asi 3 smyčkách cirkulace v reaktoru, zatímco pro režim voda/žádný pevný podíl je třeba 10 smyček cirkulace v reaktoru. Doba zdržení (24 h) je navíc přibližně 1000krát větší než doba míchání (180 s). Rychlé míchání kombinované se zředěním živin v systému a velkým rozdílem mezi dobou míchání a dobou zdržení ukazuje na adekvátně míchaný systém. Původní premisa pro použití bioreaktoru s plynovým výtahem byla, že poskytuje ideálně míchané prostředí pro fermentaci piva. Výsledky míchacích studií, prováděných na všech třech fermentačních nosičích, tento předpoklad potvrzují.

6.5. Hodnocení několika imobilizačních metod kontinuální primární fermentace v systému s plynovým výtahem

Kontinuální fermentace byly prováděny v 50l pilotním bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou s použitím tří typů imobilizačních nosičů – κ -karagenanových gelových perliček, superflokulentních kvasinek LCC290 a středně flokulentních kvasinek LCC3021. Všechny fermentace byly na počátku naočkovány stejnou úrovní kvasinkového inokula (4 g/l) a jako živné médium byla použita průmyslová ležáková sladina. Fermentace byly zahájeny vsázkově, aby byla umožněna rychlá redukce cukrů ve sladině a aby byl podpořen růst kvasinek ve fermentoru. V případě flokulentních kvasinek tato vsázková fáze umožnila vytvoření vloček kvasinek, které pak mohly být v bioreaktoru zadrženy i po zahájení kontinuální fáze. Jakmile klesla úroveň diacetylu ve fermentační kapalině pod 30 $\mu\text{g/l}$, byl zahájen kontinuální přívod sladinu. Následující sekce podrobněji popisují fermentační analýzy, získané u těchto tří typů imobilizačních matic.

6.5.1. Použití κ -karagenanových gelových perliček: Zachycení

Použití κ -karagenanových gelových perliček jako imobilizační matrice napomohlo hodnocení použitelnosti technologie plynového výtahu pro kontinuální primární fermentaci piva (sekce 6.3). Bylo ještě nutno zhodnotit, zda může takový systém běžet delší dobu (až 2 měsíce) bez větších provozních potíží, jako je nestabilita fermentace a kontaminace. Provozní parametry tohoto fermentačního pokusu jsou znázorněny na obr. 6.59. Povrchová rychlost plynu oxidu uhličitého byla

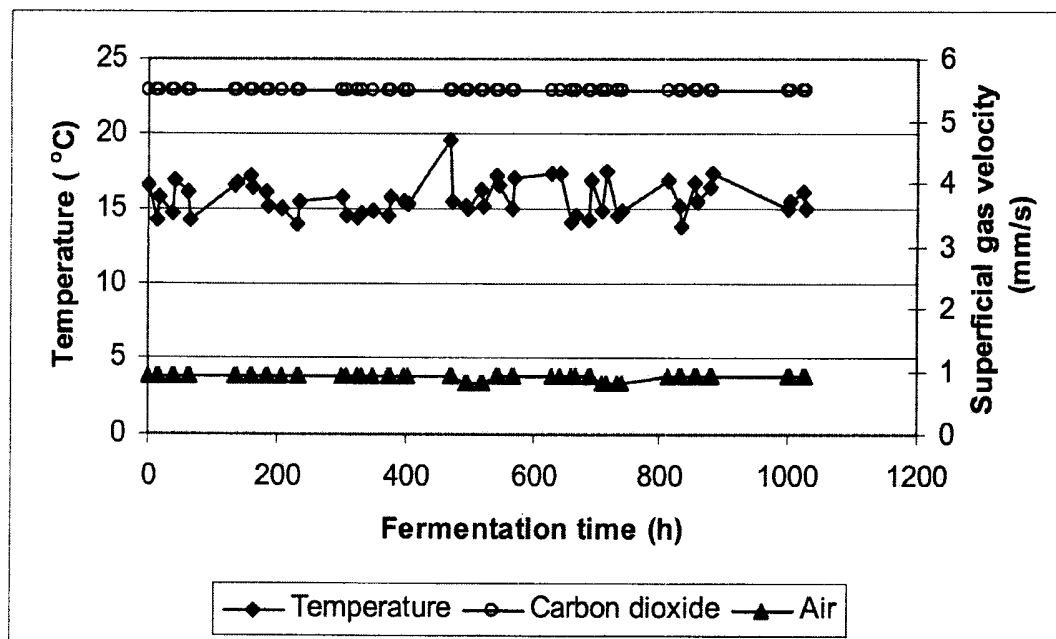
nastavena na 5,5 mm/s a v tomto probublávacím plynu bylo do reaktoru přiváděno 0,9 mm/s vzduchu. Rychlost oxygenace byla proto nastavena na 3 % celkového probublávacího plynu, v souladu s výsledky v sekci 6.3, které naznačují, že přednostní pivo je produkováno, jestliže se do systému přivádí 2 až 5 % kyslíku. Teplota fermentace byla regulována na 15 °C. Mezi daty lze pozorovat určitou fluktuaci, která se vztahuje k charakteru kontrolní smyčky, která byla použita.

Obr. 6.60 představuje vývoj volné populace kvasinek v čase a životnost kvasinek. Životnost zůstávala během celé 2měsíční fermentace relativně vysoká s dočasným poklesem naměřeným kolem 200 hodin. To odpovídá bodu těsně před zahájením kontinuálního přívodu sladiny. Při vsázkové fermentaci je obvyklé, že životnost na konci fermentace klesá, protože kvasinky mají nedostatek živin. Jakmile byl zahájen kontinuální přívod sladiny, životnost opět stoupla nad 90 %. Populace volných kvasinek byla během prvních 400 hodin fermentace nízká a pak, v průběhu dalších 300 hodin, stoupla asi desetkrát z cca 100 milionů buněk na ml na cca 1,5 miliardy buněk na ml. Jakmile byla na této maximální koncentraci, uchovávala si populace volných kvasinek tuto hodnotu pseudo–ustáleného stavu po zbytek doby fermentace.

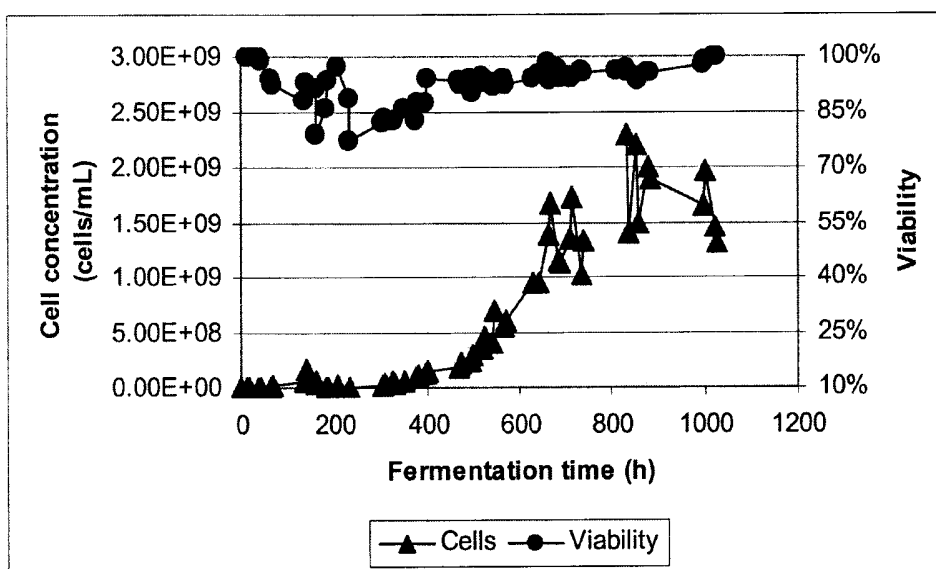
Náhly vrůst koncentrace volných kvasinek je pravděpodobně spojen s populací imobilizovaných kvasinek. Na začátku fermentace kvasinky zachycené v gelu rostou uvnitř gelu, dokud nespoutávají veškerý volný prostor. Jakmile jsou gelové perličky kvasinkami vyplněny, přetéká expandující populace do kapalného média. Naše výsledky se zdají naznačovat, že během prvních 400 hodin rostly imobilizované kvasinky v gelu a po cca 700 hodinách už neměly pro růst v perličkách místo, a proto začaly uvolňovat větší množství kvasinek do fermentačního média.

Tato nestabilita populace kvasinek se odráží v profilech ethanolu a specifické hmotnosti (obr. 6.61). Během počátečních 200 hodin fermentace se očekávalo v souladu s tradiční vsázkovou kinetikou, že ethanol bude s časem růst a specifická hmotnost bude klesat. Mezi 200 a 600 hodinami dosáhl ethanol plata 45 g/l a specifická hmotnost zůstala na cca 6 °P. Tento výsledek nebyl očekáván, protože kapalina na konci fermentace by měla mít specifickou hmotnost cca 2,5 až 2,7 °P. Po asi 600 hodinách, když populace volných kvasinek právě zhruba dosáhla svého maxima, stoupla hladina ethanolu na asi 70 g/l a specifická hmotnost sladiny poklesla na asi 2,2 °P. Bližší pohled na konkrétní profily uhlohydrátů v čase (obr. 6.62) ukazuje, že koncentrace maltózy se ustálila až po přibližně 600 hodinách procesu. Ostatní cukry se snížily podle očekávání.

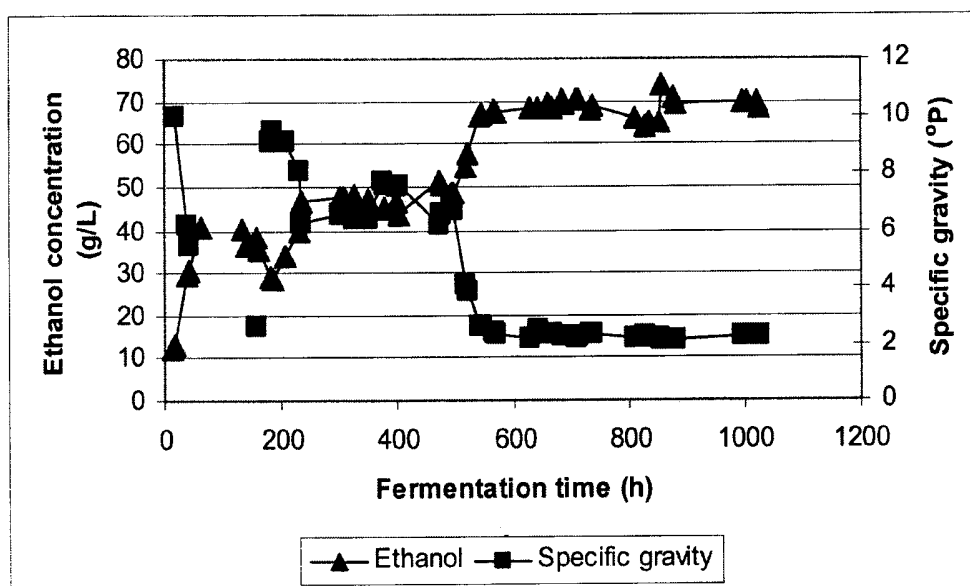
Dva další klíčové analyty – diacetyl a 2,3–pentandion – byly monitorovány po celou dobu 2–měsíčního kontinuálního provozu (obr. 6.63). Nízké body po přibližně 180 hodinách odpovídající konci vsázkové zahajovací fáze. Jakmile byl zahájen kontinuální přívod, diacetyl i 2,3–pentandion rychle stouply na asi 500 µg/l, resp. 400 µg/l. Tento počáteční vzrůst byl očekáván, protože dodávka čerstvého živného prostředí by měla stimulovat růst kvasinek, a tudíž zvýšit hladinu přebytečných metabolitů, poskytujících diacetyl a 2,3–pentandion. Během celého fermentačního pokusu zůstala hladina 2,3–pentandionu nad 400 µg/l, zatímco koncentrace diacetylu v polovině kontinuálního běhu fermentace klesla z 500 µg/l na 275 µg/l. Tento okamžik se shodoval i s poklesem hladiny diacetylu pod hladinu 2,3–pentandionu, který byl pozorován při hodnocení proveditelnosti, popsaném v sekci 6.3.



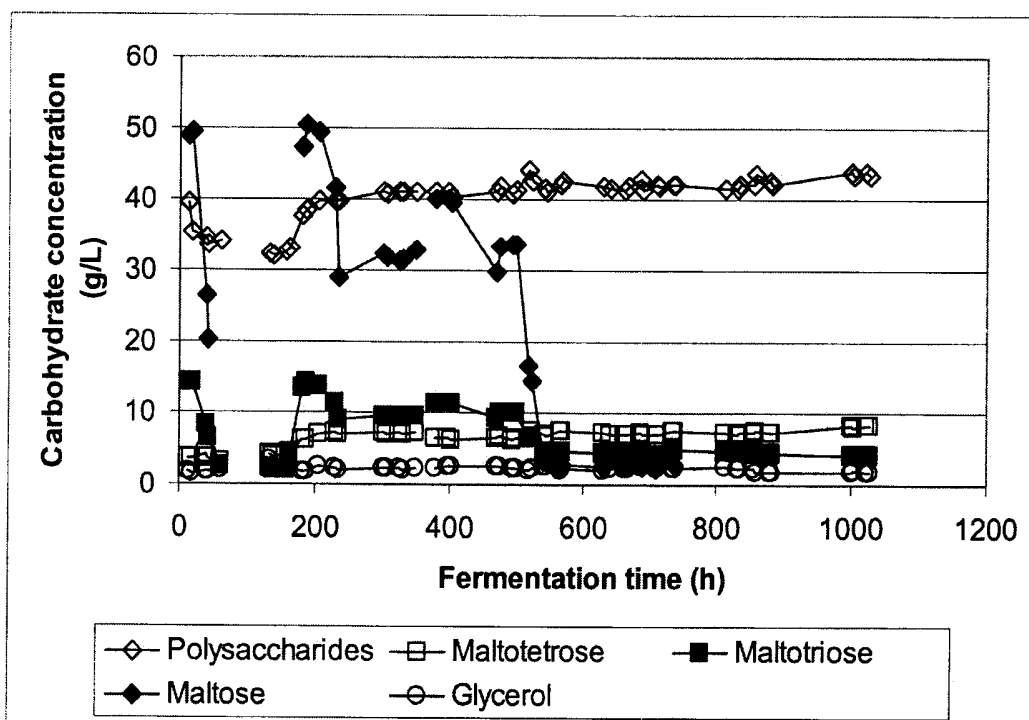
OBR 6.59. PROVOZNÍ PARAMETRY PRO FERMENTACI S KARAGENANOVOU IMOBILIZACÍ V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



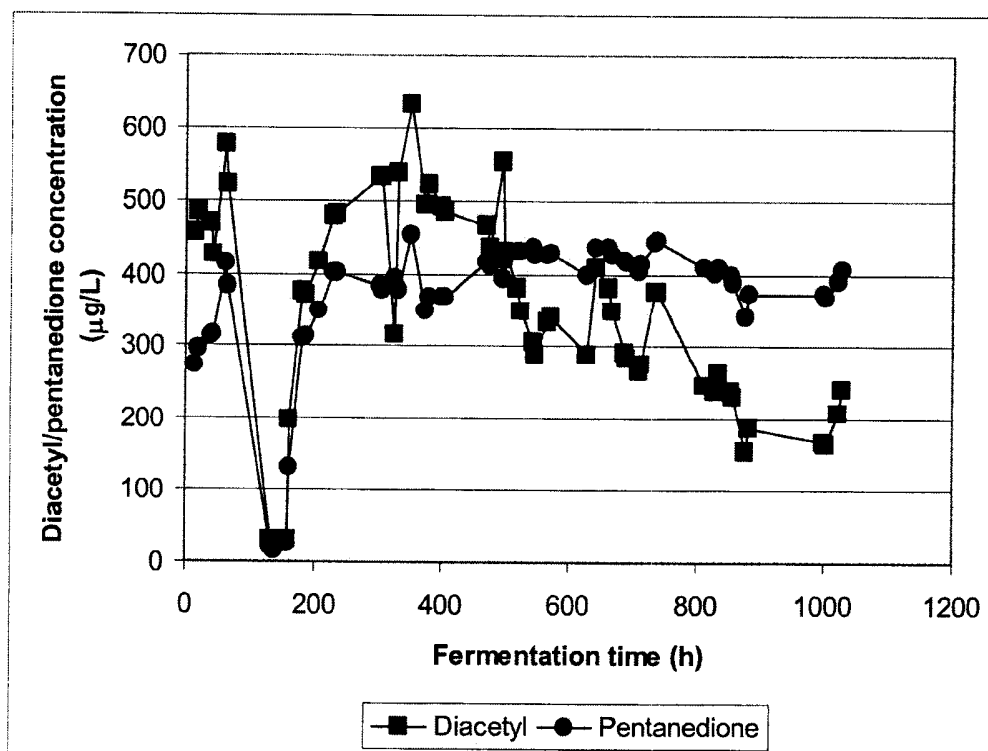
OBR. 6.60. CELKOVÁ KONCENTRACE A ŽIVOTNOST KVASINEK IMOBILIZOVANÝCH NA K-KARAGENANU V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.61. KONCENTRACE ETHANOLU A SPECIFICKÁ HMOTNOST PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KARAGENANEM IMOBILIZOVANÝMI KVASINKAMI V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.62. PROFIL UHLOHYDRÁTŮ PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KARAGENANEM IMOBILIZOVANÝMI KVASINKAMI V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



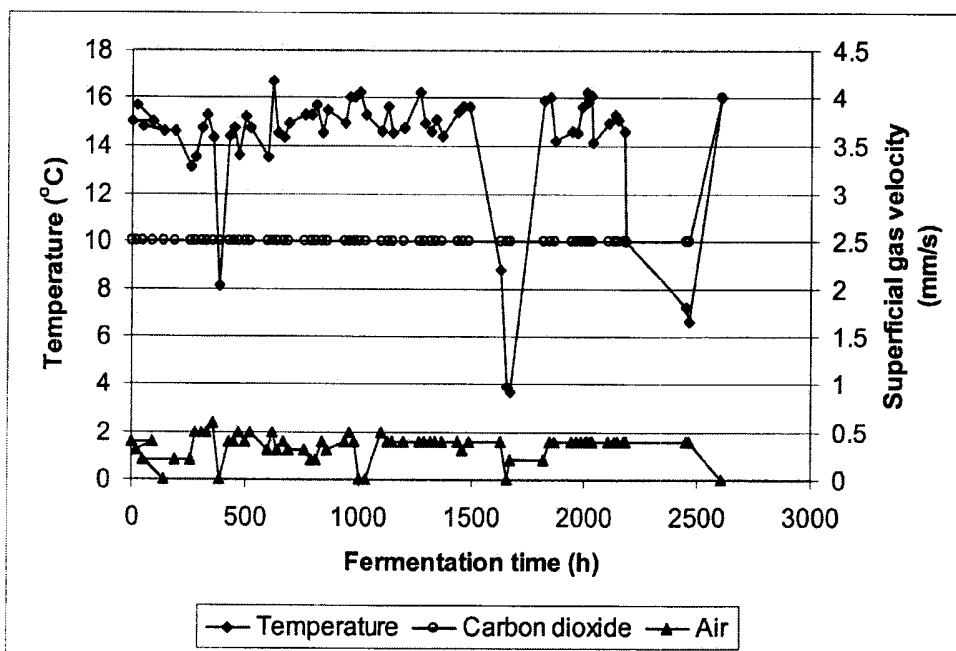
OBR. 6.63. KONCENTRACE VICINÁLNÍCH DIKETONŮ PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KARAGENANEM IMOBILIZOVANÝMI KVASINKAMI V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.

6.5.2. Použití superflokulentního kmene kvasinek: Autoflokulace

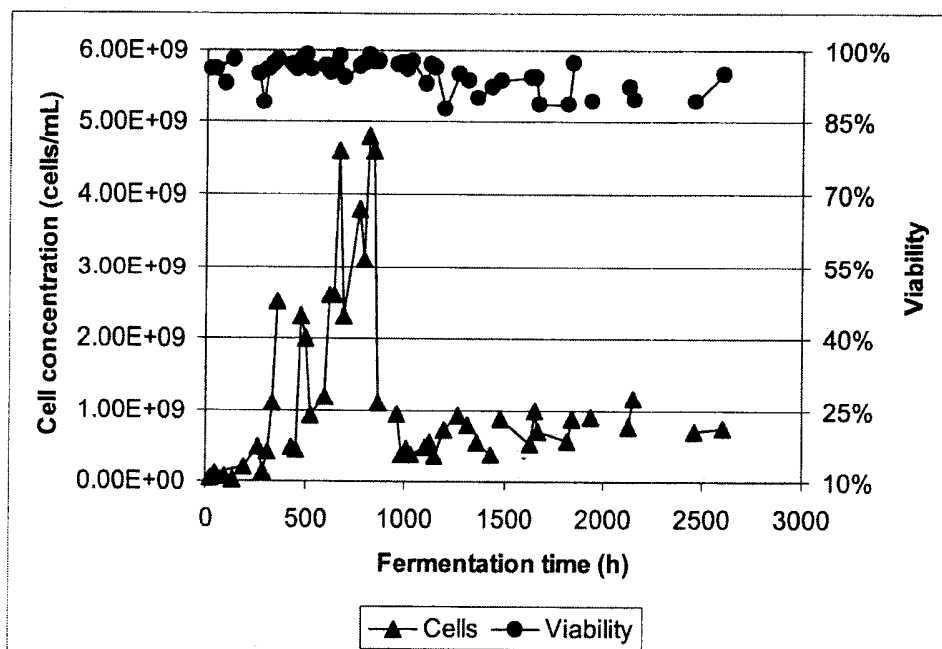
- Byly prováděny kontinuální fermentace s použitím poloprovozního 50l bioreaktoru s plynovým výtahem, plněného superflokulentními kvasinkami LCC290, po dobu 3 měsíců. Probublávací plyn CO₂ byl nastaven na cca 2,5 mm/s a vzduch byl přiváděn v množství cca 0,4 mm/s, aby byl podpořen určitý růst kvasinek (odpovídá to celkem 1,51 l/min přiváděného plynu, jehož 3 % tvoří kyslík). Během celého pokusu byla fermentační teplota v reaktoru udržována na cca 15 °C. Přerušování dodávky proudu nás přinutilo snížit teplotu fermentoru po dobu tří dní (1700 h fermentace) na 4 °C (obr. 6.64). Toto ochlazení reaktoru bylo provedeno za účelem zpomalení metabolismu kvasinek a uchování jejich životnosti během přerušování dodávky proudu. Tato neočekávaná událost poskytla příležitost zjistit odolnost systému vůči příhodám, které mohou být v průmyslových situacích obvyklé. Jakmile byla dodávka elektřiny obnovena, byla teplota reaktoru znovu upravena na 15 °C a fermentace pokračovala dalších 30 dní.
- Po dokončení náběhové fáze (cca 180 h), byla do systému kontinuálně přiváděna sladina s průtokem 2,16 l/h, takže doba zdržení při pracovním objemu reaktoru 50 l byla 24 h. Po počáteční fázi vsázky se koncentrace kvasinek zvýšila a dosáhla po asi 750 h fermentace 3 miliard buněk/ml (obr. 6.65). Tato hmota kvasinek pak po asi 1000 h poklesla na přibližně 1 miliardu buněk/ml a na této hladině zůstala až do skončení fermentace. Životnost kvasinek byla po celou dobu fermentace nad 90 % (obr. 6.65).

- Koncentrace ethanolu a specifická hmotnost fermentačního média dosáhly pseudoustáleného stavu krátce po zahájení kontinuální dodávky (obr. 6.66). Koncentrace ethanolu stoupla na přibližně 70 g/l a specifická hmotnost kapaliny byla po zbytek fermentace cca 2,3 °P. Profily uhlohydrátů na obr. 6.67 potvrzují tento pseudo–ustálený stav po přibližně 270 h kontinuální fermentace. Koncentrace polysacharidů klesla po asi 1400 h fermentace z cca 42 g/l na cca 33 g/l. Tento jev byl důsledkem proměnlivosti šarží sladin. Protože ležákové kvasinky nejsou schopny tyto polysacharidy konzumovat, neměla tato anomálie živin sladin výrazný vliv na výkon primární fermentační nádoby. Tento rozdíl v nefermentovaném cukerném podílu by poznal zkušený degustátor, který by si povšiml, že produkt má „řidkou“ konzistenci.

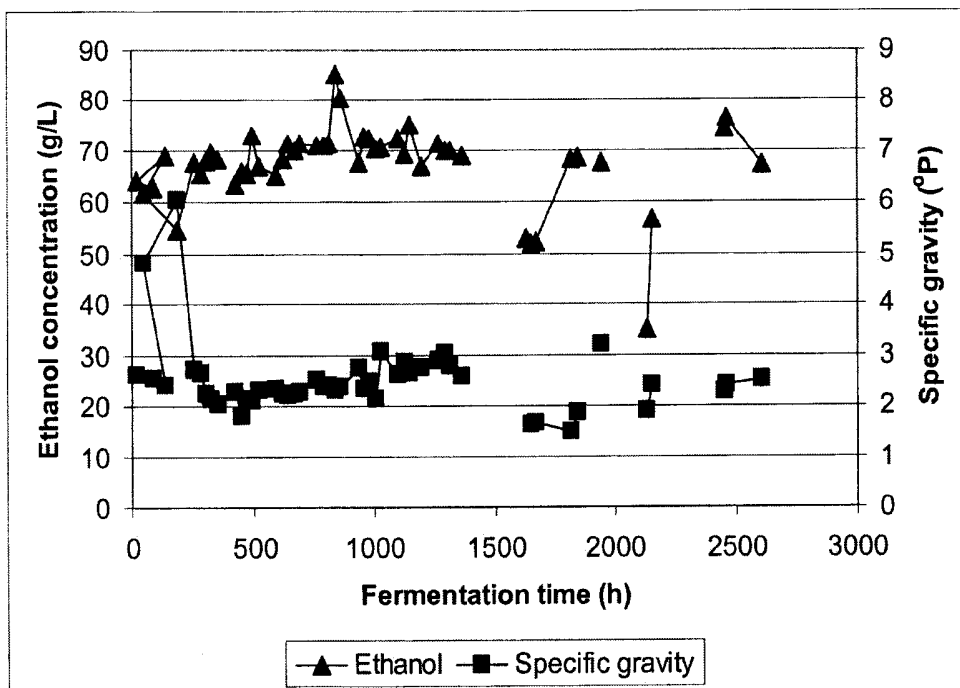
- Koncentrace diacetylu a 2,3–pentandionu v průběhu času jsou znázorněny na obr. 6.68. Jako při κ–karagenanových kontinuálních fermentacích, hladiny diacetylu a 2,3–pentandionu stouply, jakmile byl zahájen kontinuální přívod sladin. Diacetyl dosáhl přibližně 375 µg/l, zatímco koncentrace 2,3–pentandionu byla přibližně 600 µg/l. Tyto hladiny koncentrace se udržely po celou dobu fermentace až do přerušování dodávky proudu po cca 1700 h. Protože kapalina zůstala ve vsázce 3 dny bez metabolismu kvasinek (vlivem přerušování dodávky živin), snížily se hladiny vicinálních diketonů. Jakmile byl přívod sladin obnoven, vrátily se diacetyl a 2,3–pentandion na své hodnoty pseudo–ustáleného stavu.



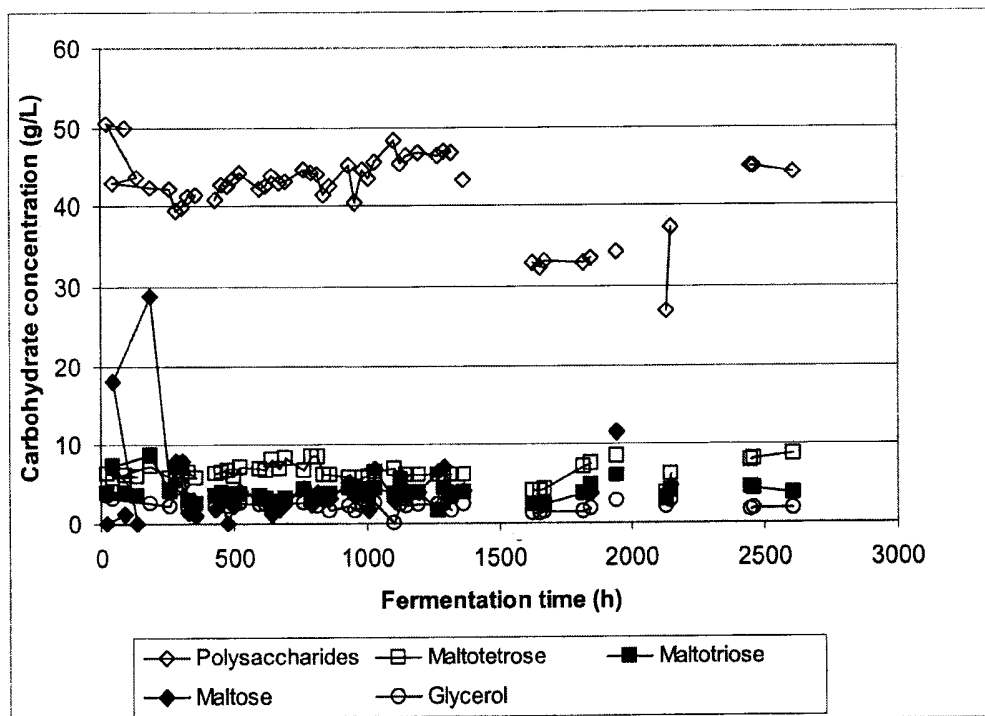
OBR. 6.64. PRACOVNÍ PARAMETRY FERMENTACE S LCC290 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



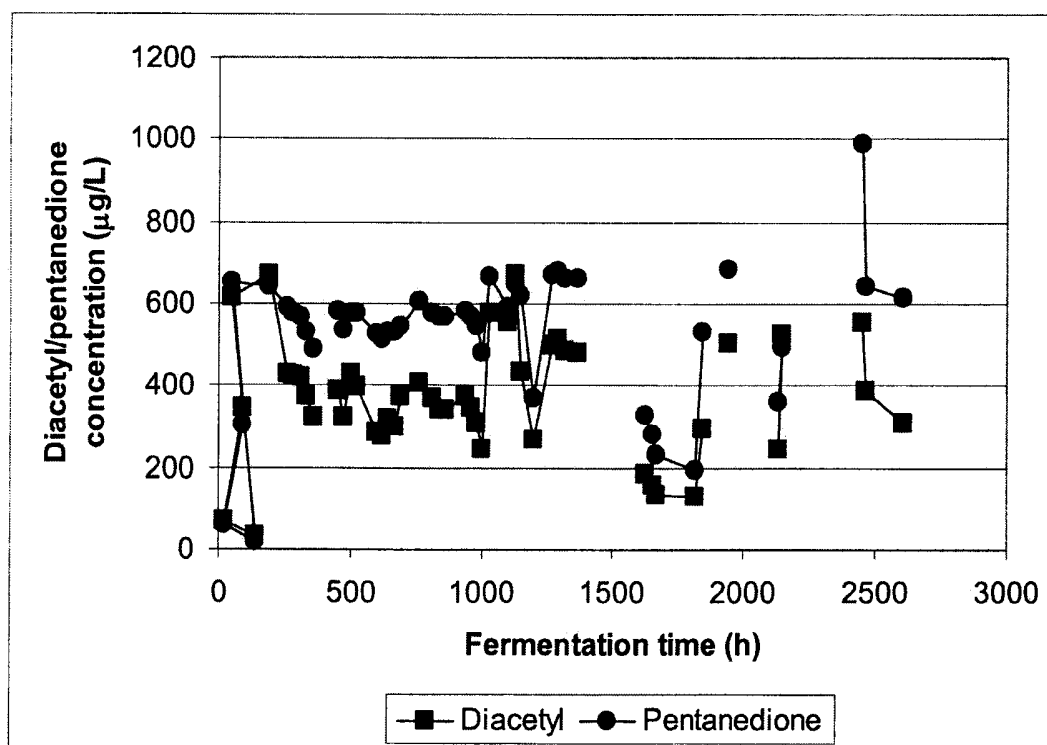
OBR. 6.65. CELKOVÁ KONCENTRACE A ŽIVOTNOST KVASINEK LCC290 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.66. KONCENTRACE ETHANOLU A SPECIFICKÁ HMOTNOST KVASINEK LCC290 PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.67. PROFIL UHLOHYDRÁTŮ PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OB. 6.68. KONCENTRACE VICINÁLNÍCH DIKETONŮ PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.

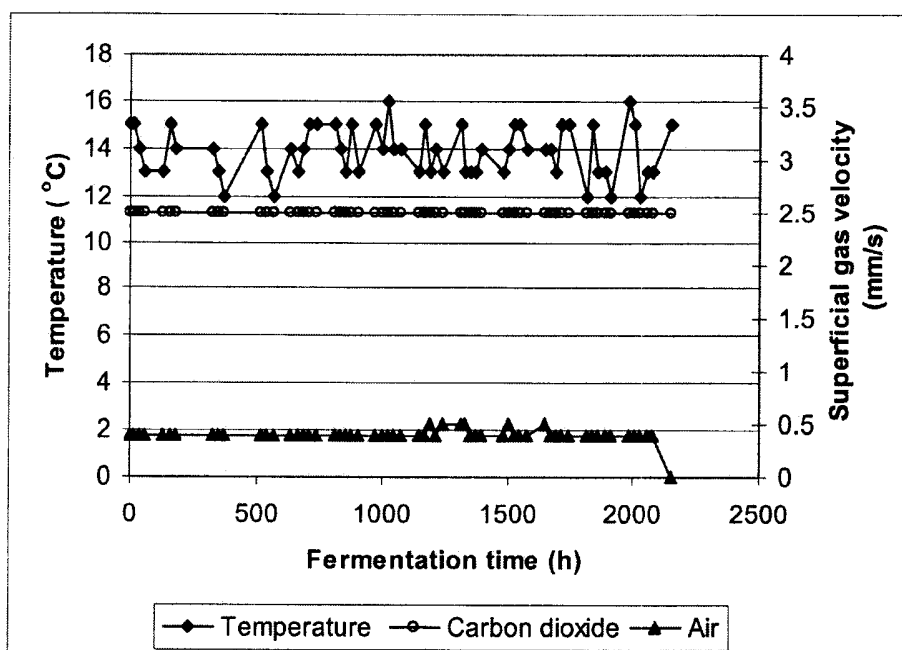
6.5.3. Použití středně flokulentních kvasinek: Autoflokulace

- 5 Bylo provedeno několik fermentačních pokusů s použitím středně flokulentního kmene kvasinek LLC3021 jako imobilizační matrice v poloprovozním 50l bioreaktoru s plynovým výtahem. Stejně jako u obou předchozích způsobů imobilizace byla počáteční koncentrace kvasinek nastavena na 4 g/l. Těmito kvasinkami byla zakvašena sladina průmyslového ležáku (popsáno v sekci 4.2) a ponechána fermentovat ve vsázce, dokud nebyly zkonsumovány všechny zkvasitelné cukry a
- 10 úroveň diacetylu neklesla pod 30 µg/l. Fermentační teplota byla udržována na 15 °C a průtok probublávacího plynu byl udržován na stejné hodnotě jako u kvasinek LCC290 (povrchová plyná rychlost oxidu uhličitého cca 2,5 mm/s cca 0,4 mm/s vzduchu, tedy přibližně 3 % kyslíku v celkovém plynu) (obr. 6.69).
- 15 Tento počáteční vsázkový stupeň umožnil flokulaci kvasinek, které tak byly snadněji zadržovány systémem plynového výtahu. Na konci vsázkového náběhu byla rychlost přívodu sladiny nastavena na 2,16 l/h, což odpovídá době zdržení cca 24 h, vztaženo na pracovní objem reaktoru 50 l. Populace kvasinek (obr. 6.70) vzrostla na asi 1 miliardu buněk/ml a na této úrovni zůstala právě přes 1000 h (mezi 500 a 1500 h běhu kontinuální fermentace). Po cca 1500 h fermentace se popu-
- 20 lace kvasinek náhle zdvojnásobila a pak se ustálila na 2 miliardách buněk/ml. Tato změna populace kvasinek byla neočekávaná. Životnost kvasinek se po celou dobu fermentace udržovala nad 90 % (obr. 6.70).

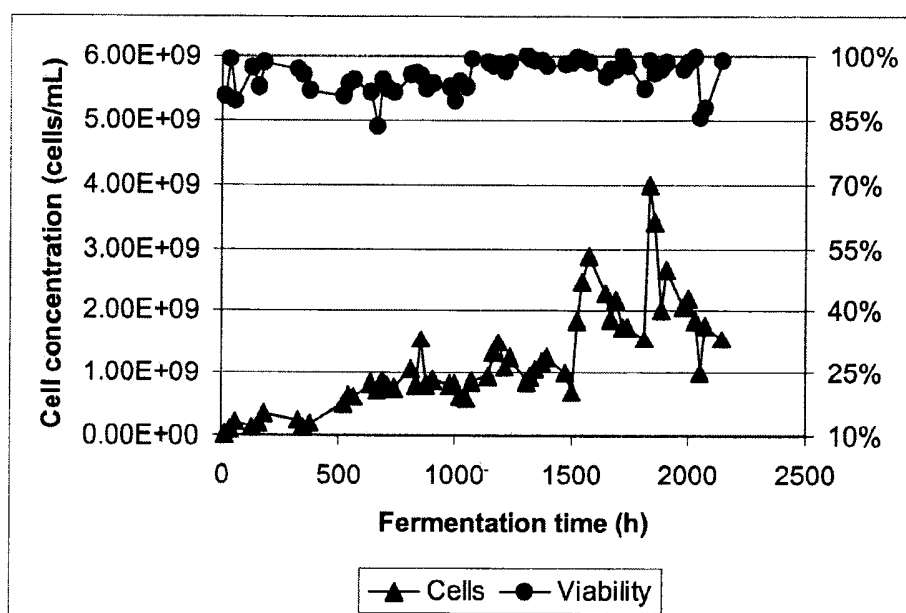
- 25 Obr. 6.71 uvádí údaje o koncentraci ethanolu a specifické hmotnosti fermentačního média během 3měsíčního kontinuálního pokusu. Krátce po vsázkovém náběhu (180 h) se koncentrace ethanolu ustálila na 70 g/l a specifická hmotnost dosáhla minima cca 2.2 °P. Výše diskutované náhlé zvýšení populace kvasinek se neodrazilo v poklesu koncentrace ethanolu. Nejlogičtější vysvětlení pro tento vzrůst populace kvasinek je, že větší část celkové populace kvasinek vstoupila do růstové fáze a tak došlo k tomuto zdvojnásobení koncentrace kvasinek. Současně se vzrůstem kon-

centrace kvasinek by se očekával pokles koncentrace ethanolu; to však jasně nebyl tento případ, protože ethanol zůstal během celého kontinuálního běhu na své hodnotě pseudo–ustáleného stavu 70 g/l. Závislost profilů koncentrace uhlohydrátů na době fermentace (obr. 6.72) odhalila stejný závěr jako křivky ethanolu a specifické hmotnosti. Tento běh dosáhl pseudo–ustáleného stavu
5 přibližně po 250 h kontinuální fermentace.

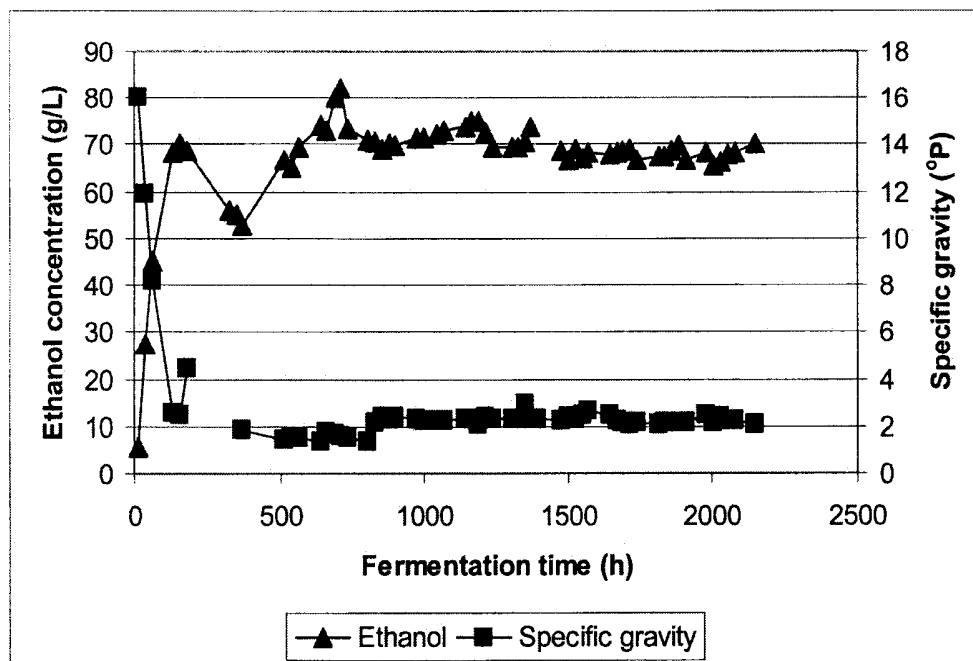
Obr. 6.73 poskytuje křivky koncentrací diacetylu a 2,3–pentandionu v závislosti na době kontinuální fermentace. Stejně jako výsledky vicinálních ketonů u κ –karagenanového gelu a kvasinek LCC290, koncentrace diacetylu a 2,3–pentandionu po vsázkové náběhové fázi stoupala a dosáhla
10 hodnot pseudo–ustáleného stavu cca 225 $\mu\text{g/l}$, resp. 400 $\mu\text{g/l}$.



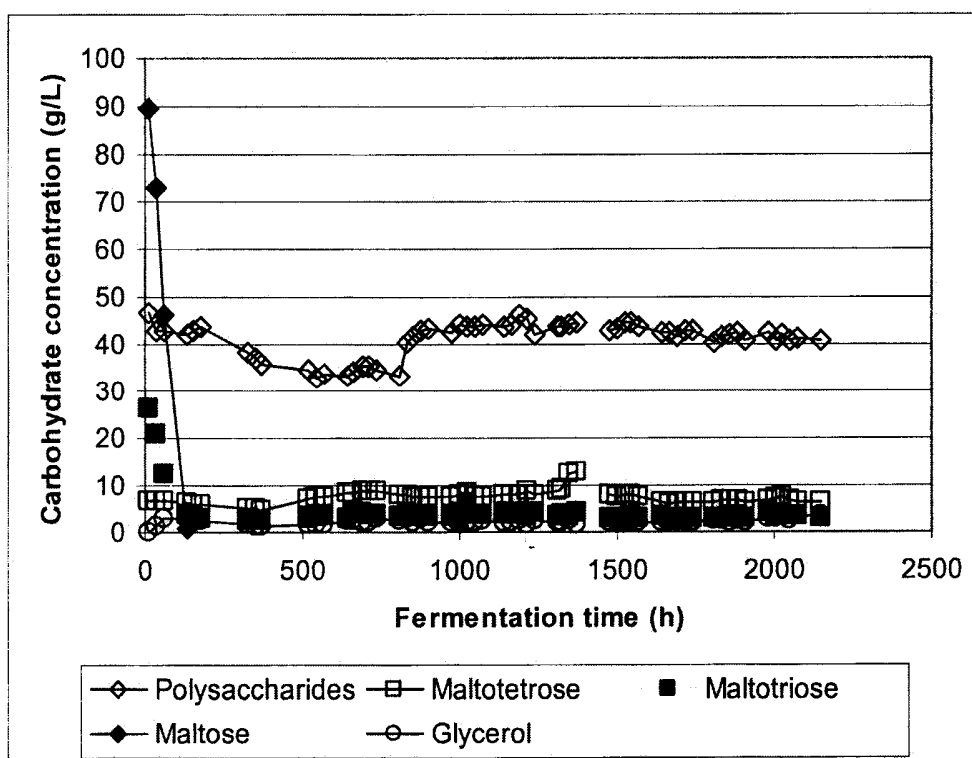
OBR. 6.69. PROVOZNÍ PARAMETRY PRO FERMENTACI LCC3021 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



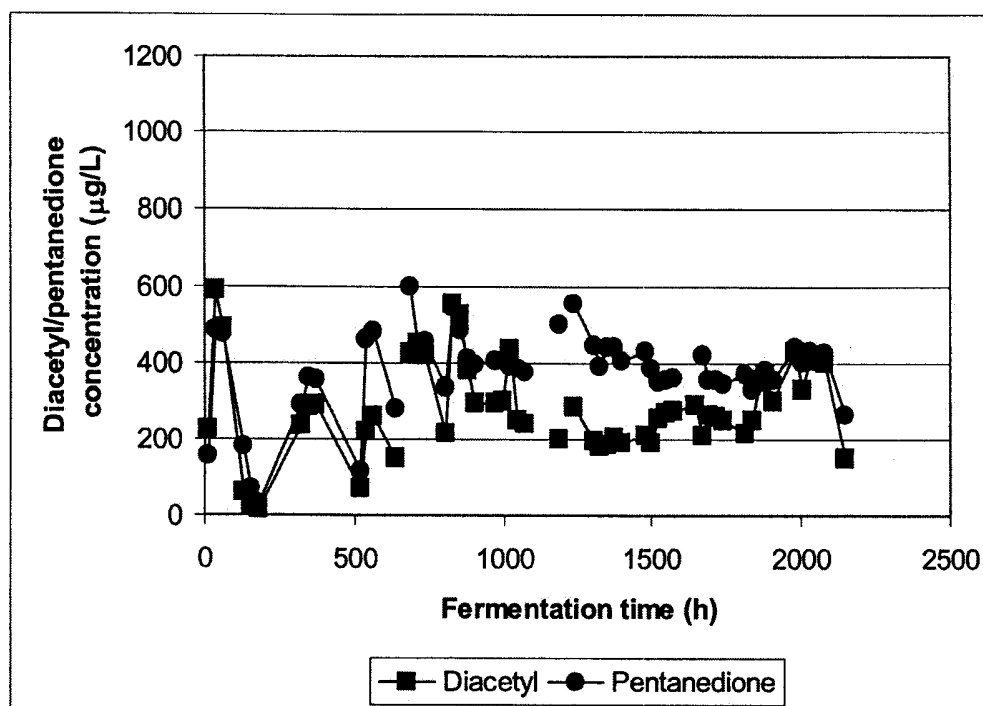
OBR. 6.70. CELKOVÁ KONCENTRACE A ŽIVOTNOST KVASINEK LCC3021 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.71. KONCENTRACE ETHANOLU A SPECIFICKÁ HMOTNOST PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI KVASINEK LCC3021 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.72. PROFIL UHLOHYDRÁTŮ PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC3021 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.



OBR. 6.73. KONCENTRACE VICINÁLNÍCH DIKETONŮ PŘI KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC3021 V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ FERMENTACE.

6.5.4 Porovnání různých nosičů

- 5 V sekcích 6.5.1 až 6.5.3 byly popsány výsledky fermentace s κ -karagenanovými gelovými perličkami, superflokulentními kvasinkami LCC290 a středně flokulentními kvasinkami LCC3021 jako imobilizačními matricemi. Všechny tři nosiče se považovaly za vhodné pro primární kontinuální fermentaci v poloprovozním 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou. Ve všech třech případech bylo dosaženo doby zdržení kapaliny 24 h. Fermentační běhy s použitím
 10 superflokulentních kvasinek LCC290 dosáhly pseudo-ustáleného stavu mnohem rychleji než systémy se středně flokulentními kvasinkami LCC3021 a imobilizované systémy s κ -karagenanem. Fermentace LCC290 dosáhla své maximální koncentrace ethanolu 70 g/l po asi 250 h běhu. Běh LCC3021 dosáhl své koncentrace ethanolu v ustáleném stavu 70 g/l po cca 600 h. Během kontinuální fermentace s κ -karagenanem se ethanol v průběhu pokusu ustálil na dvou různých bodech. Ethanol nejprve mezi 200 a 500 h dosáhl 45 g/l a pak asi po 575 h stoupl na 70 g/l a na této koncentraci zůstal do skončení pokusu.

Zdalo se, že všechny tři fermentační systémy dosáhly maximální koncentrace volných kvasinek cca 1 miliarda buněk/ml. Nekonzistence koncentrace kvasinek měla negativní dopad na produktivitu ethanolu v κ -karagenanovém systému (nižší počáteční koncentrace ethanolu v pseudo-ustáleném stavu v porovnání se systémem s kvasinkami LCC290). Koncentrace kvasinek dosahovala maxima v každém systému v různých časových intervalech. Pro běh LCC290 dosáhl ethanol maxima mezi 500 a 1000 h kontinuální fermentace, zatímco fermentace LCC3021 měla maximální počet buněk mezi 1500 a 2000 h kontinuálního běhu. Imobilizované systémy s κ -karagenanem dosáhly maximální koncentrace buněk mezi 700 a 1000 h kontinuálního provozu.

Koncentrace pseudo-ustáleného stavu pro diacetyl a 2,3-pentandion byly v těchto třech typech fermentace s imobilizovanými kvasinkami – superflokulentní kvasinky LCC290, středně flokulentní kvasinky LCC3021 a kvasinky imobilizované na κ -karagenanu – rozdílné. Pro fermentaci LCC290 se diacetyl ustálil na 375 µg/l, zatímco při fermentaci LCC3021 se ustálil na asi

225 µg/l. V případě fermentace s κ-karagenanem dosáhla koncentrace diacetylu 500 µg/l a uprostřed kontinuálního běhu jeho úroveň postupně klesala v časovém rámci 500 h na asi 200 µg/l. Koncentrace 2,3-pentandionu ve všech třech pokusech odrážela koncentraci diacetylu, přičemž při fermentacích s LCC290 a LCC3021 byla po celou dobu fermentace koncentrace 2,3-pentandionu vyšší než diacetylu. Běh s κ-karagenanem vykazoval odlišné schéma, kdy při prvním pseudo-ustáleném stavu byly úroveň diacetylu vyšší než 2,3-pentandionu, načež koncentrace diacetylu poklesla pod koncentraci 2,3-pentandionu. Z údajů o koncentraci kvasinek a produkci ethanolu také vyplývá, že během fermentace s κ-karagenanem bylo dosaženo dvou různých a jedinečných pseudo-ustálených stavů.

Úkol porovnat různé fermentační systémy a zhodnotit, který se chová lépe, se může stát složitějším, jestliže je podstata systému založena na více než jednom kritériu. Například pokud by mírou úspěchu byla pouze celková produktivita ethanolu, byly by všechny tři testované systémy hodnoceny jako stejně dobré, protože ve všech případech bylo dosaženo 70 g/l ethanolu na objem reaktoru 50 l při době zdržení 24 h.

Výroba prodejného piva vyžaduje více než pouhou produkci ethanolu. Navržený fermentační systém je nutno hodnotit z hlediska schopnosti produkovat přijatelné pivo (produktivita ethanolu a hladina diacetylu mezi dalšími hledisky), potenciálních dalších nákladů na nosič, dostupnosti nosiče, snadnosti ovládání systému, ekologických otázek, jako je nakládání s odpadním nosičem, stability nosiče, stejně jako flexibility poskytované nosičovým systémem. Pro hodnocení takového víceprvkového scénáře se v obchodním světě používá postup bezrozměrné analýzy nazývaný „Balanced Scorecard“ (Kaplan a Norton, 1996). První stupeň spočívá v identifikaci kritérií, podle nichž musí být systém hodnocen. Každému kritériu je přisouzena hodnotící stupnice od 1 do 5, přičemž 1 je nejméně příznivé a 5 nejpříznivější hodnocení. Po skončení analýzy se sečtou jednotlivá hodnocení a alternativa s nejlepším výsledkem představuje nejlepší výběr za daných okolností.

Tabulka 6.2 představuje výsledky analýzy Balanced Scorecard, provedené pro imobilizační nosiče, které byly považovány za potenciální alternativy pro použití v poloprovozním 50l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou pro fermentaci. Bylo hodnoceno celkem 6 nosičů – chitosanové perličky Chitopearl®, křemelinové perličky Celite®, skleněné perličky Siran®, κ-karagenanové gelové perličky, středně flokulentní kvasinky LCC3021 a superflokulentní kvasinky LCC290 – s primárním úkolem získat prodejné pivo. Každý systém byl hodnocen pomocí výše popsané stupnice. Celkově byly nejlépe hodnoceny superflokulentní kvasinky LCC290, které byly těsně následovány středně flokulentními kvasinkami LCC3021. Ostatní čtyři nosiče obdržely hodnocení mezi 16 a 20. Třetí preference byla dána κ-karagenanovému systému, protože v pilotní jednotce byla produkována prodejná kapalina.

Z tohoto hodnocení nosičů jasně vyplývá, že budoucí vývoj kontinuálních fermentačních systémů by měl být zaměřen na autoagregaci jako na způsob imobilizace. Dostupnost (snadno dostupné), cena (nízké náklady, protože není třeba zavádět další zařízení), snadnost ovládání (hodí se po provozu současných zařízení) této alternativy převáží potenciální nestabilitu vloček kvasinek v míchaném systému. Pro kontrolu velikosti vloček během fermentačního procesu je možno používat citlivost autoagregátu ke smyku, a případně dosáhnout většího přenosu hmoty, a tím dosáhnout dalšího zvýšení objemové produktivity bioreaktoru.

Tabulka 6.2. Porovnání několika imobilizačních nosičů pro primární fermentaci piva v systému bioreaktoru s plynovým výtahem

	Chitopearl®	Celite®	Siran®	Karagenan	LCC3021	LCC290
Dobré pivo	3	1	1	4	5	4
Cena	2	3	1	3	5	5
Dostupnost	1	5	5	2	5	5
Snadnost provozu	3	1	1	3	4	5
Zacházení s odpadem/ekologie	4	3	4	2	3	3
Stabilita	4	1	1	3	2	3
Flexibilita	3	3	3	1	2	5
Celkem	20	17	16	18	26	30

5

6.6. Výroba ležákového piva severoamerického typu s použitím technologie s plynovým výtahem a sací trubicou

10 Výroba čistě chutnajícího ležákového piva severoamerického typu (NA) klade na pivovárníka mnoho výzev. Ležáky typu NA jsou charakterizovány světlou barvou a chuťovým profilem s nízkou hořkostí, nízkými zbytkovými cukry (řídke), žádnou dominantní příchutí a tudíž relativně žádnou pachutí. Kvůli těmto vlastnostem může pivovárník zamaskovat jen velmi málo chuťových defektů. Nejběžnějšími problémy s příchutí, ničícími dnešní pivovarníky, jsou vysoká hladina diacetylu (máslová), acetaldehydu (zelené jablko) a rovněž sirné pachutě (spálená guma, tchoř, shnilá vejce, vařivá příchut' zeleniny). Přestože může být příčinou těchto pachutí piva také kontaminace bakteriemi, častěji vede k vyšším než očekávaným hladinám pachutí nesprávné řízení fermentačního procesu.

20 Po celou dobu pokusů s kontinuální fermentací, prováděných jako součást této práce, byla úroveň kontaminace jak ve sladince, tak ve fermentačních nádobách kontrolována pečlivým prováděním aseptických metod. Fermentační pokusy se všemi třemi typy nosiče, které trvaly několik měsíců, nevykázaly detekovatelnou úroveň kontaminace (monitorováno metodami popsány v kapitole 4). Produkty primární kontinuální fermentace byly postiženy vyššími než žádoucími hladinami diacetylu (cíl méně než 30 µg/l) a acetaldehydu (cíl méně než 10 mg/l), ale ty nebyly důsledkem bakteriální infekce. Tato zjištění se neliší od dat uvedených v literatuře (Pajunen et al., 2000; Kronlof et al., 2000). Jeden belgický pivovar udělal z vysoké hladiny acetaldehydu v pivě z procesu kontinuální fermentace prodejní přednost a nabízel svůj produkt jako pivo chutnající po jablkách (Andries et al., 1996b).

30

Vysoké hladiny diacetylu po primární fermentaci jsou v pivovarnickém průmyslu rovněž běžné. Někteří pivovárníci zavedli, za účelem napomoci snížení diacetylu, po dokončení primární fermentace praxi nazývanou „volný vzestup teploty“. Jiní zvolili prostě delší prodlevu produktu během zrání, aby dosáhli snížení vicinálních diketonů (diacetyl a 2,3-pentandion) na požadovanou úroveň. V jiném přístupu vyvinulo několik výzkumných skupin pro vypořádání se s vysokou hladinou diacetylu technologii rychlého zrání, diskutovanou v kapitole 2. I když je tento přístup velmi efektivní, přidává celkovému procesu vaření piva další úroveň složitosti, kterou mohou někteří shledat obtížně akceptovatelnou.

35

Ekonomika procesu rychlého zrání je zcela jasná, avšak v těchto počátcích kontinuálního zpracování v pivovarnickém průmyslu může být účelné minimalizovat technologickou složitost, aby se usnadnil přechod od tradiční vsázkové fermentace ke kontinuální produkci. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto zkoumat použití vsázkové prodlevy po primární kontinuální fermentaci v 50l pilotních systémech s plynovým výtahem pro omezení vysoké hladiny diacetylu v hotovém pivě. Tento další zpracovatelský stupeň se při zahájení tohoto Ph.D. programu nepředpokládal, ale zavedení takového opatření bylo nutné pro srovnání piv produkovaných kontinuálně s pivy se vsázkovou kontrolou.

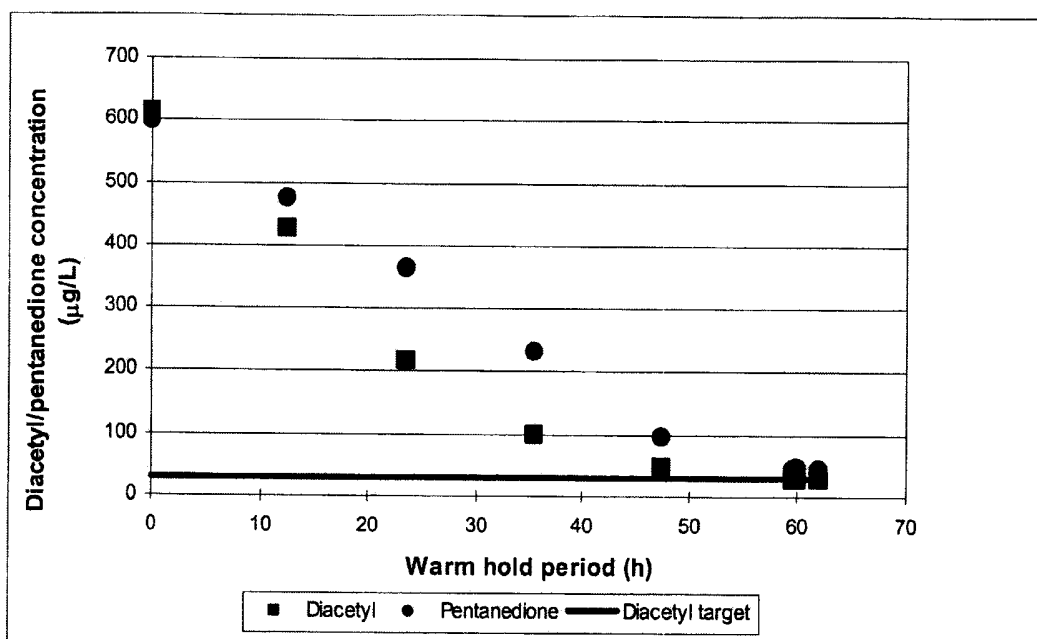
6.6.1. Použití vsázkové prodlevy po primární kontinuální fermentaci

Kritickým parametrem při stanovení dokončení primární fermentace je hladina diacetylu v konečné fermentované kapalině. Konverze prekursoru diacetylu, α -acetolaktátu, na diacetyl je rychlost limitujícím krokem v dráze vzniku diacetylu (obr. 3.5). Tato první reakce je povahou chemická a je silně závislá na teplotě. Jestliže „mladé“ pivo podstoupí proces zrání za studena dříve, než došlo k chemické konverzi α -acetolaktátu na diacetyl, může mít výsledné pivo hladinu diacetyl nad chuťovým prahem 20 $\mu\text{g/l}$, pokud se nepoužije prodloužená doba zrání za studena, aby mohlo docházet k pomalé konverzi prekursoru. Při všech třech kontinuálních fermentacích popsaných v sekci 6.5 byla hladina diacetylu při opouštění reaktoru nad požadovanou cílovou hodnotou 30 $\mu\text{g/l}$ v nezředěném pivu. Pokud byla kapalina v tomto stadiu přefiltrována k odstranění kvasinek, zůstal diacetyl vysoký, a proto byl aplikován vsázkový interval za tepla, aby se hodnota diacetylu snížila pod přijatelnou mez.

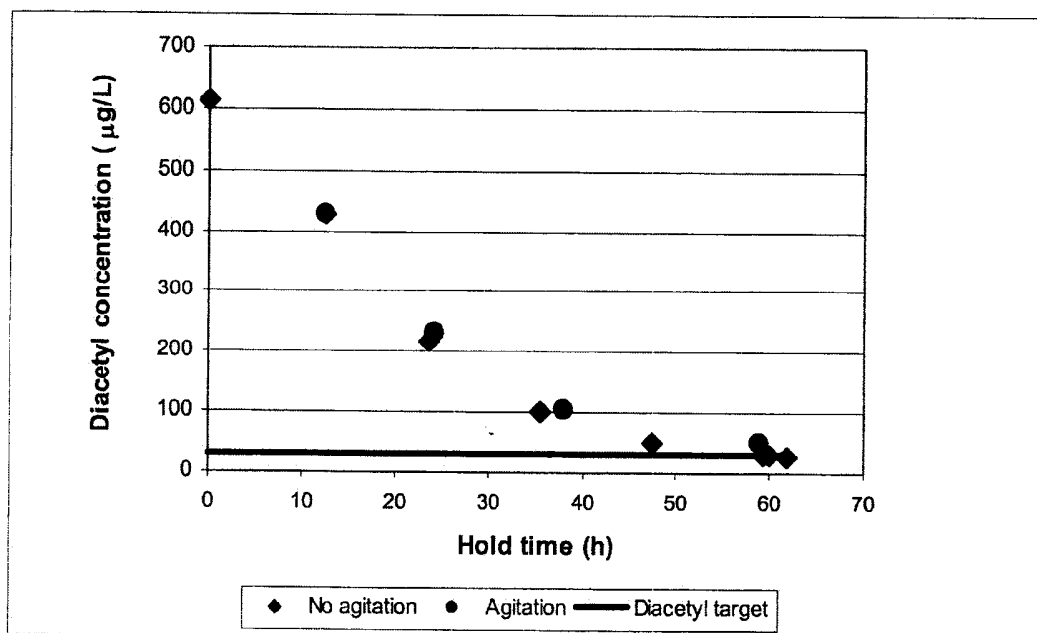
Kontinuálně fermentované pivo bylo zachycováno a uchováno ve 40l tancích z nerezové oceli při 21 °C. Z kapaliny byly pravidelně odebírány malé vzorky (100 ml) a analyzována na diacetyl, ethanol, specifickou hmotnost, estery a přiboudlinu. Obr. 6.74 znázorňuje snížení diacetylu v závislosti na době zdržení za tepla pro jednu vsázku piva, fermentovaného kontinuálně s kvasinkami LCC290 jako imobilizační maticí. Interval zdržení za tepla účinně snížil hladinu diacetylu z cca 600 $\mu\text{g/l}$ pod 30 $\mu\text{g/l}$, což se v pivovarnickém průmyslu považuje za předběžnou mez.

V jiném testu byl zkoumán vliv míchání na snížení diacetylu během doby zdržení. Do sběrné nádoby piva byl nerezovou trubkou o průměru 1,27 cm ve dně přiváděn probublávací oxid uhličitý (0,14 m^3/h), aby byla kapalina během doby zdržení míchána. Výsledky tohoto experimentu znázorňuje obr. 6.75. Zdá se, že míchání pomocí CO_2 mělo na rychlost snižování diacetylu v tomto sekundárním jímácím tanku velmi malý vliv. Tento výsledek může ukazovat na neadekvátnost míchání pomocí CO_2 , které proto nezvyšuje reakční rychlost první chemické reakce (konverze α -acetolaktátu na diacetyl) nebo nezvyšuje rychlost přestupu hmoty, aby druhá reakce probíhala rychleji (konverze diacetylu na acetoin kvasinkami). Může být také možné, že nemíchaná nádoba obsahuje dostatek buněk v suspenzi, aby dále redukovaly diacetyl na chuťové inaktivní acetoin, jakmile dojde k rychlost limitující chemické konverzi (1. stupeň).

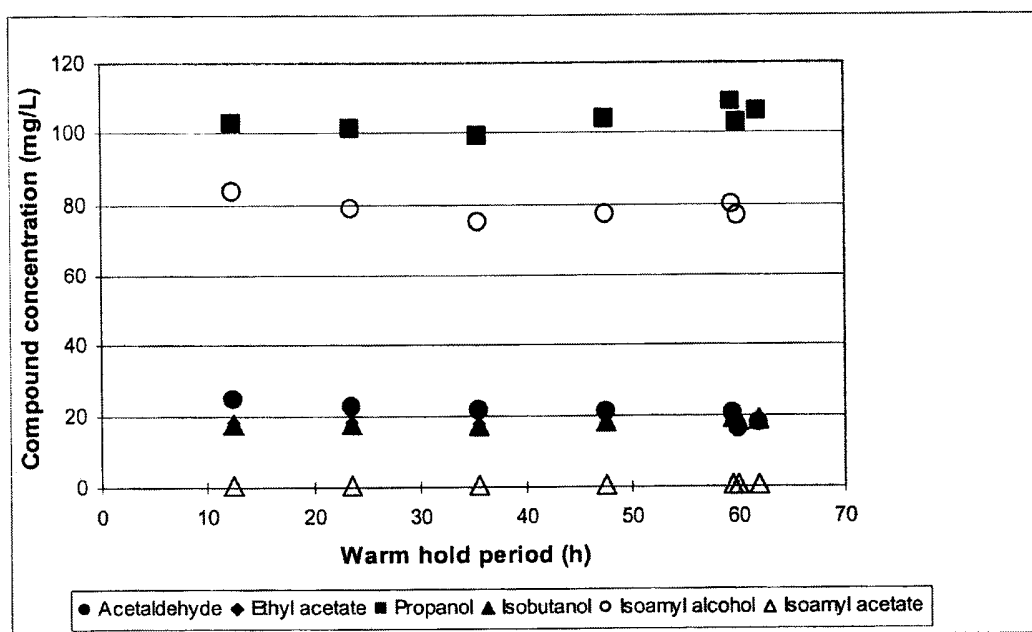
Účinky tohoto vsázkového prodlevy za tepla, následujícího po primární kontinuální fermentaci, na koncentraci esterů a přiboudlin a na koncentraci ethanolu a specifickou hmotnost kapaliny jsou znázorněny na obr. 6.76, resp. 6.77. Z těchto výsledků se zdálo, že interval zdržení za tepla má malý vliv na koncentrace acetaldehydu, ethylacetátu, propanolu, isobutanu, isoamylalkoholu a isoamylacetátu (obr. 6.76). Specifická hmotnost kapaliny v jímací nádobě poklesla během prvních 12 h doby zdržení z 2,7 °P na 2,0 °P a pak se ustálila na této nižší hodnotě. Koncentrace ethanolu byla během celé 65-h doby testu stálá na 70 mg/l . Tyto výsledky ukázaly, že doba zdržení primárně ovlivňuje koncentraci diacetylu 2,3-pentandionu, zatímco dopad na estery, přiboudlinu a ethanol je minimální.



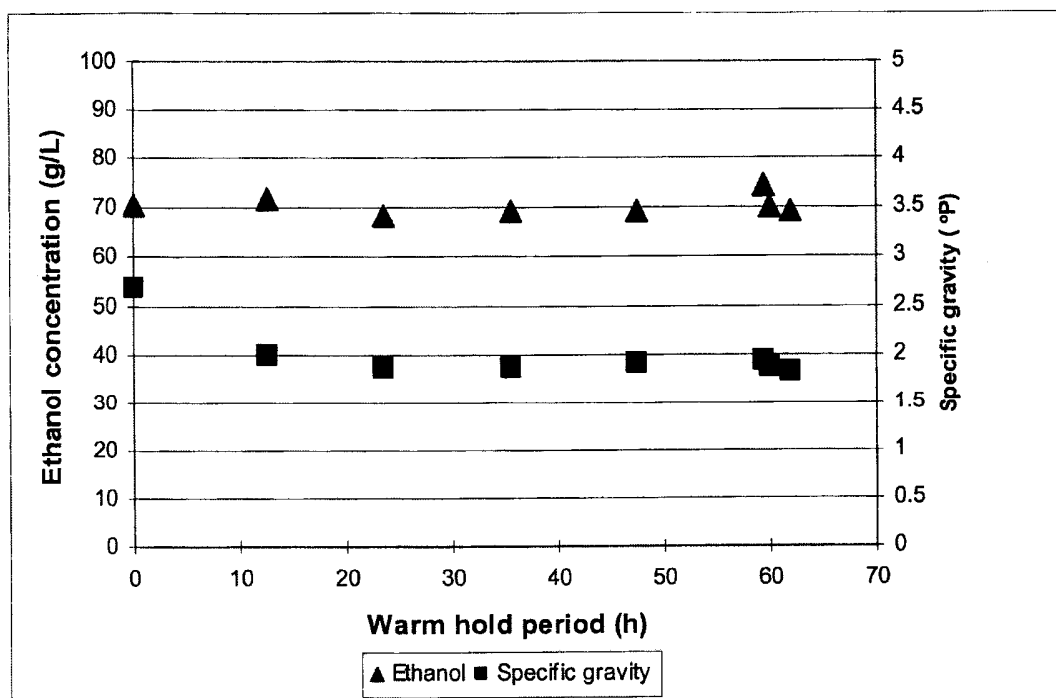
OBR. 6.74. KONCENTRACE VICINÁLNÍCH DIKETONŮ V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290 V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM.



OBR. 6.75. KONCENTRACE DIACETYLU V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290 V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM.



OBR. 6.76. KONCENTRACE ESTERŮ A PŘIBOUDLINY V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290 V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM.



OBR. 6.77. KONCENTRACE ETHANOLU A SPECIFICKÁ HMOTNOST V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290 V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM.

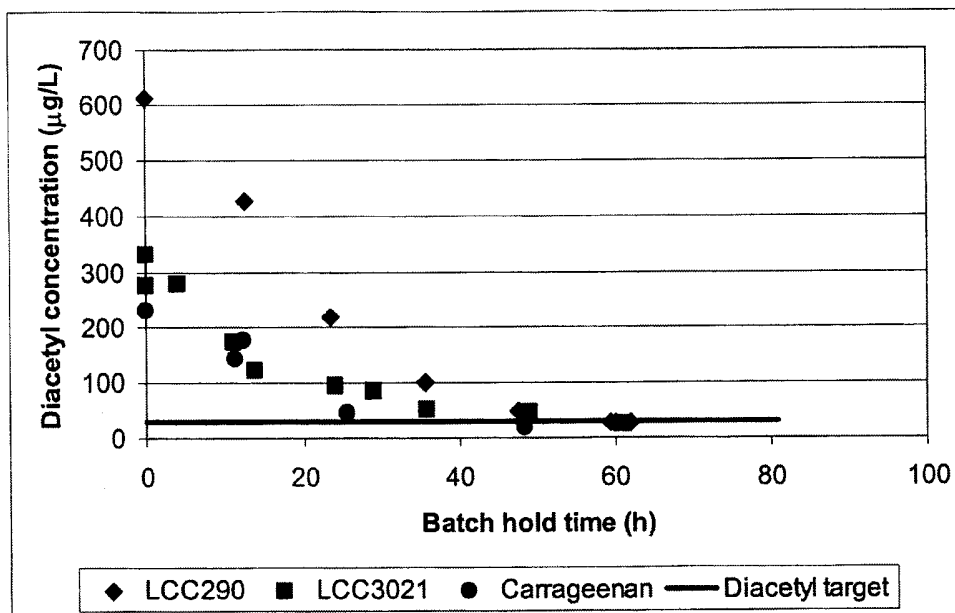
Postup se vsázkovou prodlevou byl aplikován na kapalinu získanou z kontinuální fermentace v 50l bioreaktoru s plynovým výtahem s použitím superflokulentních kvasinek LCC290, středně flokulentních kvasinek LCC3021 nebo κ -karagenanem imobilizovaných kvasinek. Profily redukce diacetylu pro tyto tři zkušební běhy jsou znázorněny na obr. 6.78. Ve všech třech případech byl diacetyl úspěšně snížen na cílovou hodnotu 30 $\mu\text{g/l}$. Doba nutná k tomuto snížení se však ve všech třech případech lišila. V situaci LCC290 bylo snížení z 600 $\mu\text{g/l}$ na 30 $\mu\text{g/l}$ dosaženo přibližně za 48 h, zatímco fermentace s LCC3021 a s κ -karagenanem vyžadovaly pro dosažení této cílové hodnoty pouze cca 24 h a cca 40 h. Bylo postulováno, že tento rozdíl se vztahoval k počáteční hodnotě diacetylu a nikoli k typu použité imobilizační matrice.

Obr. 6.79 zobrazuje výsledky diacetylu z obr. 6.78 s úpravou času provedenou pro výsledky fermentací s LCC3021 a κ -karagenanem. Původní křivky snížení diacetylu z posledních dvou fermentací byly posunuty tak, aby jejich počáteční hodnoty spadly na křivku snížení diacetylu, vytvořenou superflokulentními kvasinkami LCC290. Po této transformaci se zdá, že profil redukce diacetylu spadá pro všechny tři systémy na stejnou čáru. S použitím software TableCurve2D byla těmito výsledky proložena křivka kinetické rovnice prvního řádu (Levenspiel, 1972) (obr. 6.80). Bylo vypočteno, že upravená experimentální data z obr. 6.79 vyhovují rovnici:

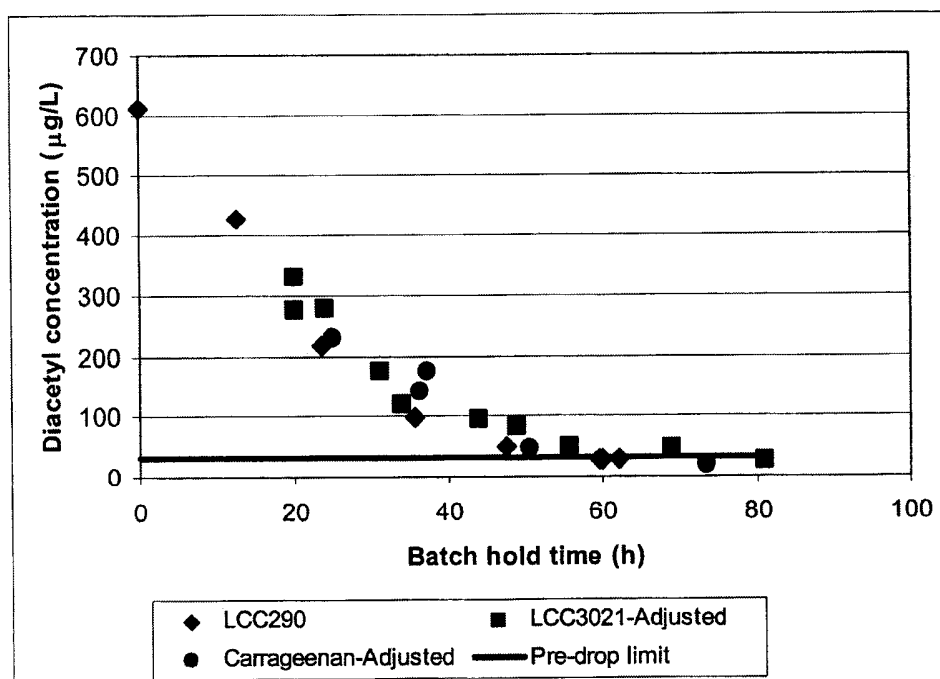
$$[\text{Diacetyl}] = 648,54 e^{(-0,0426 t)} \quad (6.1)$$

s korelačním koeficientem 0,96. Tento výsledek silně podporuje teorii, že všechny tři imobilizační systémy mají stejný potenciál redukce diacetylu. Tyto výsledky by neměly být překvapující, protože redukce diacetylu je často spojena s kmenem kvasinek (Nakatani et al., 1984). κ -Karagenanový systém imobilizoval kvasinky LCC3021 ve své gelové struktuře a kvasinky LCC290 byly selektovanou variantou kmene LCC3021.

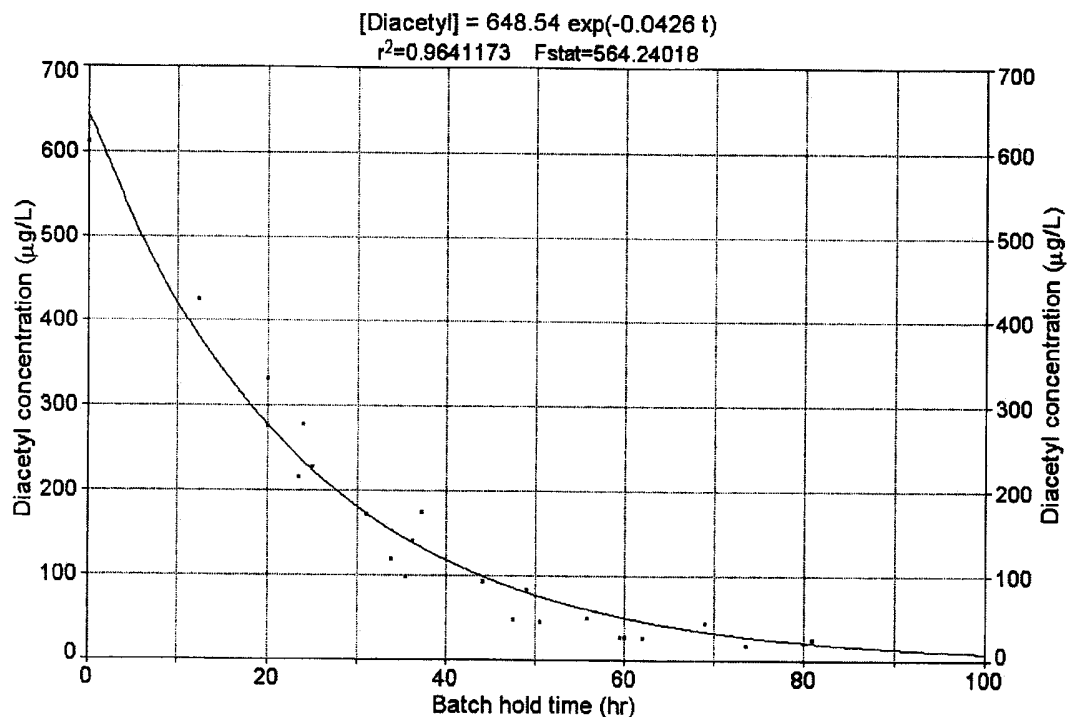
Jakmile byla hladina diacetylu pod cílovou hodnotou 30 $\mu\text{g/l}$, byla výsledná piva podrobena zrání v tancích za studena (2 °C) po dobu 7 dní, než podstoupila finální úpravu produktu (filtrace, ředění, sycení a balení). V tabulce 6.3 je shrnuta analýza piv produkovaných v 50l pilotních systémech buď s kvasinkami LCC290, kvasinkami LCC3021 nebo κ -karagenanem imobilizovanými kvasinkami jako imobilizační matricí. Obr. 6.81 je radarový graf esterů a přiboudlin těchto tří piv vyrobených kontinuálně a kontrolního piva vyrobeného průmyslově vsázkovým způsobem. V porovnání s průmyslově vyrobenou vsázkovou kapalinou (kontrola) měly kontinuálně získané kapaliny nižší estery (ethylacetát, isoamylacetát) a vyšší propanol a nižší isobutanol, primární amylalkohol a isoamylalkohol. Hladina acetaldehydu v produktech kontinuální fermentace byla vyšší než u kontrolní kapaliny. Hladina pění, počáteční chladový zákal, tepelný zákal, hladina dimethylsulfidu, oxidu siřičitého, oxidu uhličitého a vzduchu byly v mezích specifikací.



OBR. 6.78. KONCENTRACE DIACETYLU V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290, LCC3021 A KVASINKAMI IMOBILIZOVANÝMI KARAGENANOVÝM GELEM V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM.



OBR. 6.79. KONCENTRACE DIACETYLU V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290, LCC3021 A KVASINKAMI IMOBILIZOVANÝMI KARAGENANOVÝM GELEM V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM. HODNOTY PRO FERMENTACI S LCC3021 A S KARAGENANEM BYLY UPRÁVENY V ČASE, ABY MĚLY STEJNÝ VÝCHOZÍ BOD JAKO FERMENTACE LCC290.

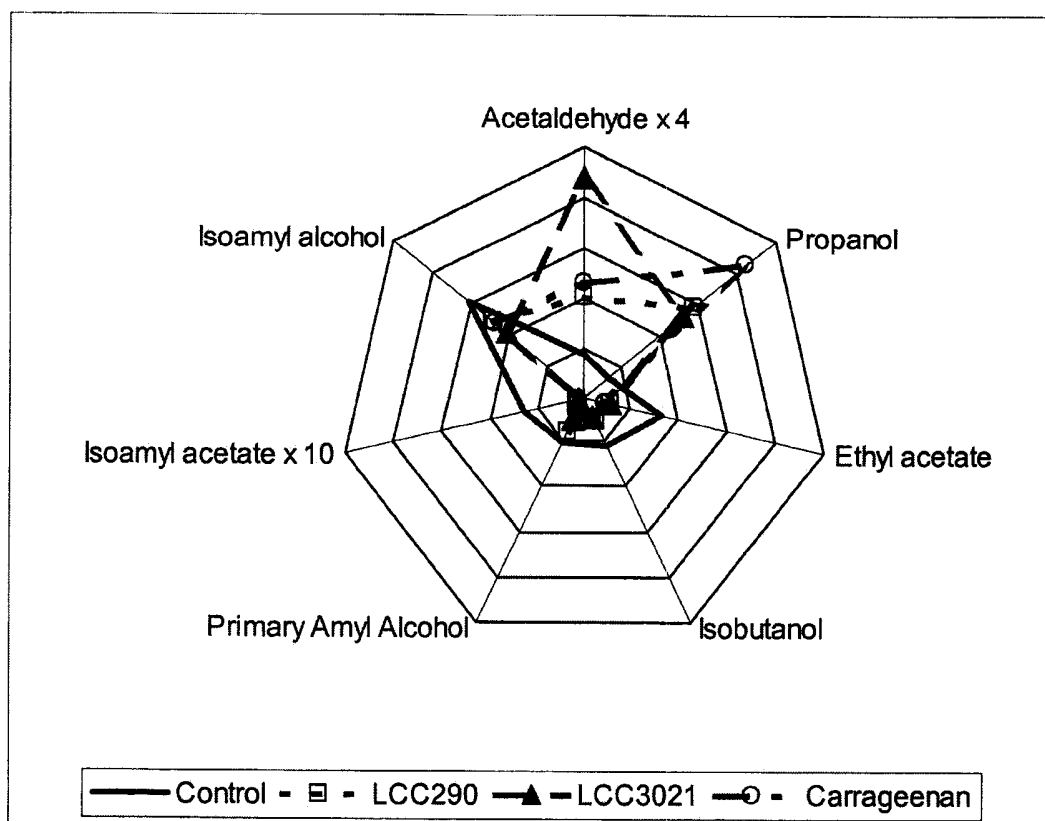


Obr. 6.80 KONCENTRACE DIACETYLU V ZÁVISLOSTI NA PRODLEVĚ ZA TEPLA PO PRIMÁRNÍ KONTINUÁLNÍ FERMENTACI S KVASINKAMI LCC290, LCC3021 A KVASINKAMI IMOBILIZOVANÝMI KARAGENANOVÝM GELEM V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM. HODNOTY PRO FERMENTACI S LCC3021 A S KARAGENANEM BYLY UPRAVENY V ČASE, ABY MĚLY STEJNÝ VÝCHOZÍ BOD JAKO FERMENTACE LCC290.

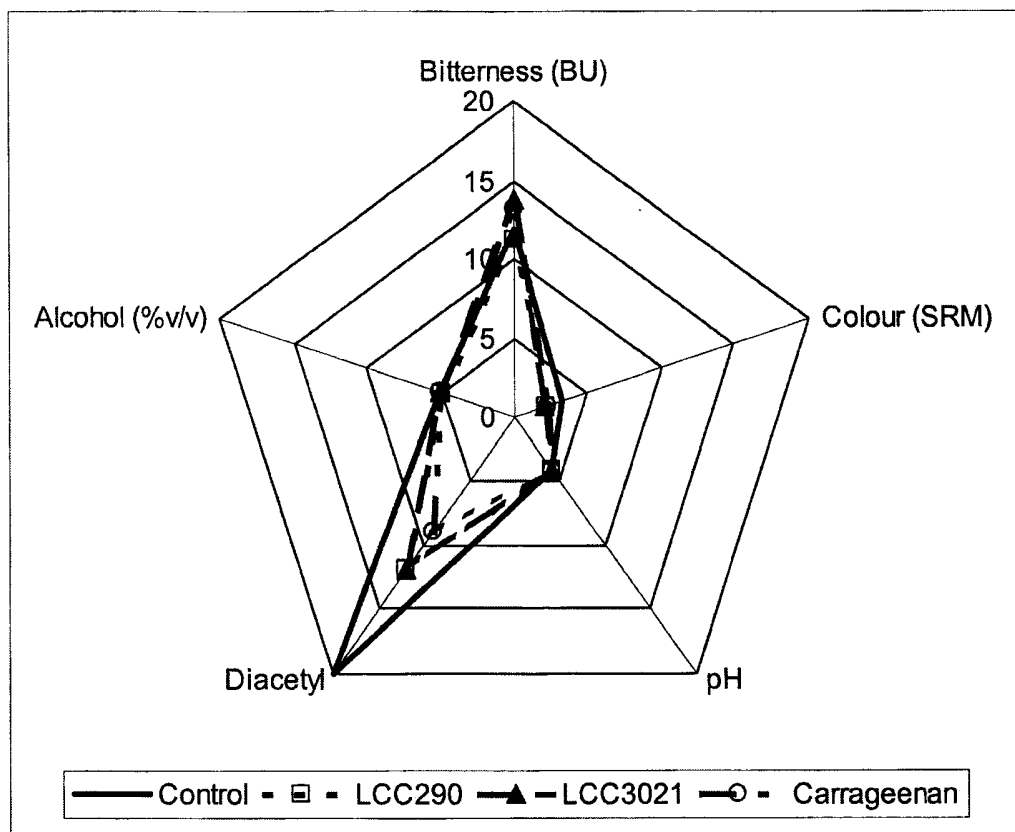
Některé jiné parametry (zdánlivý extrakt, skutečný extrakt, vypočtený původní extrakt, barva, hořkost), které jsou těsně ovlivněny ředěním produktu z původní koncentrace ethanolu na konečnou hodnotu 5,9 % v/v, byly odlišné než u kontroly, protože kontinuální produkty vyžadovaly vyšší ředění vodou pro dosažení požadované hodnoty ethanolu kvůli vyšším původním koncentracím ethanolu (70 g/l oproti 60 g/l ve vsázce). Obr. 6.82 je radarový graf alkoholu, diacetylů, pH, barvy a hořkosti těchto kapalin popsaných výše. Hladina alkoholu, diacetylů a pH jsou v cílových mezích, zatímco barva a hořkost jsou mimo specifikaci. Nižší barva souvisí s vyšším ředěním, které podstoupily kontinuální kapaliny, a je ji možno upravit zvýšením barvy v živinách dodávaných do sladiny. Hodnoty hořkosti podléhají stejné chybě ředění a lze je rovněž upravit v přívodu živin do sladiny.

Tabulka 6.3. Souhrn analýzy pív produkovaných s použitím systému plynového výtahu.

Specifikace	kapalina fermentovaná průmyslově ve vsázce	kapalina kontinuálně fermentovaná s LCC290	kapalina kontinuálně fermentovaná s LCC3021	kapalina kontinuálně fermentovaná s karagenanem
vzduch (ml)	<1	0,40	0,35	0,35
oxid uhličitý (%)	2,75	2,90	2,81	2,73
oxid siřičitý (mg/l)	<10	0	0	0
dimethylsulfid (μg/l)	<70	59	30	30
hořkost (BU)	12,00	11,30	13,74	13,18
barva (SRM)	3,20	2,20	2,10	2,30
pH	4,10	4,15	4,10	4,09
diacetyl (μg/l)	<20	12	12	9
alkohol (%v/v)	5,00	4,99	5,03	5,04
alkohol (%w/w)	3,93	3,93	3,96	3,96
zdánlivý extrakt (°P)	1,55	1,02	1,40	1,44
skutečný extrakt (°P)	3,36	2,84	3,4	3,27
vypočt. pův. extrakt (°P)	11,0	10,5	11,0	11,0
tepelný zákal (FTU)	<200	45	50	47
počáteční chladový zákal (FTU)	<100	43	51	54
pěna (s)	>170	167	187	175
acetaldehyd (mg/l)	4,4 ± 1,3	10,0	21,9	11,6
propanol (mg/l)	12,8 ± 6,8	57,6	51,7	84,3
ethylacetát (mg/l)	32,4 ± 4,3	11,0	10,6	8,7
isobutanol (mg/l)	21,6 ± 3,4	10,6	8,3	8,9
primární amylalkohol (mg/l)	20,0 ± 2,3	15,2	9,4	6,4
isoamylalkohol (mg/l)	60,9 ± 8,6	48,0	40,9	46,5
isoamylacetát (mg/l)	2,5 ± 0,7	0,32	0,25	0,18



OBR. 6.81. RADAROVÝ GRAF PIV FERMENTOVANÝCH KONTINUÁLNĚ V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM S POUŽITÍM BUĎ KVASINEK LCC290, LCC3021 NEBO KVASINEK LCC3021 IMOBILIZOVANÝCH V KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČKÁCH. V TOMTO GRAFU JSOU ZNÁZORNĚNY ESTERY A PŘIBOUDLINA HOTOVÝCH PIV. VŠECHNY PRODUKTY BYLY PO SKONČENÍ PRIMÁRNÍ FERMENTACE PODROBENY PRODLEVĚ ZA TEPLA.



OBR. 6.82. RADAROVÝ GRAF PIV FERMENTOVANÝCH KONTINUÁLNĚ V SYSTÉMU S PLYNOVÝM VÝTAHEM S POUŽITÍM BUĎ KVASINEK LCC290, LCC3021 NEBO KVASINEK LCC3021 IMOBILIZOVANÝCH V KARAGENANOVÝCH GELOVÝCH PERLIČKÁCH. V TOMTO GRAFU JSOU ZNÁZORNĚNY ESTERY A PŘIBOUDLINA HOTOVÝCH PIV. VŠECHNY PRODUKTY BYLY PO SKONČENÍ PRIMÁRNÍ FERMENTACE PODROBENY PRODLEVĚ ZA TEPLA.

6.6.2. Výběr nejlepšího probublávacího plynu

- 5 Oxid uhličitý je ve většině pivovarů snadno k dispozici, protože jde o přirozený vedlejší produkt fermentace kvasinek. Pivovary uvolňovaný CO_2 shromažďují a pak plyný proud perou k odstranění drobných nečistot, které mohly do něho být zaneseny (typicky sirných sloučenin). Tento přečištěný proud je pak stlačen a skladován jako kapalina pro budoucí použití v pivovaru (čistota 99,95 %). Použití oxidu uhličitého jako probublávacího plynu při kontinuální fermentaci se z provozního hlediska zdálo jako logická volba. Zařízení by mělo být schopno využít svůj sběrný systém a získávat zpět CO_2 opouštějící kontinuální fermentor. Použití jiných plynů by pouze přidávalo další úroveň složitosti k dosavadnímu zařízení.

- 15 Aby se však kontinuální fermentace stala životaschopnou alternativou k dosavadním vsázkovým provozům, je třeba získávat produkt, těsně se vyrovnávající dosavadním značkám. Má se za to, že takového přiblížení produktu je možno minimalizací biologických/biochemických dopadů, kterým jsou kvasinky vystaveny během kontinuální fermentace. Je známo, že oxid uhličitý nepříznivě ovlivňuje metabolismus kvasinek během primární fermentace. Tento efekt se zvětšuje ve vysokých cylindrokónických nádobách, kde hlavový tlak systému potlačuje volné uvolňování CO_2 z kapalného média. Tyto podmínky podporují tendenci k výrobě pív s nižším obsahem esterů a vyšším obsahem přiboudliny. Byly činěny úspěšné pokusy část tohoto CO_2 z fermentace odstraňovat periodickým nastřikováním pomocného proudu plynu do dna cylindrokónické nádoby.

Účinky inhibice CO₂ se zdály být potlačeny a získané produkty obsahovaly méně přiboudliny a vyšší hladinu esterů.

- 5 Na základě této znalosti bylo zkoumáno použití dusíku místo oxidu uhličitého jako probublávacího plynu v systému s plynovým výtahem. Bylo odebráno několik kapalin fermentovaných v 50l reaktorech s výtahem a zpracováno v experimentálním pivovaru Labatt s použitím následujícího postupu. Po 14 h od odebrání kapaliny z reaktoru (doba zdržení 24 h), bylo „mladé pivo“ dekan-
 10 továno od kvasinek. Tato kapalina pak byla podrobena časové prodlevě 48 h při teplotě místnosti (21 °C) hold period, po které se dosáhlo Labattových specifikací jak pro diacetyl, tak pro acetaldehyd (diacetyl <30 µg/l a acetaldehyd <10 mg/l). Tato kapalina pak byla ponechána zrát za studena po dobu 7 dní a pak zpracována standardním průmyslovým postupem.

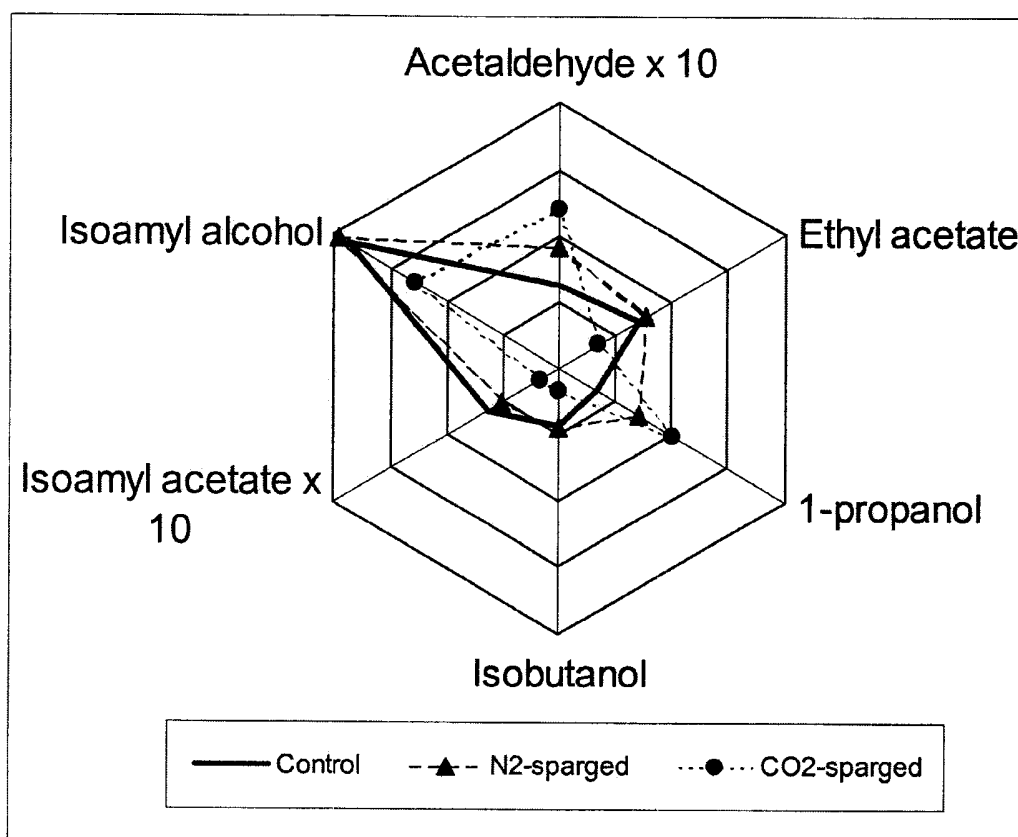
- V tabulce 6.4 je uvedeno srovnání výsledků hotových piv, získaných kontinuální fermentací s kvasinkami LCC290 v systémech s probubláváním CO₂ a N₂ se standardně průmyslově získanou kapalinou (kontrola). Kapalina probublávaná dusíkem má vůči průmyslově získané kapalině
 15 příznivé výsledky. Analýzy ukázaly, že v této kapalině je dvakrát více 1-propanolu, zatímco koncentrace dimethylsulfidu je přibližně třikrát nižší. Hodnoty barvy i hořkosti se jeví vyšší než u průmyslové kapaliny, stejně jako potenciál pění, měřený testem NIBEM. Pivo probublávané CO₂ mělo nižší estery (ethylacetát, isoamylacetát) a vyšší 1-propanol než pivo probublávané
 20 dusíkem. Pro kontrolní kapalinu, kapalinu probublávanou CO₂ a kapalinu probublávanou dusíkem byly vypočteny poměry esterů (ethylacetát, isoamylacetát, ethylhexanoát, ethyloktanoát, ethyldekanoát) k přiboudlině (1-propanol, isobutanol, isoamylalkohol) a činily 0,30, 0,27, resp. 0,15.

Tabulka 6.4. Souhrn chemických analýz pro několik produktů kontinuálně fermentovaných s použitím systému s plynovým výtahem plněného superflokulentními kvasinkami LCC290.

Analýza	průmyslově vsázkově fermentovaná kapalina	kontinuálně fermentovaná kapalina s probubláváním dusíkem	kontinuálně fermentovaná kapalina s probubláváním CO₂
acetaldehyd (mg/l)	2,53	3,68	4,80
ethylacetát (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
isoamylacetát (mg/l)	2,57	2,06	0,69
isoamylalkohol (mg/l)	74,54	78,45	51,35
ethylhexanoát (mg/l)	0,140	0,180	0,074
ethyloktanoát (mg/l)	0,110	0,280	0,059
ethyldekanoát (mg/l)	0,0079	0,0630	0,0081
diacetyl (μg/l)	6	9	10
2,3-pentandion (μg/l)	4	5	14
oxid siřičitý (mg/l)	1,3	1	0
dimethylsulfid (mg/l)	79	24	64
hořkost (BU)	11,5	20,6	15,5
barva (SRM)	3,1	4,1	3,7
pěna (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
alkohol (% v/v)	4,93	5,74	5,17

Obr. 6.83 je radarový graf, znázorňující koncentrace esterů, přiboudliny a acetaldehydu v těchto třech kapalinách. Profil kapaliny probublávané dusíkem se velmi blíží profilu kontrolní kapaliny až na vyšší hladinu propanolu. Fermentace s probubláváním CO_2 vykazovala mnohem nižší estery a přiboudlinu, které se lišily od kontroly. V obou kapalinách z kontinuální fermentace byly hladiny diacetylu a acetaldehydu pod specifikacemi Labatt.

Z těchto zjištění vyplynulo, že probublávání dusíkem zvyšuje produkci esterů na podobnou úroveň jako u komerčních piv, zatímco probublávání oxidem uhličitým produkuje kapaliny s relativně nízkou koncentrací esterů. Tyto výsledky ukazují na změněný metabolismus kvasinek v prostředí probubláváním CO_2 . Hladina propanolu, bez ohledu na probublávací plyn, byla v kontinuálně fermentovaných pivech mnohem vyšší než v průmyslově fermentovaných kontrolních pivech. Ačkoli jsou koncentrace propanolu stále pod chuťovým prahem 100 mg/l, zaznamenané rozdíly mohou být ukazatelem mírně změněného metabolismu při kontinuální fermentaci v porovnání se vsázkovou fermentací. Je rovněž možné, že vyšší hladina propanolu je důsledkem kontinuální dodávky aminokyseliny threoninu, která poskytuje oxo-kyselou degradační cestou propanol.



OBR. 6.83. RADAROVÝ GRAF POROVNÁVJÍCÍ ESTERY A PŘIBOUDLINU V KAPALINÁCH Z KONTINUÁLNÍ FEMENTACE S PLYNOVÝM VÝTAHEM S DUSÍKEM A CO_2 VŮČI PRŮMYSLOVĚ ZÍSKANÉ KAPALINĚ.

20 Kapitola 7.0 závěry

Z výzkumů, prováděných v celém průběhu této práce, lze učinit následující závěry. S použitím 50l pilotního bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou jako primárního kontinuálního fermentoru lze vyrobit přijatelné pivo bez závažných chuťových defektů, jestliže následuje 2denní prodleva ve vsázce pro omezení diacetylu. Pro fermentaci sladiny o vysoké hmotnosti (17,5 °P)

na konečnou fermentační půdu (2,5 °P) je dosažitelná minimální doba zdržení 24 h nebo 1 obrat objemu reaktoru za den. Použití superflokulentních kvasinek LCC290, středně flokulentních kvasinek LCC3021 a kvasinek imobilizovaných κ -karagenanem jako nosičů je v systému s plynovým výtahem proveditelné. Použití těžších prefabrikovaných nosičů, jako jsou skleněné perličky Siran® a křemelinové perličky Celite® nepředstavuje pro systém s plynovým výtahem a sací trubkou praktické alternativy. Je možno dosáhnout minimálně 2 měsíců nepřetržitého provozu v případě κ -karagenanových gelových perliček a minimálně 3 měsíců nepřetržitého provozu v případě fermentací LCC290 a LCC3021 bez jakékoli zaznamenané mikrobiální kontaminace nebo nestability výkonu reaktoru. Mimoto byl kontinuální systém schopen manipulačního potenciálu a předpokládaných změn v dodávce při dlouhodobém provozu.

Kontinuální fermentaci s použitím superflokulentních kvasinek LCC290 s dusíkem jako probublávacím plynem, s následnou 2denní prodlevou ve vsázce, se dosáhlo nejbližší srovnatelné chuti s kontrolním průmyslovým pivem. Dvoudenní vsázková prodleva, navrhovaná pro vypořádání se s vysokými koncentracemi diacetylu ve výstupní kapalině z primárního kontinuálního fermentoru, byla účinným, i když nikoli optimálním kontrolním mechanismem. Schopnost všech tří testovaných systémů kontinuální fermentace snížit diacetyl byla velmi podobná, a jak bylo předem očekáváno, tento rys lze přiřadit k typu kmene. Vsázková prodleva neovlivnila koncentraci esterů a přiboudliny v pivu během stadia prodlevy.

Použití 3 % kyslíku v probublávacím plynu poskytlo adekvátní hladinu zdroje kyslíku ve sladidě, čehož výsledkem bylo udržení životaschopné populace kvasinek (nad 90 %) po celou dobu fermentace při produkci piva s přijatelným chuťovým profilem. Kontinuální fermentace s použitím kvasinek LCC290 a LCC3021 jako imobilizačních matric dosáhly pseudo-ustáleného stavu rychleji než systém s κ -karagenanovými gelovými perličkami. Nestabilita fermentací s imobilizací κ -karagenanem, pravděpodobně v důsledku zvýšení populace imobilizovaných kvasinek, způsobila fermentaci produktu pod cílovými hodnotami. Pro ideální kontinuální produkci je nutno jev vysocce nežádoucí, protože prodloužený náběh zvětšuje dobu nutnou k reagování a znovuzapočetí po katastrofickém výpadku. Delší náběhová fáze vyžaduje také delší fázi kontinuálního běhu, aby byl atraktivní.

Kontinuálním procesem výroby gelových perliček bylo získáno požadované množství perliček pro testování v poloprovozních jednotkách. Proces výroby perliček je však nutno dále optimalizovat pro získání perliček s těsnější distribucí velikostí. Proces rovněž vyžaduje další výzkum pro stanovení jeho vhodnosti pro průmyslové měřítko. Spíše než míchadlo typu Kenics, zkoumané v této práci, musí být nalezen nový typ statického míchadla, u kterého lze dosáhnout dimenzování zvětšením průměru, nikoli pouze počtu statických prvků, a testován, aby se tato možnost stala uskutečnitelnou.

Technika sledování pulsu kyseliny, použitá v této práci, nám umožnila zjišťovat dobu míchání a rychlost cirkulace v 50l pilotním bioreaktoru během skutečných fermentací s použitím superflokulentních kvasinek LCC290, středně flokulentních kvasinek LCC3021 a κ -karagenanem imobilizovaných kvasinek. Daty o míchání byla proložena útlumová sinusoida, z níž byla vypočtena doba míchání a rychlost cirkulace.

Systém s plynovým výtahem a sací trubicou poskytuje rychlé míchání s dobou míchání vypočtenou na méně než 200 s pro všechny tři typy imobilizačních nosičů. Ve všech třech testovaných verzích doba míchání mírně klesala se vzrůstem povrchové rychlosti plynu. Při všech testovaných povrchových rychlostech plynu (2 mm/s až 6 mm/s) vykazoval systém LCC290 nejrychlejší dobu míchání (mezi 100 s a 120 s). Doby cirkulace kapaliny byly pro všechny tři typy nosičů velmi podobné bez ohledu na povrchovou rychlost plynu. Také lineárně klesaly s odpovídajícím vzrůstem rychlosti plynu. Ke kompletnímu promíchání kapaliny (98% odpověď na puls) došlo u všech testovaných imobilizačních nosičů během tří až šesti cirkulačních cyklů reaktoru. Tyto výsledky potvrdily, že testovaný 50l pilotní systém poskytuje adekvátní míchání pro kontinuální

fermentaci. Špatné doby míchání by ukazovaly na možné mrtvé zóny, které by byly při fermentaci piva nežádoucí.

5 Tato výzkumná práce Ph.D. jasně prokázala proveditelnost dalšího dimenzování výrobního zařízení, navrženého, vystavěného a provozovaného v experimentálním pivovaru Labatt. Použití bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou se superflokulentními kvasinkami LCC290 a dusíkem jako probublávacím plynem s následnou 2–denní vsázkovou prodlevou při 21 °C je doporučováno jako systém volby.

10 Podrobný popis – Část 2:

Kapitola 4. materiály a metody

4.1. Kmen kvasinek a jeho charakteristika

15 V celé této práci byl používán kmen ležákových kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, uložený ve sbírce Labatt Culture Collection (LCC) 3021. *Saccharomyces cerevisiae* je synonymem *Saccharomyces uvarum* Beijerinck kvar. *carlsbergensis* Kudryavtsev, 1960 (Kurtzman, 1998). Při 37 °C LCC 3021 neroste. To umožňuje rozlišit LCC 3021 od většiny pivovarských kvasinek, které rostou při 37 °C a vyšších teplotách. LCC 3021 je spodně kvasicí kmen, podobně jako většina ležákových kvasinek, ale existují výjimky. Tento kmen rovněž zkvašuje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu, raffinózu a melibiózu, ale nikoli škroby. Schopnost zkvašovat melibiózu je pro taxonomy jedním z nástrojů, jak jej odlišit od ostatních pivovarských kvasinek.

25 Podobně jako většina pivovarských kmenů je LCC 3021 polyploidní a reprodukuje se mitotickým dělením. Za normálních podmínek vaření piva se ležákové kvasinky nereprodukují meiózou. To má výhodu, že je kmen geneticky stálý, protože je méně pravděpodobně křížení genetického materiálu (Kreger–van Rij, 1984).

30 4.2. Příprava inokula kvasinek

Kvasinky byly odebrány z lahvičky, kryogenně uchovávané v mrazničce při –80 °C, a naneseny na agarové živné médium s peptonem a kvasničním extraktem (PYN; pepton 3,5 g/l, kvasničný extrakt 3,0 g/l, KH_2PO_4 2,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/l, glukóza 20,0 g/l, agar 20,0 g/l v dH₂O) pro získání dobře oddělených kolonií. Z 3 až 4 staré plotny rostoucích kvasinek bylo odebráno sterilní oko, tvořené několika koloniemi, a tyto kolonie byly naočkovány do 10 ml objemu sladiny ve zkumavce. Sladina byla ponechána přes noc při 21 °C, odtud termín „noční kultura“, a pak byla přidána do většího objemu sladiny, obvykle 200 ml, pro zvýšení biomasy kvasinek. V následujících dnech byla tato směs přidána do dalšího většího objemu sladiny, a tak dále, dokud nedošlo k propagaci požadovaného množství kvasničné biomasy. Obvykle se očekává produkce přibližně 20 g ležákových kvasinek na litr sladiny. Pro přípravu na inokulaci kvasinek byla kultura odstředována 10 min při 4 °C a $1,0 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ (radius = 0,06 m). Po odstředění byla kapalina dekantována a z pelety byla získána příslušná mokrá váha kvasinek pro očkování.

45 4.3. Médium pro fermentaci sladiny

Pivovar Labatt Breweries of Canada dodal pivovarskou sladinu se specifickou hmotností 17,5 °P. Koncentrace zkvasitelných uhlohydrátů, specifická hmotnost a volný aminový dusík v pivovarské sladině používané pro fermentace v celé této práci jsou uvedeny v příloze A2.1. Další podrobnosti ohledně složení sladiny uvádí Dale et al., 1986, Hoekstra, 1975, Hough et al., 1982, Klop-
per, 1974, and Taylor, 1989.

Vsázkové fermentace: Sladina byla zahřívána 45 min v autoklávu na 100 °C a pak ochlazena, načež byla naočkována imobilizovanými perličkami nebo volně suspendovanými kvasinkami.

Kontinuální fermentace: Sladina používaná pro kontinuální fermentace byla bleskově pasterizována (deskový tepelný výměník Fisher, typ combi-flow Eurocal 5FH) předtím, než byla zaváděna do bioreaktoru s plynovým výtahem, a tato sladina byla pravidelně monitorována na mikrobiální kontaminanty, jak je popsáno v sekci 4.6. Jestliže byla ve sladince detekována kontaminace, byla okamžitě zničena a ze zařízení byla získána nová sladina.

Bleskový pastér pracoval s objemovým průtokem $0,8 \text{ m}^3/\text{h}$. Jednotka měla trubkovou zdržovací sekci, kde byla sladina udržována na průměrné teplotě 85°C s minimální teplotou 80°C . Objem zdržovací sekce byl $1,13 \times 10^{-2} \text{ m}^3$ a poskytoval dobu zdržení ve zdržovací sekci 51 s. Po ohříváním stupni byla sladina po výstupu z jednotky rychle zchlazena na teplotu 2°C .

4.4. Metodika imobilizace

Kappa–karagenanový gel X–0909 byl laskavým darem od Copenhagen Pectin A/S. Kappa–karagenanové gelové perličky, obsahující zachycené ležákové kvasinky, byly vyrobeny procesem s použitím statického míchadla, jak je podrobně popisuje Neufeld et al. (1996), s počáteční zátěží 10^7 až 10^8 kvasinek/ml gelu, která je specifikována pro každé zařízení. Jak je znázorněno na obr. 15, proces se statickým míchadlem je založen na vzniku emulze mezi nevodnou kontinuální fází, rostlinným olejem (kukuřičný olej Mazola) a dispergovanou vodnou fází, roztokem kappa–karagenanu (3% w/v) v KCl (0,2% w/v), naočkované kvasinkami, s použitím řadových polyacetalových statických míchadel (Cole–Parmer Instrument Co., USA). V topné sekci schématu, kde se kvasinky rychle mísily s roztokem karagenanu a tvořila se emulze, byla teplota 37°C . Gelace kappa–karagenanových kapek v emulzi byla vyvolána rychlým ochlazením na ledové lázni a následným vytvrzením v lázni chloridu draselného (22 g/l). K vytvoření směsi kvasinek a karagenanu bylo použito 24prvkové statické míchadlo o průměru 6,4 mm. K vytvoření emulze bylo použito druhé 42prvkové míchadlo o průměru 12,7 mm. Perličky použité pro experimenty v této práci byly $0,5 \text{ mm} < (\text{průměr perličky}) < 2,0 \text{ mm}$.

4.5. Kumulativní distribuce velikostí částic kappa–karagenanových gelových perliček

S obsahem imobilizovaných kvasinek

Pro výpočet distribuce velikostí částic na bázi mokré hmotnosti byly kappa–karagenanové gelové perličky náhodně odebrány z 30l produkčního zařízení gelových perliček. Každý vzorek měl přibližnou hmotnost za mokra 500 g. Pro určení distribuce velikostí perliček bylo použito síťování. Perličky procházely řadou sít s velikostí oka 2,0, 1,7, 1,4, 1,18, 1,0 a 0,5 mm. K usnadnění síťování každého vzorku perliček byl použit objem 4,5 l roztoku KCl 22 g/l. Bylo předpokládáno, že kappa–karagenanové gelové perličky jsou dokonale kulové, takže průměr síta byl považován za průměr částice. Bylo rovněž předpokládáno, že hustota částic je rovnoměrná a nezávislá na velikosti částice.

4.6. Počítání a životnost kvasinek

Životnost a koncentrace volně suspendovaných kvasinek: K měření životnosti kvasinek byla použita mezinárodní metoda methylenové modři podle The American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Barvením se zjišťuje, zda je populace kvasinek životaschopná či nikoliv na základě schopnosti životaschopných kvasinek oxidovat barvivo na jeho bezbarvou formu. Neživotaschopným kvasinkám chybí schopnost oxidovat barvivo, a tudíž se barví modře. Methylenová modř, tlumená pufrem Fink–Kuhles, byla připravena smísením 500 ml roztoku A (0,1 g methylenové modři / 500 ml dH_2O) s 500 ml roztoku B (498,65 ml 13,6 g KH_2PO_4 / 500 ml dH_2O ve směsi s 1,25 ml 2,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ / 100 ml dH_2O) za vzniku konečného tlumeného roztoku methylenové modři s hodnotou pH 4,6.

Zředěný roztok kvasinek byl ve zkumavce smísen s roztokem methylenové modři na suspenzi přibližně 100 kvasinek v políčku mikroskopu. Malá kapka dobře promíchané suspenze byla

umístěna na mikroskopické sklíčko a překryta krycím sklíčkem. Po 1 až 5 minutách kontaktu s barvivem se kvasinky zbarvily modře a byly spočítány ty buňky, které zůstaly bezbarvé. Procento životaschopných buněk bylo uvedeno jako procento spočtených buněk z celkového počtu. Koncentrace kvasinek byla určena pomocí světelného mikroskopu a přístroje Hemacytometer (Hauser Scientific Company).

Životnost a koncentrace imobilizovaných kvasinek: Gelové perličky byly odděleny od kvasičí kapaliny průchodem směsi sterilním sítím (velikost pórů 500 μm) a promytím 10 ml destilované vody. Gelové perličky, 1 ml, obsahující zachycené kvasinky, byly přidány do sterilní 50 ml vzorkovnice, obsahující 19 ml destilované vody. Perličky pak byly použítím zařízení Polytron® (Brinkmann Instruments) rozrušeny, aby se kvasinky uvolnily z gelu. Životnost a koncentrace kvasinek pak byla měřena způsobem popsaným pro volně suspendované kvasinky.

4.7. Mikrobiologické analýzy

Analýzy v kapalně fázi: Vzorky pro mikrobiologické analýzy byly z kontinuální fermentace odebrány alespoň jednou týdně. Sladina, která byla používána pro kontinuální fermentace, byla rovněž před přenesením do reaktoru testována na kontaminaci. Pro zjištění přítomnosti aerobních a anaerobních bakterií byly vzorky nanášeny na Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories) s přídavkem 10 mg/l cykloheximidu a inkubovány 10 dní při 28 °C. Plotny, které byly testovány na kontaminaci anaerobními bakteriemi, byly umístěny do anaerobní nádoby s balíčkem AnaeroGen® (Oxoid), který vychytává veškerý kyslík zbylý v nádobě, a tak vytváří anaerobní prostředí. K potvrzení anaerobních podmínek v nádobě byl použit anaerobní indikátor (Oxoid), který se v přítomnosti kyslíku barví růžově. Kontaminace divokými kvasinkami byla testována nanesením vzorků na kvasničné médium (YM agar, Difco Laboratories) plus CuSO_4 (0,4 g/L), inkubované při 25 °C po dobu 7 dní. Pro testování vzorků na kontaminaci neležákovými kvasinkami byl použit výše popsaný agar s peptonem a kvasničným extraktem (PYN) při 37 °C po dobu 7 dní. Absence růstu kvasinek na PN při 37 °C ukazuje, že nejsou přítomny žádné pivovarské kvasinky, které rostou při 37 °C.

Analýzy v gelové fázi: V naší laboratoři byl vyvinut test, zajišťující, že imobilizované perličky s kvasinkami, používané pro fermentace, jsou před naočkováním do bioreaktoru prosté kontaminujícími bakteriemi. Hlavním problémem bylo zamezit kontaminaci organismy, které kazí pivo, jako je *Pediococcus sp.* a *Lactobacillus sp.* nebo divoké kvasinky. Objem 3 ml karagenanových gelových perliček byl naočkován do 100 ml několika různých selektivních kapalných médií, popsaných dále, umístěn do 250 ml baněk při 25 °C a třepán v inkubátorové třepačce s rychlostí 100 min^{-1} . Médium NBB (Nechweis von Bierschädlichen Bacterien) (BBL cat # 98139, NBB Broth Base, 0,02 g/l cykloheximidu) je semi-selektivní médium, které se používá pro bakterie kazící pivo, jako je *Pediococcus sp.* a *Lactobacillus sp.* Médium se síranem měďnatým (16 g/l média YM, Difco; 0,4 g/l CuSO_4) je semiselektivní médium pro testování na kontaminaci divokými kvasinkami. Konečné médium Standard Methods (STA) + cykloheximid (16 g/l média „Standard Methods“, Difco; 0,02 g/l cykloheximidu) se používá pro testování na bakterie, nacházejí se ve vodě, odpadní vodě, mlékárenských produktech a potravinách (Power and McCuen, 1988). Selektivní média byla zvolena, aby detekovala a identifikovala potenciální organismy kazící pivo během tří dní. Kontaminované vzorky byly označeny zákalem ve vzorku a byla provedena předběžná identifikace kontaminantů.

Metodika detekce respiračně deficitních (RD) kvasinek: Technika překrývání trifenylyltetrazoliumchloridem (TTC): Tato metoda byla použita k rozlišení respiračně deficitních kvasinek od zbytku populace a je založena na principu, že TTC je bezbarvá sůl, která tvoří při redukci červenou sraženinu. Jestliže se TTC navrství na kolonie kvasinek rostoucí na agaru YPD (kvasničný extrakt 10 g/l, pepton 20 g/l, dextróza, 20 g/l, agar 20 g/l v dH_2O), respiračně dostatečné kvasinky TTC redukují a tyto kolonie se zbarví do tmavě růžova až červeně. Respiračně deficitní kvasinky však toto barvivo neredukují a zachovávají si svou původní barvu.

Před nanesením na plotny byly kultury sériově naředěny na vhodnou koncentraci mikroorganismů, cca 100 buněk/ 0,2 ml. Plotny YPD pak byly inkubovány přibližně 3 dny při 21 °C, dokud nebyly kolonie kvasinek viditelné v aerobním prostředí. Každá plotna pak byla převrstvena 20 ml TTC agarů o teplotě 50 °C. TTC agar byl připraven po ochlazení jednotlivých roztoků na 50 °C smísením 1:1 roztoku A (12,6 g/l NaH_2PO_4 , 11,6 g/l Na_2HPO_4 , 30,0 g/l agaru v dH_2O , autoklávováno při 121 °C 15 min) s roztokem B (2,0 g/12,3,5–trifenylnitrazoliumchloridu v dH_2O , autoklávováno při 121 °C 15 min). Plotny byly odečítány po 3 h inkubace při teplotě místnosti. Procento RD bylo uvedeno jako procento nezbarvených kolonií z celkového pozorovaného počtu.

4.8. Skanovací elektronová mikroskopie (SEM) kvasinek imobilizovaných v kappa–karagenanových gelových perličkách

Kappa–karagenanové gelové perličky obsahující imobilizované kvasinky byly z bioreaktoru odebrány vzorkovacím otvorem a umístěny do skleněné lahvičky se šroubovacím uzávěrem o objemu 10 ml, přičemž perličky byly ponořeny v malém objemu fermentačního média. Lahvička byla okamžitě překryta ledem a přenesena v izolované nádobě do zařízení SEM. Kappa–karagenanové gelové perličky obsahující imobilizované kvasinky byly fixovány ve 2% (v/v) glutaraldehydu připraveném v Sorensenově fosfátovém pufru, 0,07 M, pH 6,8 (Hayat, 1972). Poté byla provedena post–fixace v 1% (w/v) oxidu osmičelém, připraveném ve stejném pufru, a dehydratace postupnou řadou alkoholických roztoků 50, 70, 80, 90, 95, 100 % (v/v), každý po dobu 15 min, a pak 3 výměny při 100 %. Před sušením v kritickém bodě (Ladd Research Industries, Burlington, VT) pomocí oxidu uhličitého byly některé perličky zmrazeny v kapalném dusíku, narušeny a shromážděny do 100% alkoholu. Narušení mrazem umožňuje expozici vnitřního povrchu perliček s minimální distorzí. Po sušení v kritickém bodě bylo na vzorky naneseno rozprašováním (rozprašovací zařízení Polaron SC500, Fison Instruments, England) 30 nm zlato/palladium a pak byly vzorky podrobeny skanování autoemisním skanovacím elektronovým mikroskopem Hitachi S–4500 (Nissei, Sangyo, Tokyo, Japonsko).

4.9. Protokol odebírání vzorků z bioreaktoru

Rezervoár vzorkovacího otvoru bioreaktoru (membránový vzorkovací ventil Scandi–Brew Type T) byl naplněn 70% (v/v) roztokem ethanolu pro zachování aseptických podmínek v okolí otvoru mezi odebíráním vzorků. Pro odběr vzorku byla předtím, než byl vzorkovací otvor otevřen, ze dna ethanolového rezervoáru vyjmuta zátko, rezervoár byl vypuštěn a důkladně propláchnut ethanolem. Vzorky byly shromažďovány do ampule se stisknutými konci nebo do nádoby se šroubovacím uzávěrem a objemy se pohybovaly od 5–60 ml v závislosti na požadované analýze. Pro testování na mikrobiologickou kontaminaci bylo 10 ml fermentační kapaliny vakuově přečerpáno přes sterilní filtrační jednotku. Membrána s velikostí pórů 0,45 μm byla umístěna do vhodného selekčního média, jak je popsáno v sekci 4.6.

Pro chemické analýzy bylo 60 ml vzorku odebráno přes septum ze 100ml ampulky se stisknutými konci a přefiltrováno přes dvouvrstvý jehlový filtrační systém Schleicher a Shull FP–050 s velikostí pórů 5 μm a 0,45 μm . Požadovaný objem vzorku byl pak umístěn do nádoby s horním objemem 20 ml, která byla uzavřena Teflonovým septem a aluminiovým uzávěrem. Potřebné objemy vzorků jsou uvedeny v tabulce 4.1.

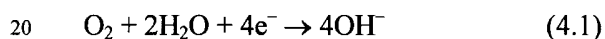
Tabulka 4.1. Požadavky na objem vzorků pro různé chemické analýzy.

Vzorek	Objem (ml)
ethanol	5
dioly s krátkým řetězcem	10
těkavý podíl piva	12
vicinální diketony	5
uhlohydráty/specifická hmotnost/	12
volný aminový dusík/proteiny	12

5 4.10. Měření rozpuštěného kyslíku

Analýzátor rozpuštěného kyslíku Dr. Thiediga Digox 5 měří rozpuštěný kyslík v rozmezí 0,001 až 19,99 mg/l ve sladině, kvasici zápaře a pivu (Anon, 1998). Vilachá a Uhlig (1985) testovali mnoho přístrojů pro měření rozpuštěného kyslíku v pivu a zjistili, že analyzátor Digox poskytuje 10 důvěryhodné a přesné hodnoty.

Elektrochemická metoda, používaná přístrojem Digox 5, je založena na ampérometrickém uspořádání tří elektrod s potenciometrem. Měřicí článek sestává z měřicí elektrody (katody) a protielektrody (anody). Tyto elektrody jsou vystaveny kapalině, v níž má být měřena koncentrace kyslíku. Po fixaci definovaného měřicího potenciálu dojde na měřicí elektrodě k reakci. Na velké 15 stříbrné měřicí elektrodě jsou molekuly kyslíku redukovány na hydroxylové ionty. Dvě molekuly vody reagují podle rovnice 4.1 s jednou molekulou kyslíku za pohlčení čtyř elektronů na čtyři hydroxylové ionty.



Anoda z nerezové oceli absorbuje čtyři elektrony uvolněné na katodě k zajištění toku proudu. Podle rovnice 4.2 je měřený proud I přímo úměrný koncentraci kyslíku $C_{\text{L},\text{O}}$:

$$25 \quad I = K \times C_{\text{L},\text{O}} \quad (4.2)$$

kde konstanta K je ovlivněna Faradayovou konstantou, počtem elektronů převedených na molekulu, povrchovou plochou katody a tloušťkou hraniční vrstvy na povrchu měřicí elektrody.

30 Konstantní charakteristický měřicí potenciál je kritický pro selektivitu (na kyslík) a přesnost měření. Měřicí napětí je stabilizováno referenční elektrodou, která není zatížena proudem. Tato elektroda, spolu s potenciometrem, který poskytuje elektronickou zpětnou vazbu, dodává konstantní měřicí potenciál. Povrch měřicí elektrody je elektrolyticky spojen s referenční elektrodou pomocí diafragmy.

35 Chyba, vztaženo na měřicí rozsah konečné koncentrace rozpuštěného kyslíku, byla $\pm 3 \%$ (Anon, 1998). Analyzátor rozpuštěného kyslíku byl kalibrován pomocí Thiedig Active Calibration, při které Digox 5 poskytl definované množství kyslíku podle Faradayova zákona (0,500 mg/l), které pak bylo křížově zkontrolováno s hodnotami naměřenými v matrici. Tak bylo možno přístroj 40 kalibrovat během 1 min za podmínek tlaku, teploty a toku, které odpovídají podmínkami měření. Protože výměna molekul v senzoru je difuzní proces, je ovlivněna teplotou, což vede k větším reakčním rychlostem a zvýšení měřeného proudu. Proto je zařízení Digox 5 rovněž vybaveno senzorem, který měří teplotu a provádí automatickou kompenzaci výchylek.

Zařízení Digox 5 má určité výhody oproti kyslíkovým senzorům na bázi membrán. Protože Digox nepoužívá elektrolyt, je ztráta citlivosti relativně pomalá a na měřicí elektrodě dochází pouze k drobným úsadám. Citlivost je také možno zjišťovat kdykoli provedením aktivní kalibrace. Jedná se o jednoduchý proces čištění elektrody a rekaliibrace přístroje. U většiny membránových senzorů se na katodě usazuje chlorid stříbrný a roztok elektrolytu se mění, což vede k postupně nižším odečítaným hodnotám. Proto se doporučuje membrány a elektrolyty každých několik týdnů měnit a pak rekalibrovat, což je zdlouhavá a obtížná práce. Kalibrace membránových senzorů se obvykle provádí v laboratoři při hladině nasycení kyslíkem, což může způsobit nezanedbatelné chyby, zejména v matici sladiny a piva při velmi nízké hladině kyslíku. Teplota má na membránové kyslíkové senzory trojí vliv: mění se propustnost membrány, mění se parciální tlak kyslíku a mění se rozpustnost kyslíku v elektrolytu. Tepelná kompenzace těchto tří faktorů je u membránových senzorů obtížná.

Měření rozpuštěného kyslíku ve sladince během skladování: Ohebná trubka potravinářské kvality Tygon® (vnitřní průměr 1/4") byla asepticky napojena na vzorkovací otvor umístěný v blízkosti vrcholu kuželové základny skladovacích tanků sladiny T-1 a T-2 (viz sekci 4.2.1). Peristaltické čerpadlo s proměnlivou rychlostí poskytovalo objemový průtok 11 l/h blokem analyzátoru rozpuštěného kyslíku ((Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50)). Měření rozpuštěného kyslíku ve sladince pak byla zaznamenávána po 4 až 5 minutách.

Měření rozpuštěného kyslíku v bioreaktoru: Před provedením měření rozpuštěného kyslíku v bioreaktoru byl blok analyzátoru Digox 5 dezinfikován. Vstup senzoru byl napojen na sterilní trubku potravinářské kvality Tygon® (vnitřní průměr 1/4"). Do analyzátoru byl po dobu 15 min čerpán 70% (v/v) roztok ethanolu s objemovým průtokem přibližně 10 l/h. Analyzátor rozpuštěného kyslíku byl napojen na laboratorní rozvod vody a minimálně 2 h byla do senzoru pouštěna horká voda (70 °C). Tato metoda byla použita místo sterilizace párou, protože materiály bloku analyzátoru nesnášejí teplotu nad 70 °C. Po dvouhodinové dezinfekci bylo potrubí na vstupu i výstupu zaškrceno, aby byla uvnitř analyzátoru zachována sterilita. V digestoři s laminárním prouděním bylo na vstup a výstup analyzátoru napojeno čerstvě sterilizované potrubí. Volné konce potrubí byly asepticky upnuty na vstupy na hlavě bioreaktoru z nerezové oceli o vnitřním průměru 1/4" a byla prováděna měření. Když nebyly vstupy na bioreaktoru používány, byly uzavřeny krátkým úsekem sterilizované potravinářského potrubí Tygon®.

Rozpuštěný kyslík byl v bioreaktoru s plynovým výtahem měřen on-line odebráním kapaliny z fermentace výstupem umístěným v hlavě bioreaktoru. Fermentační kapalina opouštěla bioreaktor přes nerezový filtr (viz sekci 4.1.2), napojený na nerezovou trubku o průměru 1/4", která zasahovala do hlavy bioreaktoru. Kapalina pak proudila ohebnou potravinářskou trubkou Tygon® (vnitřní průměr 1/4"), která byla napojena na peristaltické čerpadlo s proměnlivou rychlostí (Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer cat. #P-07523-50), poskytující objemový průtok 11 l/h blokem analyzátoru rozpuštěného kyslíku. Fermentační kapalina pak byla recyklována druhým čtvrtalcovým nerezovým vstupem, který zasahoval do hlavy bioreaktoru. K napojení senzoru na bioreaktor bylo použito potrubí potravinářské kvality Tygon® (Cole-Parmer, 1999) pro svou dodavatelem specifikovanou nízkou propustnost pro kyslík $30 \text{ cm}^3 \text{ mm}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cmHg}) \times 10^{-10}$. Měření bylo prováděno po 4 až 5 minutách oběhu.

4.11. Chemické analýzy

Kalibrace byly prováděny s použitím příslušných standardních činidel. Všechna činidla používaná pro analýzu měla čistou >99 %. V případě potřeby bylo provedeno další přechištění destilací.

4.11.1. Ethanol

Koncentrace ethanolu byla stanovena s použitím metody plynového chromatografu s vnitřním standardem (GC) podle Technical Committee a Editorial Committee společnosti American Society of Brewing Chemists (1992). Odplyněné vzorky byly přímo ošetřeny isopropanolem jako vnitřním standardem, 50 (v/v), a nastříknuty do plynového chromatografu Perkin Elmer 8500,

vybaveného plamenovým ionizačním detektorem (FID) a automatickým vzorkovačem Dynatech. Byla použita kolona Chromosorb 102, 80 až 100 mesh s héliem jako nosným plynem. Podmínky chromatografie: průtok 20 ml/min, teplota injektoru 175 °C, teplota detektoru 250 °C a teplota kolony 185 °C.

5

4.11.2. Souhrnný přehled uhlohydrátů

Koncentrace glukózy, fruktózy, maltózy, DP3 (maltotrióza), DP4 (maltotetróza), poly-1 (poly-sacharidový pík 1) a glycerolu ve fermentačních vzorcích byly kvantifikovány pomocí vysoko-
účinného kapalinového chromatografu (HPLC). Spectra-Physics (SP8100XR), vybaveného kati-
ontovými měnami kolonou (Bio-Rad Aminex, HPX-87K) a detektorem indexu lomu (Spectra-
Physics, SP6040XR). Mobilní fázi tvořil 0,01 M monohydrofosforečnan draselný a systém byl
vybaven automatickým vzorkovačem Spectra-Physics (SP8110). Zařízení pracovalo s proti-
tlakem 800 psi. Průtok vzorku a eluentu kolonou byl 0,6 ml/min, teplota kolony 85 °C a teplota
detektoru 40 °C. Objem nástriku byl 10 µl.

15

4.11.3. Specifická hmotnost

Specifická hmotnost sladiny a fermentačního média je v této studii uváděna prostřednictvím sku-
tečného extraktu (stupně Plato, °P), což je uznávaná jednotka používaná v pivovarnickém prů-
myslu.

20

Fermentační vzorky byly přefiltrovány, jak je popsáno v sekci 4.8, a promíchány, načež byla
prováděna analýza digitalizovaným měřičem hustoty (densitometr Anton Parr DMA-58) pro
zjištění specifické hmotnosti sladiny (stupeň Plato). Fermentační vzorky byly vloženy do skleně-
né trubice tvaru U, která elektronicky oscilovala, a tak byla stanovena specifická hmotnost, ne-
přímou poskytující stupeň Plato.

25

Stupně Plato označují číselnou hodnotu procenta (w/v) roztoku sacharózy ve vodě při 20 °C,
jehož specifická hmotnost je stejná jako u měřené sladiny. Protože škála stupňů Plato a výsledné
tabulky, týkající se specifické hmotnosti roztoku ke koncentracím solutu jsou založeny na vod-
ném roztoku sacharózy, jedná se pouze o aproximaci množství extraktu. Extrakt je termín ozna-
čující celkovou disponibilní rozpustnou hmotu v kvasicím materiálu „jako takovou“ a/nebo po-
tenciálně po zpracování (Hardwick, 1995), jako uhlohydráty, proteiny, taniny. Extrakt se v pivo-
varnickém průmyslu dosud vyjadřuje jako specifická hmotnost ve stupních Plato, protože chybí
vhodnější označení, lépe vyjadřující variabilitu složení sladiny různého původu.

35

4.11.4. Celkový diacetyl

Celkový diacetyl (2,3-butandion) v pivu a fermentačních vzorcích byl měřen s použitím techniky
horního odběru vzorků analytu s následným dělením kapilární GC (Hewlett-Packard 5890) a
detekcí elektronového zachytu (ECD), založené na metodě Technical Committee a Editorial
Committee společnosti American Society of Brewing Chemists (1992). Metoda se vztahuje k
„celkovému diacetylu“, protože měří množství diacetylu i jeho prekursoru, alfa-acetolaktátu.
Nosným plynem byl 5% methan v argonu s průtokem 1,0 ml/min a byla použita kolona J & W
DB-Wax. Poměr štěpení byl 2:1 a pomocným plynem bylo hélium s průtokem 60 ml/min. Teplota
injektoru byla 105 °C a teplota detektoru 120 °C.

45

Systém byl vybaven horním automatickým vzorkovačem Hewlett Packard 7694E a jako vnitřní
standard byl použit 2,3-hexandion. Doba cyklu vzorku byla 40 min, s dobou ekvilibrace lahvičky
30 min při 65 °C, dobou natlakování 2 min při 4,8 psig, dobou plnění smyčky 0,2 min, dobou
ekvilibrace smyčky 0,1 min, a dobou nástriku 0,27 min. Tlak nosiče byl 18,8 psig, teplota postu-
pové linky 95 °C a teplota smyčky 65 °C.

50

4.11.5. Těkavý podíl piva

5 Těkavý podíl piva, zahrnující acetaldehyd, ethylacetát, isobutanol, 1-propanol, isoamylacetát, isoamylalkohol, ethylhexanoát a ethyloktanoát, byl měřen metodou GC (Hewlett Packard 5890) s použitím vnitřního standardu (n-butanol) a plamenového ionizačního detektoru (FID). Nosným plynem bylo hélium s průtokem 6,0 ml/min a GC byla vybavena horním automatickým vzorkovačem Hewlett Packard 7694.

10 Teplota injektoru GC byla 200 °C a teplota detektoru 220 °C. Teplotní profil píčky: 40 °C (5 min), 40 až 200 °C (10 °C/min), 200 až 220 °C (50 °C/min), 220 °C (5 min). Plyny FID zahrnovaly nosný plyn s průtokem 6,0 ml/min, dodatek hélium 30 ml/min a 28 psig, H₂ 50 ml/min a 25 psig a vzduch 300 ml/min a 35 psig.

15 Septum bylo proplachováno s průtokem 0,8 ml/min. Tlak v hlavě byl 4,0 psig. Když byl na nástřikový otvor napojen automatický vzorkovač, byl tlak v lahvičce 15,9 psig, tlak nosiče 7,1 psig, hlavový tlak v koloně 4 psig, průtok odštěpeného proudu 18 ml/min a průtok v koloně 6 ml/min. Teploty zón: lahvička 70 °C, smyčka 80 °C, přenosová linka 150 °C.

20 Doba cyklu GC byla 40 min, s dobou ekvilibrace lahvičky 35 min, dobou natlakování 0,25 min, dobou plnění smyčky 0,1 min, dobou ekvilibrace smyčky 0,1 min, dobou nástřiku 3 min a objemem smyčky vzorku 1 ml.

4.11.6. Volný aminový dusík (FAN)

25 Ke stanovení koncentrace volného aminového dusíku ve fermentačním vzorku byla použita mezinárodní metoda pro volný aminový dusík podle Technical Committee a Editorial Committee společnosti American Society of Brewing Chemists (1992), s použitím spektrofotometru Perkin Elmer LS50B. Tato spektrofotometrická metoda zobrazuje barevnou reakci mezi ninhydrinem a dusíkem přítomným ve vzorku. Velikost absorbance se přímo vztahuje k množství přítomného volného aminového dusíku.

35 a) Barevné činidlo: 19,83 g hydrogenfosforečnanu disodného (Na₂HPO₄)
30,00 dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄)
2,78 g ninhydrid monohydrát
1,50 g fruktóza

b) Ředidlo: 2,00 g jodičnan draselný (KIO₃)
596 ml destilovaná, deionizovaná voda
404 ml 95% (v/v) ethanol

40 Uchováváno v chladničce a používáno za teploty místnosti.

c) Zásobní roztok glycinu: 0,1072 g/100 ml destilované deionizované vody

45 d) Standardní roztok glycinu: zásobní roztok byl zředěn 1:100 (v/v) destilovanou, deionizovanou vodou. Tento standard obsahuje 2 mg/l FAN.

50 Vzorky byly zředěny destilovanou vodou v poměru 100:1 a do každé ze 3 zkumavek byly nality 2 ml naředěného vzorku. Slepý pokus byl připraven nalitím 2 ml destilované deionizované vody do každé ze 3 zkumavek. Byly rovněž připraveny tři zkumavky, obsahující každá 2 ml standardního roztoku glycinu.

Ke všem vzorkům byl přidán 1 ml barevného činidla a byly vloženy na přesně 16 min do vodní lázně o teplotě 100 °C. Pak byly zkumavky 20 min chlazeny ve vodní lázni o teplotě 20 °C. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 5 ml ředidla a důkladně promícháno. Vzorky pak byly pone-

cháno 10 až 15 min stát. Poté byla spektrofotometrem měřena absorbance při 570 nm a množství FAN ve vzorku bylo vypočteno podle rovnice 4,3.

$$\text{FAN (mg/L)} = (A_P - A_B - A_F) 2d / A_S \quad (4.3)$$

kde FAN je množství volného aminového dusíku ve vzorku v mg/l, A_P je průměr absorbancí zkoušených roztoků, A_B je průměr absorbancí po slepé pokusy, A_F je průměr absorbancí pro korekci na tmavé sladiny a piva, 2 je množství FAN ve standardním roztoku glycinu, d je faktor ředění vzorku a A_S je průměr absorbancí pro standardní roztok glycinu.

Kapitola 5. Kontinuální fermentace s použitím systému bioreaktoru s plynovým výtahem

Pro kontinuální fermentaci byl zvolen systém bioreaktoru s plynovým výtahem pro své publikované výborné charakteristiky přenosu hmoty (kapalina-pevná látka) a míchání. Přenos hmoty kapalina-pevná látka je zvlášť důležitý, protože zahrnuje přenos živin z kapalné fáze do pevného biokatalyzátoru s imobilizovanými kvasinkami, který poskytuje substrát pro enkapsulované kvasinky. Tyto reaktory také mají dobré provzdušnění, nižší spotřebu energie a jednoduchou konstrukci. Tím jsou bioreaktory s plynovým výtahem velmi atraktivní pro operace ve velkém měřítku, jako například pro průmyslové zpracování odpadních vod (Driessen et al., 1997; Heijnen, 1993).

5.1. Popis bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou

Tato sekce uvádí podrobný popis bioreaktoru s plynovým výtahem, použitého v této práci.

5.1.1. Těleso bioreaktoru

Bioreaktor s plynovým výtahem a sací trubicou o objemu 13 l (pracovní objem 8 l), navržený pro tuto práci, byl tvořen trojfázovým fluidním ložem (kapalina/pevná látka/plyn), kde byly imobilizované kvasinky udržovány v suspenzi vnitřní cirkulací kapaliny, poháněnou plynným oxidem uhličitým (Heijnen, 1996), jak je znázorněno na obr. 16. Fotografie nádoby bioreaktoru je na obr. 17 a podrobný náčrt s rozměry na obr. 18. Oxid uhličitý a vzduch proudí do spodního kužele bioreaktoru z probublávací trubky ze sintrované nerezové oceli (tryska pro CO_2 , část #9222, Hagedorn & Gannon, USA) o délce 0,11 m a vnějším průměru 0,013 m. Oxid uhličitý byl použit jako fluidizační plyn a vzduch k dodávání kyslíku kvasinkám.

Sací trubka, umístěná ve válcovém bioreaktoru soustředně, fungovala v tomto systému fluidního lože jako stoupací trubka, zatímco vnější prstenec sloužil jako klesací trubka. Vnitřní sací trubka byla zavěšena z cylindrického odlučovače částic, usazeného na třech výstupních z nerezové oceli v rozšířené hlavové části bioreaktoru. Umístění armatur sací trubky a odlučovače částic uvnitř bioreaktoru minimalizovalo riziko mikrobiální kontaminace z vnějšího prostředí.

Původně měl bioreaktor síto k oddělování imobilizovaných kvasinek od kapaliny na výstupu. Síto však bylo náchylné k ucpávání, takže byl použit válec z nerezové oceli, který odděloval perličky imobilizovaných kvasinek od kapalné fáze, když procházely přes vrchol sací trubky a protékaly prstencem dolů. Místo aby opouštěly bioreaktor jako přepad, narážely částice do válce a spadávaly do kapalné fáze. Tak vznikala malá oblast blízko výstupu z bioreaktoru, která byla prostá imobilizovaných kvasinek. Rozšířená hlavová oblast bioreaktoru také zvětšovala plochu povrchu pro odpoutání bublin plynu.

5.1.2. Víko bioreaktoru

Na obr. 19 je uveden schematický náčrt víka bioreaktoru. Otvory víka byly udržovány na minimu, aby se minimalizovalo nebezpečí kontaminace. Otvory byly buď přímo navaženy na víko, nebo byly použity tlakové armatury (Swagelok®). Víko bylo opatřeno inokulačním otvorem, tep-

loměrnou jímkou, teploměrem, septem pro odběr vzorků plynu a vstupy a výstupy pro kapalinu pro měření rozpuštěného kyslíku. Do teplosměrné jímky bylo vloženo teplotní čidlo, které bylo napojeno na systém regulace teploty. Regulátor teploty ovládal solenoidový ventil, který otevíral a uzavíral přívod glykolu do tepelného pláště bioreaktoru. Teplota byla monitorována pomocí
 5 teploměru (vodovzdorný termočlánekový teploměr Cole–Parmer Waterproof, #90610–20) a sondy typu T, která byla navařena do víka bioreaktoru. Rozpuštěný kyslík byl měřen pomocí analyzátoru rozpuštěného kyslíku (Dr. Theidig, Digox 5), který pro přesné odečítání kyslíku vyžadoval průtok 9 až 11 l/h kapalného média blokem analyzátoru. Kapalina pro měření kyslíku se z bioreaktoru odváděla trubkou o vnitřním průměru $\frac{1}{4}$, která procházela víkem do fermentační kapali-
 10 ny. Jak je znázorněno na obr. 20, byl vrchol trubky opatřen filtrem pro odstraňování větších částic z kapaliny při jejím čerpání skrze analyzátor rozpuštěného kyslíku. Kapalina pak byla do bioreaktoru vracena jiným $\frac{1}{4}$ '' otvorem ve víku.

5.1.3. Sanitární ventily pro aseptický odběr vzorků

15 Bioreaktor byl vybaven membránovým vzorkovacím ventilem (Scandi–Brew[®]), navařeným do stěny bioreaktoru. Ventil byl určen pro odběr vzorků za aseptických podmínek. Membrána těsnila přímo proti fermentační kapalině, díky čemuž byl ventil plně sterilizovatelný párou a alkoholem prostřednictvím dvou výstupů (obr. 18). Membrána byla obklopena malým vnějším rezervoárem
 20 ethanolu pro uchování sterility mezi odběry. Tento ventil byl používán pro všechny odběry vzorků v bioreaktoru a bylo předpokládáno, že složení kapaliny v bodě odběru vzorků nebylo významně odlišné od kapaliny opouštějící výstup z reaktoru. Jak je zmíněno v této práci v kapitole Materiály a metody, byl odběr vzorků z bioreaktoru prováděn z ventilu umístěného na vnější stěně bioreaktoru. Pro potvrzení předpokladu, že složení kapaliny vystupující z výstupu bioreak-
 25 toru je stejné jako u kapaliny odebrané z tělesa bioreaktoru, byly provedeny studie doby míchání.

Ke stanovení doby míchání v bioreaktoru s plynovým výtahem byla použita metoda detektoru pulsů (Chistie, 1989). Do prstence bioreaktoru byl rychle nastříknut 1 ml 10 N HCl a změna pH byla logaritmována v čase s časem $t = 0$ s v okamžiku nástřiku. Hodnota pH se nástřikem 10 N
 30 NaOH vrátila na původní hodnotu. pH elektroda (Cole–Parmer, cat. #P–05990–90) měla délku 277 mm a průměr 3,5 mm. K monitorování pH byl použit snímač pH Ingold Model 2300. Dvou-bodová kalibrace pH byla provedena pomocí certifikovaných standardních pufrů, Beckmanova zeleného pufru o pH 7,0, Part #566002 a Beckmanova červeného pufru o pH 4,0, Part #566000. Data byla logaritmována s frekvencí 3750 Hz po dobu 300 s s použitím programu, který sestrojili
 35 Cheryl Hudson a John Beltrano v r. 1994 a modifikoval Norm Mensour v r. 199 (University of Western Ontario, London, Ontario).

pH data pak byla vyvážena s použitím algoritmu Savitsky–Golay v TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Guelph, Ontario). Algoritmus Savitzky–Golay je metoda vyva-
 40 žování čas–doména, založená na bikvadratickém polynomiálním proložení nejmenších čtverců v pohyblivém okně podél dat pH (Anon, 1996). Vyvážená data pak byla normalizována a byla sestrojena závislost ΔpH na čase. Doba míchání byla brána na nejbližší minutu, když pH dosáhlo cca 95% rovnovážné hodnoty. Doba míchání byla měřena s použitím tří různých objemových průtoků oxidu uhličitého: 283 cm³/min, 472 cm³/min (objemový průtok používaný v celé této
 45 práci) a 661 cm³/min. Ve všech třech případech se pH v bioreaktoru vyrovnalo (na cca 95 %) za méně než 2 minuty, jak je zřejmé z přílohy 1. Doba míchání byla považována za dostatečně krátkou pro potvrzení našeho původního předpokladu, že bioreaktor je dobře míchán. To nám umožnilo předpokládat, že složení kapaliny, odebrané ze stěny bioreaktoru není významně odlišné od kapaliny, které odtéká na výstupu s průměrnou dobou zdržení v bioreaktoru 24 h. Z připojených
 50 obrázků je vidět určitá recirkulace kapaliny, vznikající navíc mícháním dispergací, která je typická pro bioreaktory s plynovým výtahem (Chisti, 1989).

5.2. Proudové schéma systému kontinuální fermentace piva

Proudové schéma systému kontinuální fermentace piva, který byl umístěn v pilotním mikropivovaru Labatt Brewing Company Limited, London, Ontario, je znázorněno na obr. 21 s podobným popisem součástí v tabulce 5.1. Sladina byla získána ze závodu Labatt v městě London, sterilizována vbleskovém pastéru (deskový tepelný výměník Fisher s kombinovaným tokem typ Eurocal 5FH), a skladována ve velkých tancích (T-1 a T-2). Během kontinuální fermentace byla sladina převáděna s kontrolovaným průtokem do bioreaktoru s plynovým výtahem (BR-1), obsahujícího imobilizované kvasinky. Fermentovaná kapalina opouštěla bioreaktor jako přepad a byla jímána do sběrné nádrže (T-3). V následující sekci je podrobně popsán provoz systému kontinuální fermentace znázorněného na obr. 21.

5.2.1. Odběr a skladování sladiny

Neokysličený sladina pro kontinuální fermentaci byla odebírána potrubím z londonského závodu Labatt do 1600l cylindrokónického skladovacího tanku, předem propláchnutého oxidem uhličitým pro minimalizaci příjmu kyslíku sladinou. Všechny tanky tohoto měřítka, včetně uchovávacích tanků na sladinu T-1 a T-2, byly před použitím dezinfikovány podle nejlepší praxe firmy Labatt. Sladina pak byla podrobena bleskové pasterizaci a při 2 °C převedena do volného uchovávacího tanku T-1 nebo T-2 (také předem propláchnutého oxidem uhličitým). Sladina byla v těchto tancích při 2 °C uchovávána až 2 týdny a dodávala kapalinu do kontinuálně fermentačního bioreaktoru BR-1. Po skončení dvoutýdenní doby byl vstup suroviny do bioreaktoru přepnut, takže sladina byla dodávána z druhého uchovávacího tanku, který obsahoval čerstvou sladinu. Byly použity dva identické uchovávací tanky, T-1 a T-2, aby se minimalizovala čekací doba během přepínání na čerstvou sladinu. Ve všech případech byla sladina minimálně 2 dny před zavedením do bioreaktoru (BR-1) testována na kontaminaci. Jestliže byla sladina kontaminována, byla zničena a okamžitě byla odebrána a pasterizována čerstvá sladina.

Minimalizace koncentrace rozpuštěného kyslíku ve sladině během skladování: Cílem bylo skladovat sladinu s minimem kyslíku s konstantní hladinou a při nízké teplotě bez zmrazování sladinu. To bylo potřebné k zamezení nežádoucího zvětrávání sladinu v důsledku chemických reakcí s kyslíkem (Narziß et al., 1993), k poskytování konzistentní dodávky sladinu do bioreaktoru a k minimalizaci nebezpečí kontaminace sladinu mikroby během skladování. Velké 1600l (čistý objem) cylindrokónické nádoby (T-1 a T-2), používané pro uchovávání sladinu pro kontinuální fermentaci, byly původně navrženy jako vsázkové fermentory, nikoli uchovávací tanky na sladinu. Proto nebylo chlazení těchto nádob adekvátní pro uchovávání sladinu při 2 °C. Po třech dnech uchovávání sladinu se teplota od jedné oblasti tanku k druhé měnila až o 15 °C (tabulka 5.2).

Tyto teplé oblasti v tancích zvyšovaly nebezpečí růstu mikrobů. Proto bylo nutno tyto tanky nějak míchat, aby se všude zajistila rovnoměrně nízká teplota.

Z těchto důvodů byl do základového kužele každého uchovávacího tanku na sladinu (T-1 a T-2) umístěn trubkový rozdělovač. Byly prováděny experimenty pro nalezení nejlepšího postupu pro plnění tanků sladinou a udržování konstantní nízké hladiny rozpuštěného kyslíku. V prvním experimentu byl uchovávací tank naplněn sladinou, která byla odebrána bez okysličení a bleskově pasterizována. Jakmile byl uchovávací tank naplněn 1600 l sladinu, bylo do základny tanku vpouštěno 0,113 m³/h oxidu uhličitého. Během druhého experimentu byla sladina opět odebrána bez okysličení a bleskově pasterizována. Tentokrát byl ale tank proplachován oxidem uhličitým (0,85 m³/h) 3 hodiny před naplněním a malé množství oxidu uhličitého (0,113 m³/h) bylo do uchovávací nádoby kontinuálně přiváděno současně s převáděním sladinu do tanku. Tento malý průtok oxidu uhličitého byl kontinuálně probubláván sladinou, uchovávanou v tanku, během jejího dodávání do kontinuální fermentace. V obou experimentech byla během týdně skladování pravidelně monitorována koncentrace kyslíku rozpuštěného ve sladině.

Na obr. 5.7 je vynesena koncentrace rozpuštěného kyslíku proti sobě skladování sladin. Když nebyl uchovávácí tank předem propláchnut oxidem uhličitým, vzduch v hlavovém prostoru umožnil určité zachycení kyslíku ve sladině. Bez předchozího propláchnutí tanku tak trvalo významně déle, než koncentrace rozpuštěného kyslíku ve sladině dosáhla minimální a konstantní hladiny. Když byl tank předem propláchnut, zůstala koncentrace rozpuštěného kyslíku ve sladině po celou dobu skladování na konstantní úrovni. Proto bylo předběžné proplachování skladovacích tanků sladin (T-1 a T-2) a pokračování v přívodu malého množství oxidu uhličitého během skladování sladin k udržení mírného přetlaku v tancích přijato jako součást procedury uchovávání sladin při všech kontinuálních fermentacích.

Byl rovněž srovnán teplotní profil v uchovávacích nádobách s proplachem a bez proplachu 0,113 m³/h oxidu uhličitého. Místo se sladinou byl tento experiment prováděn s vodou s použitím teplotní sondy typu T napojené na teploměr (vodovzdorný termočlánekový teploměr Cole-Parmer, kat #90610-20). Do uchovávací nádrže na sladinu byla nabrána vodovodní voda (1600 l) a tři dny ekvilibrována a byla zaznamenávána teplota vody v různých oblastech tanku. Pak byla voda v tanku 24 h proplachována 0,113 m³/h oxidu uhličitého a opět byla zaznamenána teplota. V každém případě byla zaznamenána teplota okolí a požadovaná teplota v uchovávací nádrži byla 2 °C.

Jak je patrné z tabulky 5.2, při probublávání oxidem uhličitým byla teplota v uchovávacích tancích rovnoměrnější, v měřených oblastech ležela mezi 0,1 až 4,1 °C a obsah nádrží nezamrzal. Tato nižší teplota pomáhala zabránit nežádoucímu růstu mikrobů ve sladině během skladování.

Plyn byl z uchovávacích tanků na sladinu vypouštěn přes sterilní plynový filtr, umístěný na vrchu tanku. Sladina pak byla odváděna pomocí peristaltického čerpadla s proměnlivou rychlostí (P-1) (Masterflex[®] L/S[™] Digital Standard Drive, Cole-Parmer kat. #P-07523-50) do vstupu do 8l bioreaktoru (BR-1) s použitím ohebného potrubí potravinářské kvality Norprene[®] L/S 16.

5.2.2. Kontinuální fermentace s použitím systému bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou

Sladina byla do bioreaktoru BR-1 zaváděna v blízkosti spodního kužele čtvrtpalcovým vstupem. Směs filtračně sterilizovaného (filtrační jednotka Millipore, Millex[®]-FG₅₀) vzduchu a oxidu uhličitého (čistota 99,99 %) byla do reaktoru přiváděna rozdělovačem ze sintrované nerezové oceli. Ke kontrole průtoku oxidu uhličitého na STP byl použit rotometr (R-3) a ke kontrole průtoku vzduchu na STP byl použit předem kalibrovaný hmotový průtokoměr (M-1). Fermentovaná kapalina odcházela z bioreaktoru jako přepad trubicou z vytuženého PVC s vnitřním průměrem 1" do 30 l sběrné nádoby z nerezové oceli (T-3), která byla chlazena vnější glykolovou spirálou a udržována na teplotě 4 °C.

5.2.3. Jímání produktu

Nádoba na jímání produktu (T-3) měla velký vstupní otvor (vnitřní průměr 1"), který byl konstruován tak, že fermentovaná kapalina tekla sběrnou nádobou dolů, aby se minimalizovalo přenění. Tato nádoba byla také opatřena sterilním plynovým filtrem (filtrační jednotka Millipore, Millex[®]-FG₅₀, 0,2 μm) pro vypouštění plynu z bioreaktoru (BR-1) a sběrnou nádobou (T-3). Sběrná nádoba se periodicky vyprazdňovala pomocí 1/4" ventilu (V-12), umístěnou 2" nad základnou tanku.

5.2.4. Glykolová chladicí smyčka

Glykol byl z londýnského pivovaru do pilotního mikropivovaru přepravován při teplotě -23 °C a tlaku 310 kPa (45 psig) a obíhal v chladicích pláštích uchovávacích tanků na sladinu (T-1 a T-2),

bioreaktoru s plynovým výtahem (BR-1) a sběrné nádoby produktu (T-3). Oba uchovávací tanky na sladinu a bioreaktor byly vybaveny teplotními sondami pro kapalnou fázi, které udávaly hodnoty regulátorům teploty, které pak regulovaly průtok chlazeného glykolu do plášťů nádob. Uchovávací tanky na sladinu uchovávaly sladinu při 2 °C, zatímco teplota v bioreaktoru byla udržována na 12 až 22 °C, v závislosti na konkrétním experimentu. Sběrná nádoba produktu neměla automatickou regulaci teploty, ale průtok glykolu byl regulován manuálně tak, aby udržoval teplotu nádoby na přibližně 4 °C. Teplotu sběrné nádoby produktu (T-3) nebylo nutno přesně regulovat, protože kapalina v této nádobě se pouze vypouštěla do odpadu a nebyla dále analyzována nebo zpracovávána.

Glykol byl používán také k opláštěvání a chlazení dopravních linek sladiny z tanků sladiny (T-1 a T-2) do bioreaktoru (BR-1). Poté, co glykol cirkuloval v daném plášti, byl vrácen do hlavního potrubí v pilotním mikropivovaru a pak vrácen do závodu v městě London, obvykle při teplotě -15 °C a tlaku 275,8 kPa (40 psig).

5.3. Protokol sterilizace bioreaktoru

Bioreaktor (BR-1) byl naplněn 2% (v/v) roztokem Diversol® CX/A (DiverseyLever, Kanada), což je desinfekční detergent, a ponechán přes noc napuštěný s proplachováním plynem. Pak byl reaktor vypuštěn a vypláchnut studenou vodou. Tento cyklus čistícího roztoku a vyplachování vodou se dvakrát opakoval. Za účelem přípravy bioreaktoru na parní sterilizaci byla odpojena potrubí sladiny a plynu. K bioreaktoru bylo připojeno potrubí páry a byly otevřeny tyto ventily: vstupní a čistící ventil bioreaktoru (V-7, V-6), ventil vstupu plynu (V-17), ventily výstupu produktu (V-9, V-11), membránové vzorkovací ventily (V-8, V-10), a vypouštěcí výstup sběrné nádoby (V12). Pak byl pomalu otevřen parní ventil zařízení a ventily bioreaktoru byly nastaveny tak, aby na výstupu z každého vnějšího otvoru byl pozorován pramének páry. Po 60 minutách expozice párou byly uzavřeny všechny vnější ventily na bioreaktoru (V-17, V-8, V-10, V-12) kromě přepouštěcího ventilu sladiny (V-6). Po uzavření parního ventilu byl přepouštěcí ventil sladiny uzavřen a ke sběrné nádobě byl připojen sterilní filtr, aby se zabránilo kontaminaci nesterilním vzduchem, vstupujícím do systému při chlazení. Po uzavření parního potrubí zařízení bylo rovněž napojeno plynové potrubí reaktoru na V-17 za účelem udržení přetlaku během chlazení.

5.4. Nastartování fermentačního systému

Pivovarská sladina byla ze zařízení odebírána do 20l nerezové tlakové nádoby a zahřívána 45 min v autoklávu na 100 °C. Do vychlazené sladiny byly asepticky přeneseny imobilizované kvasinky (40 % v/v). Těsně uzavřená nádoba byla dopravena do pilotního zařízení mikropivovaru, kde byl umístěn systém bioreaktoru. Pak byla tato 20l nádoba napojena na rychloupínací armaturu (Cornelius Anoka, MN, USA), která byla uchycena na 3/8" potrubí z vyztuženého PVC (Cole-Parmer, USA). Druhý konec PVC potrubí byl napojen na membránový vzorkovací ventil (V-8) ve stěně bioreaktoru. Do 20l nádoby byl přiváděn filtračně sterilizovaný oxid uhličitý v množství 10 psig a membránový vzorkovací vstup byl otevřen pro přenesení imobilizované směsi kvasinek z nádoby do bioreaktoru, aniž by se inokulum vystavilo okolnímu vzduchu. Vnitřní součásti „rychloupínacích“ armatur 20l nádoby byly odstraněny, aby nedošlo k ucpání imobilizovanými kvasinkami při přenosu do bioreaktoru. Kumulativní distribuce velikosti částic (podsítné) kappa-karagenanových gelových perliček je znázorněna na obr. 5.8. Aritmetický střední průměr částic, D_{pam} , byl vypočten jako 1,252 mm a Sauterův střední průměr částic, D_{psm} , byl 1,17 mm. Střední průměr částic byl 1,255 mm. Experimentální data a střední průměr částic jsou udány v příloze 1.

Po inokulaci imobilizovanými kvasinkami běžel bioreaktor vsázkovým způsobem, do doby, než koncentrace cukrů a diacetylu dosáhly požadovaných hodnot méně než 3 °Pluto, pokud jde o specifickou hmotnost, a méně než 100 µg/l diacetylu. Pak byl systém připraven pro kontinuální provoz. Pro propláchnutí přenosového potrubí sladiny horkou vodou a jeho parní sterilizaci byly otevřeny ventily V-2 (nebo V-4 pro T-2), V-5 a V-6, zatímco V-1 (nebo V-3 nebo T-2) a V-7

byly uzavřeny, a tak bylo potrubí sladiny izolováno. Přenosové potrubí sladiny bylo propláchnuto horkou vodou o teplotě přibližně 80 °C, která byla dodávána přes V-2 (nebo V-4 pro T-2). Po skončení cyklu proplachu horkou vodou bylo na stejné místo napojeno parní potrubí zařízení a přenosové potrubí sladiny bylo minimálně 30 min sterilizováno párou. Ve stejném okamžiku, kdy bylo uzavřeno parní potrubí, byl také uzavřen přepouštěcí ventil (V-6). Jakmile systém vyhladl, byl uzavřen V-2 (nebo V-4 pro T-2) a bylo odpojeno parní potrubí. Byl otevřen ventil tanku sladiny, V-1 (nebo V-3 pro T-2) a přepouštěcí ventil (V-6) a bylo nastartováno čerpadlo sladiny (P-1). Sladina byla přepouštěcím ventilem (V-6) odváděna do kanalizace, dokud nebyl kondenzát v potrubí nahrazen čerstvou studenou sladinou. V tomto okamžiku byl uzavřen přepouštěcí ventil a vstupní ventil do reaktoru (V-6) na reaktoru byl otevřen, a tak byl zahájen proces kontinuální fermentace.

Každé dva týdny se tank, který dodával sladinu, vyměnil mezi oběma uchovávacími tanky (T-1 a T-2). Po dvou týdnech dodávky sladiny z T-1 bylo zastaveno spojitě dávkovací čerpadlo P1 a uzavřen ventil (V-5) na vstupu do bioreaktoru. Přenosové potrubí sladiny bylo pak napojeno na druhý uchovávací tank (T-2) a propláchnuto a sterilizováno způsobem popsáním v předchozím odstavci. Kontinuální fermentace pak pokračovalo po pouze krátké odstávce méně než 1 h.

Tabulka 5.1. Podrobný popis součástí pro proudové schéma na obr. 5.6; PTFE - polytetrafluorethylen; SS – nerezová ocel.

Položka	Popis	Velikost	Složení materiálu
BR-1	Bioreaktor	8 l netto	316 SS
T-1	Uchovávací tank na sladinu	1600 l netto	316 SS
T-2	Uchovávací tank na sladinu	1600 l netto	316 SS
T-3	Skladovací tank na pivo	30 l netto	316 SS
P-1	Čerpadlo (peristaltické, proměnná rychlost) pro přenos sladiny z T-1 do BR-1	<0,08 l/min	válečky SS na flexibilním potravinářském potrubí Norprene®
F-1	Filtr pro plyn na výstupu T-1	<4 bar	polyprop., PTFE membrána 0,2 µm
F-2	Filtr pro plyn na vstupu T-1	<2 bar	polyprop., PTFE membrána 0,2 µm
F-3	Filtr pro plyn na výstupu T-2	<4 bar	polyprop., PTFE membrána 0,2 µm
F-4	Filtr pro plyn na vstupu T-2	<2 bar	polyprop., PTFE membrána 0,2 µm
F-5	Filtr pro plyn na vstupu BR-1	<2 bar	polyprop., PTFE membrána 0,2 µm
F-6	Filtr pro plyn na výstupu T-3	<2 bar	polyprop., PTFE membrána 0,2 µm
M-1	Regulace hmotnostního průtoku pro vzduch do BR-1	<500 sccm	316 SS, nylon, "O"-kroužky Viton®

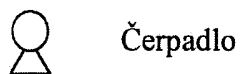
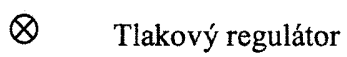
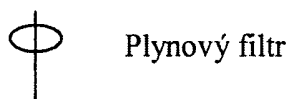
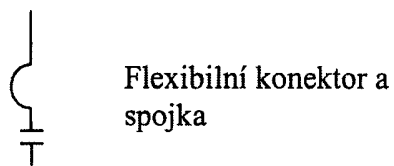
Položka	Popis	Velikost	Složení materiálu
R-1	Rotametr pro oxid uhličitý do T-1	<10 scfh	316 SS, akrylový blok
R-2	Rotametr pro oxid uhličitý do T-2	<10 scfh	316 SS, akrylový blok
R-3	Rotametr pro oxid uhličitý do BR-1	<2.5 scfh	316 SS, akrylový blok
PR-1	Tlakový regulátor pro oxid uhličitý do T-1 & T-2	<100 psi	316 SS
PR-2	Tlakový regulátor pro oxid uhličitý do BR-1	<100 psi	316 SS
PR-3	Tlakový regulátor pro vzduch do BR-1	<100 psi	316 SS
V-1	Ventil (křídlový) pro sladinu v T-1	1"	316 SS, sedlo Viton®
V-2	Ventil (křídlový) pro sladinu v CIP smyčce v T-1	1"	316 SS, sedlo Viton®
V-3	Ventil (křídlový) pro sladinu v T-2	1"	316 SS, sedlo Viton®
V-4	Ventil (křídlový) pro sladinu v CIP smyčce v T-2	1"	316 SS, sedlo Viton®

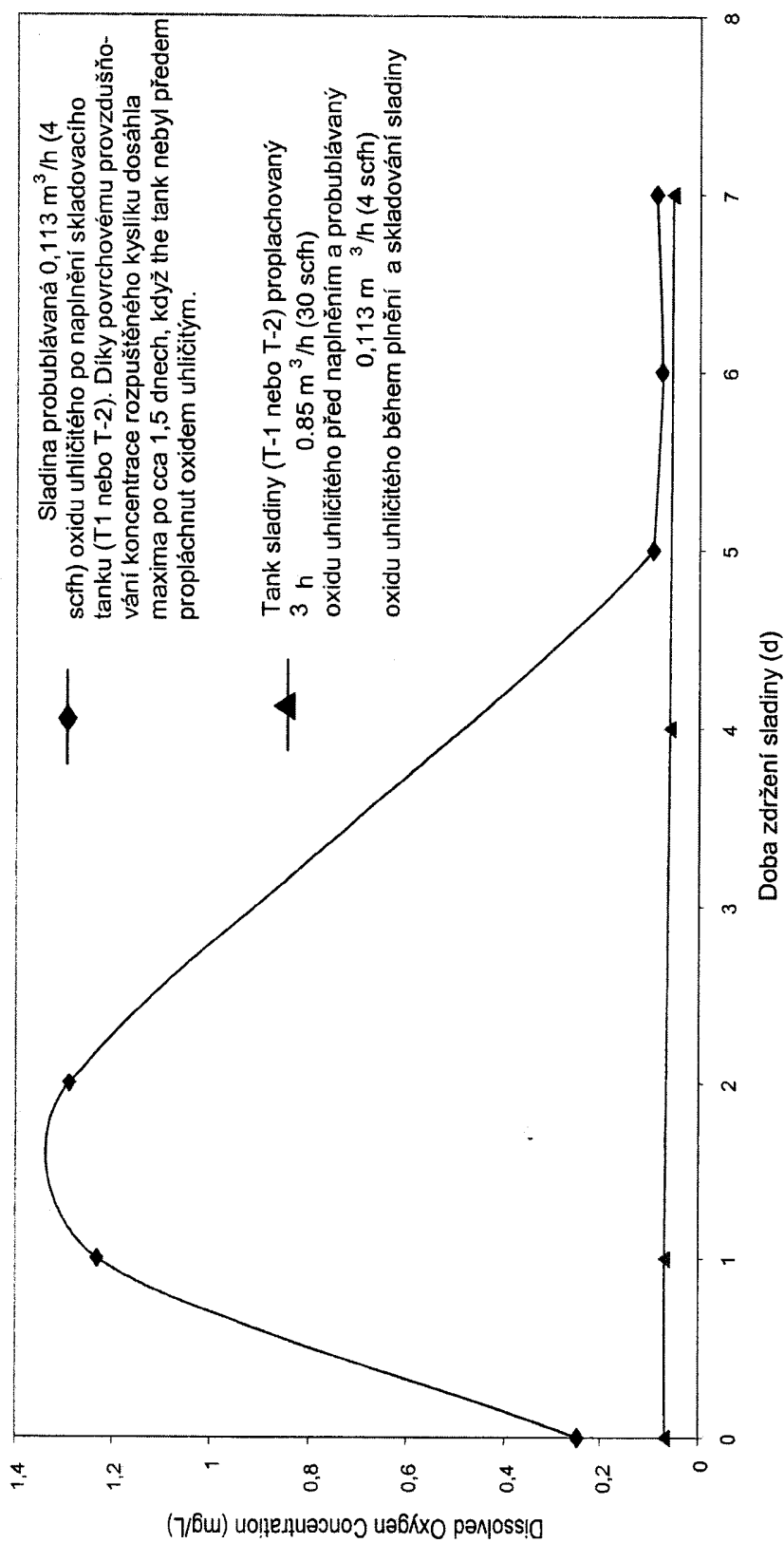
Tabulka 5.1 (pokračování). Detailní popis součástí pro proudové schéma na obr. 21.

Položka	Popis	Velikost	Složení materiálu
V-5	Ventil (kuličkový) pro sladinu u sběrače	1/4"	316 SS, silikonové sedlo
V-6	Ventil (kuličkový) pro obtok na vstupu sladiny do BR-1	1/4"	316 SS, silikonové sedlo
V-7	Ventil (kuličkový) pro vstup sladiny do BR-1	1/4"	316 SS, silikonové sedlo
V-8	Ventil (membránový vzorkovací) na stěně BR-1	12 mm	316 SS, silikonové sedlo
V-9	Ventil (křídlový) pro výstup piva z BR-1	1"	316 SS, vitonové sedlo
V-10	Ventil (membránový vzorkovací) pro výstup piva z BR-1	12 mm	316 SS, silikonové sedlo
V-11	Ventil (křídlový), sekundární, na výstupu piva z BR-1	1"	316 SS, vitonové sedlo
V-12	Ventil (kuličkový) pro vypouštění kapaliny z T-3	1/4"	316 SS, silikonové sedlo
V-13	Ventil (kuličkový) pro vedení oxidu uhličitého do T-1 & T-2	1/4"	316 SS, silikonové sedlo
V-14	Ventil (křídlový) pro vstup oxidu uhličitého do T-1	1/2"	316 SS, silikonové sedlo
V-15	Ventil (křídlový) pro vstup oxidu uhličitého do T-2	1/2"	316 SS, silikonové sedlo
V-16	Ventil (kuličkový) pro potrubí oxidu uhličitého do BR-1	1/4"	316 SS, silikonové sedlo

Položka	Popis	Velikost	Složení materiálu
V-17	Ventil (pojistný) pro vstup plynu do BR-1	1/4"	316 SS, silikonové sedlo
V-18	Ventil (kuličkový) pro vedení vzduchu do BR-1	1/4"	316 SS, silikonové sedlo

Symboły použité na obr. 21:

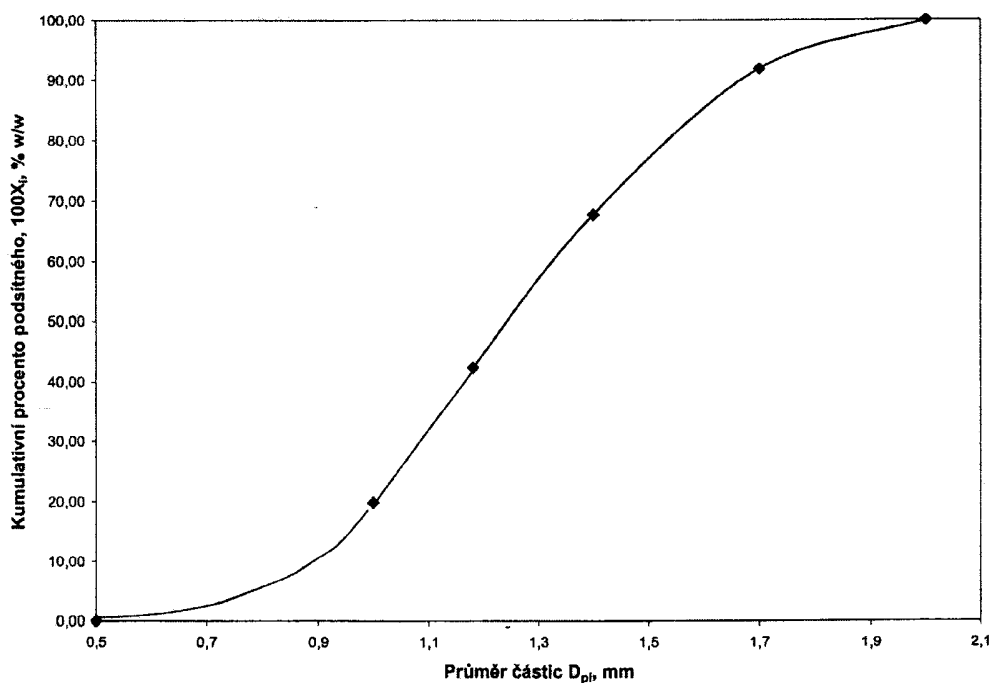




Obr. 5.7. Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve sladině v závislosti na době zdržení ve skladovací nádobě sladiny (T-1 nebo T-2) za různých podmínek plnění tanku.

Tabulka 5.2. Teplotní profil vody v uchovávací nádobě sladiny (T-1 nebo Z-2) po 3denní ekvilibraci bez probublávání oxidem uhličitým, a po 24 h probublávání oxidem uhličitým v množství $0,113 \text{ cm}^3/\text{h}$.

Místo měření v cylindrokónické nádobě	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	
	Bez	S probubláváním
	probublávání CO_2	CO_2
10 cm pod povrchem kapaliny a 10 cm od stěny nádoby	20,6	0,4
10 cm pod povrchem kapaliny a ve středu nádoby	20,1	0,1
na dně válcové sekce a 10 cm od stěny nádoby	3,8	3,7
na dně válcové sekce a ve středu nádoby	3,7	4,1
Okolí pilotního závodu	21,4	19,8



Obr. 5.8. Kumulativní distribuce velikosti částic kappa-karagenanových gelových perliček obsahujících imobilizované kvasinky (n = 5)

¹Kapitola 6. Imobilizace LEŽÁKOVÝCH KVASINEK v kappa–karagenanovém gelu

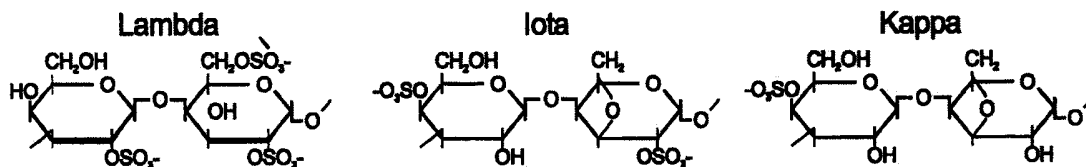
Vědci studovali různé matrice pro fyzikální zachycení celých buněk, včetně alginátu vápenatého (Bejar et al., 1992; Curin et al., 1987; Masschelein a Ramos–Jeunehomme, 1985; Nedovic et al., 1996; Shindo et al., 1994; White a Portno, 1978), agarózy (Hooijmans et al., 1990; Lundberg a Kuchel, 1997), a karagenanových gelů (Norton et al., 1995; Wang et al., 1982). Karagenan je materiál potravinářské čistoty a je favorizován pro enkapsulaci buněk pro svou vynikající mechanickou pevnost v porovnání s jinými gely (Büyükgüngör, 1992).

V první části této kapitoly byla během tří cyklů opakované vsázkové fermentace monitorována kolonizace kappa–karagenanových gelových perliček imobilizovanými kvasinkami. Byla zjišťována životnost imobilizovaných kvasinek a množství kvasinek uvolněných do kapalně fáze. V průběhu opakovaných vsázkových fermentací byly sledovány parametry fermentace, zahrnující ethanol, maltózu, maltotriózu, fruktózu a glukózu, a pak porovnávány s kontrolní fermentací používající pouze volně suspendované kvasinky za stejných nutričních podmínek.

Dosud existuje málo publikovaných informací ohledně fyzikálních účinků na kvasinky po dlouhodobé imobilizace (Virkajärvi a Kronlöf, 1998) a trvalém vystavení vnějšímu stresu a fermentačním produktům. Druhá část této kapitoly zkoumá životnost, distribuci populace kvasinek a fyzický vzhled kvasinek imobilizovaných v karagenanových gelových perličkách během delší doby kontinuální fermentace v bioreaktoru s plynovým výtahem. Po delší dobu byl také zkoumán relativní procentický podíl respiračně deficitních kvasinek v populaci imobilizovaných a volně suspendovaných kvasinek v bioreaktoru.

Karagenan je tvořen opakujícími se 3–6–anhydrogalaktózovými jednotkami a různé druhy karagenanů se liší počtem a polohou sulfátových esterových skupin na opakujících se galaktózových jednotkách. Schematické znázornění mechanismu gelace karagenanu je uvedeno na obr. 22. Pokud je karagenan ve stavu solu, mají jeho polysacharidové řetězce konfiguraci náhodné šroubovice. Když se vytvoří dost šroubovic, aby poskytly příčné vazby pro spojitou síť, dojde ke gelaci. S tím, jak vzniká více šroubovic nebo jak šroubovice tvoří agregáty, stává se gel pevnějším a tužším (Rees, 1972).

Tři obvyklé typy karagenanu jsou lambda, iota a kappa. Jak je uvedeno na obr. 6.2, liší se obsahem sulfátových esterů a množství sulfátových esterů ovlivňuje rozpustnost polysacharidového řetězce. Lambda–karagenan je vysoce sulfátovaný a nemá schopnost tvořit gel (Marrs, 1998). Iota–karagenan tvoří v přítomnosti vápenatých iontů vysoce elastický, slabý gel a nevykazuje významnou synerezi. Synereze vzniká, je-li tendence gelu dále tvořit šroubovice nebo agregáty tak silná, že se síť sráží a způsobuje „pocení“ kapaliny (Rees, 1972). Kappa–karagenan je mírně sulfátovaný, a tak tvoří v přítomnosti draslikových iontů silnější a tužší gel a podléhá určité synerezi. Zvýšená pevnost gelu, poskytovaná kappa–karagenanem, jej činí žádoucím pro imobilizaci celých kvasinek.



Obr. 6.2. Chemické struktury lambda–, iota– a kappa–karagenanu.

Významnou charakteristikou karagenanu jsou jeho reversibilní termogelační vlastnosti. Při chlazení roztoku karagenanu vzrůstá viskozita a dochází ke gelaci. Při zahřívání roztoku viskozita

¹Verze sekce 6.0 byla publikována (Pilkington et al., 1999)

klesá a karagenan se vrací zpět do stavu solu. Kontrolou složení gelujícího kationtového roztoku je možno měnit teplotu, při které se karagenan transformuje ze solu na gel. Gelační teplota kappa–karagenanu vzrůstá se vzrůstající koncentrací chloridu draselného v roztoku. Tento jev byl použit při vyvíjení postupu imobilizace buněk, protože je možno zamezit příkrému kolísání teploty (Neufeld et al., 1996). Gelační teplota karagenanu může být kontrolována tak, aby byla dost vysoká na to, aby byl za podmínek fermentace gelem, ale přitom dost nízká, aby mohly být kvasinky mícháány s karagenanem v jeho stavu solu bez nepříznivých účinků na životnost před gelací perliček.

Nicméně existuje řada faktorů, které ukazují na potřebu dalšího studia účinků imobilizace v gelových maticích na metabolismus a fyziologii kvasinek. Imobilizované kvasinky nejsou vystaveny stejnému mikroprostředí jako volné kvasinky v kapalně fázi, protože zde jsou další bariéry z gelové matrice a další zachycené kvasinky, které musejí být překonány, než může být substrát dopraven k jejich povrchu (obr. 23). Byly prováděny četné studie přenosu hmoty v gelových maticích (Etapé et al., 1992; Hannoun a Stephanopoulos, 1986; Korgel et al., 1992; Kurosawa et al., 1989; Merchant et al., 1987; Øyaas et al., 1995; Venâncio a Tiexiera, 1997) k dosažení lepšího pochopení potenciálních negativních účinků, která může mít omezení živin pro imobilizované buňky na průběh fermentace. Účinné difuzivity malých molekul v karagenanovém gelu jsou srovnatelné s difuzivitami stejných molekul v samotné vodě, a gel umožňuje molekulární difuzi malých molekul, jako je glukóza a ethanol. Avšak při typické fermentaci s imobilizovanými kvasinkami jsou živiny rychle dopravovány k perličkám s imobilizovanými kvasinkami kromě molekulární difuze hlavně konvekčním transportem (Hannoun a Stephanopoulos, 1986). Jakmile živiny vstoupí do perliček, je transport relativně pomalý, protože dominuje molekulární difuze. To znamená, že kvasinky na periférii gelových perliček mohou mít určitou nutriční výhodu oproti kvasinkám ve středu perliček.

Je nutno brát v úvahu rovněž stáří imobilizovaných kvasinek. Zachycené kvasinky stárnou, jak kontinuální fermentace probíhá po dobu měsíců, a fermentují za definované sady podmínek pseudo–ustáleného stavu. Avšak během vsázkové fermentace jsou kvasinky vystaveny prostředí, které se mění s časem, a kvasinky, než jsou zlikvidovány, se používají pouze po omezený počet fermentací. Je proto třeba dalšího výzkumu ke studiu dlouhodobých účinků kontinuální fermentace na životnost kvasinek ve vztahu k výkonu fermentace.

V části A této kapitoly byla zkoumána kinetika kolonizace kappa–karagenanových gelových perliček kvasinkami během tří cyklů opakované vsázkové fermentace. Byla sledována životnost a koncentrace imobilizovaných a volně suspendovaných kvasinek, spolu s ethanolem, stupni Plato a koncentrací cukru.

V části B byly zkoumány účinky doby fermentace na polohu a distribuci kvasinek v gelové perličce a na morfologii kvasinek. Byla použita elektronová mikroskopie (SEM) ke zkoumání kappa–karagenanem imobilizovaný kvasinek v různých oblastech gelové perličky ve čtyřech různých časech: 1) bezprostředně po vytvoření perličky; 2) po dvou dnech vsázkové fermentace; 3) po dvou měsících kontinuální fermentace v pilotním bioreaktoru s plynovým výtahem; 4) po šesti měsících kontinuální fermentace v pilotním bioreaktoru s plynovým výtahem. Byla rovněž měřena životnost a koncentrace kvasinek, jak imobilizovaných, tak v kapalně fázi. Byl rovněž zkoumán relativní procentický podíl respiračně deficitních kvasinek (imobilizovaných a volných v kapalně fázi) po pěti měsících kontinuální deficitních kvasinek (imobilizovaných a volných v kapalně fázi) po pěti měsících kontinuální fermentace v bioreaktoru s plynovým výtahem a byl porovnán s procentickými podíly, zjišťovanými při tradiční vsázkové fermentaci piva. V celé studii byl používán produkční kmen ležákových kvasinek.

6.1. Experimentální postup

Produkce kappa–karagenanových gelových perliček: kappa–karagenanový gel X–0909 byl laskavým darem od Copenhagen Pectin A/S. Kappa–karagenanové gelové perličky, obsahující za-

chycené ležákové kvasinky, byly vyráběny procesem s použitím statického míchadla s počáteční zátěží kvasinek $2,6 \times 10^7$ buněk/ml gelu (patentová přihláška 2133789 (Neufeld et al., 1996) a průměrem perliček 0,5 až 2,0 mm.

5 *Fermentační prostředí:* Labatt Breweries of Canada dodaly pivovarskou sladinu o specifické hmotnosti 17,5 °P, podrobněji popsanou v sekci Materiály a metody.

Část A: Kinetika kvasinek imobilizovaných kappa–karagenanových gelových perličkách při opakovaných vsázkách

10 Fermentace byly prováděny ve 2 l Erlenmeyerových baňkách při 21 °C, s mícháním 150 min^{-1} . Náplň nosiče byla 40 % (v/v) imobilizovaných perliček v s kvasinkami a celkový fermentační objem byl 1 l. Každá fermentace trvala sedm dní. V R1 byly čerstvé perličky s imobilizovanými kvasinkami naočkovány do sladiny a po skončení fermentace byly tyto perličky odděleny od fermentované kapaliny průchodem sterilním nerezovým sítím (velikost ok 500 μm). Perličky pak
15 byly ve stejném poměru znovu naočkovány do čerstvé sterilní sladiny pro provedení druhé (R2) a pak třetí (R3) vsázkové fermentace. Odběr vzorků se prováděl při každé fermentaci první tři dny dvakrát denně a pak čtvrtý a pátý den jednou denně. Fermentace se prováděly duplicitně nebo triplicitně. Všechny fermentace byly prováděny s kontrolními fermentacemi s volně suspendovanými kvasinkami, které se prováděly za týchž podmínek kromě toho, že do fermentace byly na-
20 očkované pouze volné kvasinky v množství 4 g/l. Vzorky byly analyzovány na životnost a koncentraci imobilizovaných kvasinek a koncentraci uhlohydrátů a ethanolu v kapalně fázi.

Hodnoty výtěžku $Y_{P/S}$ produktu ethanolu ze substrátu celkové zkvasitelné glukózy byly pro tři imobilizované fermentační cykla a pro kontrolu s volnými kvasinkami vypočteny s použitím
25 rovnice 3.20. Pro všechny fermentace byl výtěžek počítán od zahájení fermentace do doby, kdy byla dokončena spotřeba maltózy.

Produktivita ethanolu V_{ethanol} , tj. množství ethanolu produkované na celkový pracovní objem bioreaktoru na jednotku doby fermentace, byla pro R1, R2, R3 a kontrolu s volnými kvasinkami
30 vypočtena s použitím rovnice 3.25 od zahájení fermentace do doby, kdy byla úplně spotřebována maltóza. V případě výtěžku a produkty ethanolu nebyl navzájem odlišen přínos imobilizovaných a volně suspendovaných kvasinek.

Lokální maximální specifická rychlost růstu μ_{max} a doba zdvojnásobení kvasinek byla vypočtena
35 pro zprůměrovanou kontrolu s volnými kvasinkami s použitím 3.3 a 3.4.

Část B: Životnost a morfologické charakteristiky imobilizovaných kvasinek při prodloužené době fermentace

40 *Podmínky vsázkové fermentace:* Vsázkové fermentace byly prováděny ve 2 l Erlenmeyerových baňkách při 21 °C, s mícháním 150 min^{-1} . Náplň nosiče byla 40 % (v/v) s celkovým objemem fermentace 1 l.

Podmínky kontinuální fermentace: Pro kontinuální fermentace byly použity bioreaktory s plynovým výtahem a sací trubicou pilotního měřítka. Všechna získaná data pocházela z bioreak-
45 toru s pracovním objemem 8 l, kromě snímků z elektronového skanovacího mikroskopu po 2 měsících, které byly získány z 50 l bioreaktoru s použitím stejného fermentačního prostředí a metody imobilizace. Perličky s imobilizovanými kvasinkami v množství 40 % (v/v) byly v bioreaktorech fluidizovány pomocí směsi vzduchu a oxidu uhličitého. Bioreaktory pracovaly za
50 různých podmínek s teplotou fermentace udržovanou na 12, 17 a 22 °C a dobou zdržení udržova-
nou mezi 0,9 a 1,8 dny. Během šestiměsíčního experimentu dosáhl bioreaktor s plynovým výtahem maximální koncentrace ethanolu 73 kg/m^3 s průměrnou koncentrací 58 kg/m^3 .

Mikrobiologické analýzy: Z kapalně fáze bioreaktoru s plynovým výtahem byly odebrány ale-
spoň jednou týdně vzorky pro testování na nečistoty, zahrnující divoké kvasinky, neležákové

kvasinky a aerobní a anaerobní bakterie kazící pivo. Po pěti měsících byly kvasinky v kapalně fázi duplicitně testovány na mutaci respiračního deficitu.

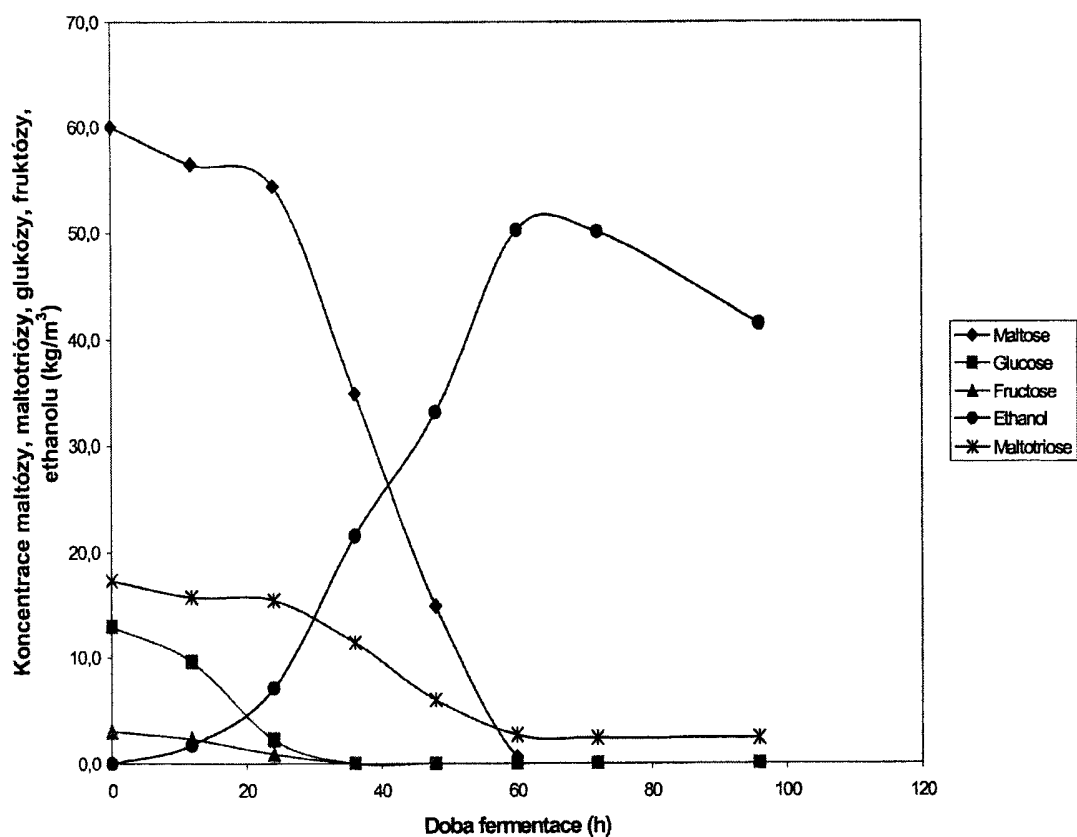
Skanovací elektronová mikroskopie (SEM): Kappa–karagenanové gelové perličky (průměr 1,0 až 1,5 mm), obsahující imobilizované ležákové kvasinky, byly pro SEM analýzu odebírány ve čtyřech různých časových bodech: 1) po vytvoření perliček s imobilizovanými kvasinkami a před jejich inokulací do fermentačního média; 2) po 2 dnech vsázkové fermentace; 3) po 2 měsících kontinuální fermentace v pilotním bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicí; 4) po 6 měsících kontinuální fermentace v pilotním bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicí. Metodika použitá pro SEM a související přípravu vzorků je popsána v sekci 4.7.

S použitím metod popsaných v sekci 4.6 byla současně se SEM zjišťována koncentrace a životnost kvasinek (imobilizovaných i volně suspendovaných).

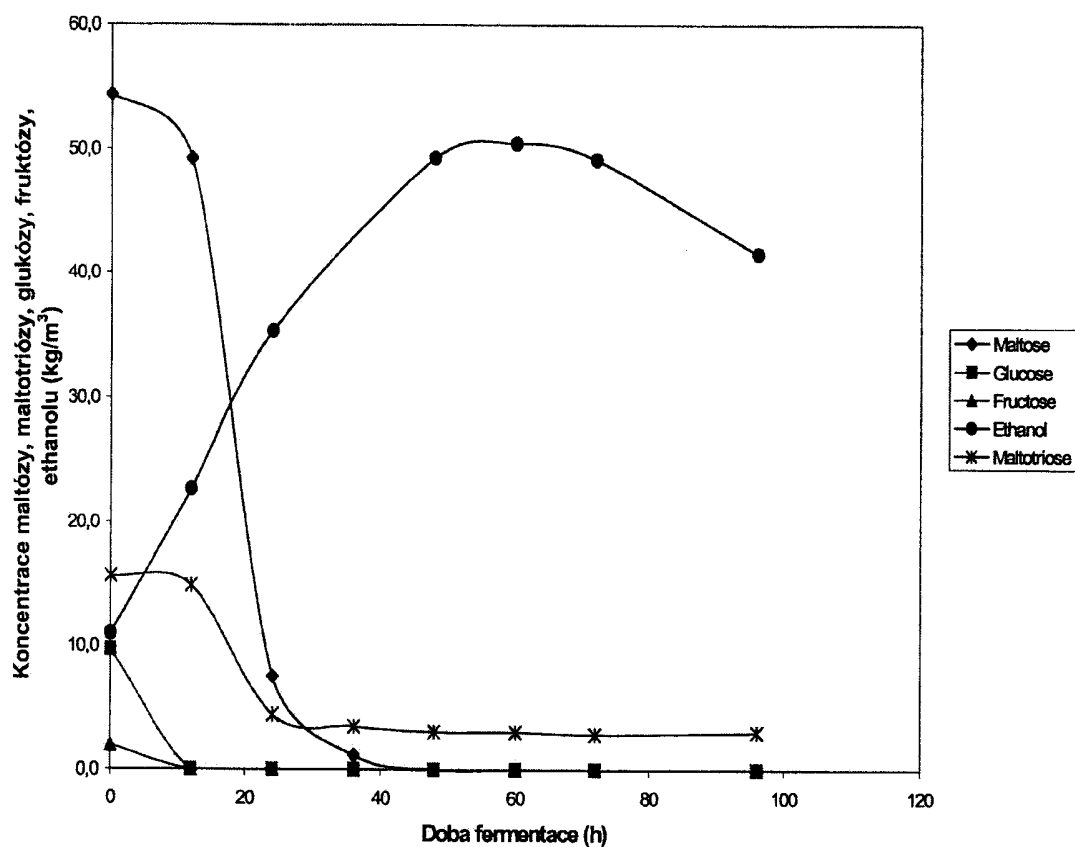
6.2. Výsledky a diskuse

Část A: Kinetika kvasinek imobilizovaných v kappa–karagenanových gelových perličkách v opakovaných vsázkách

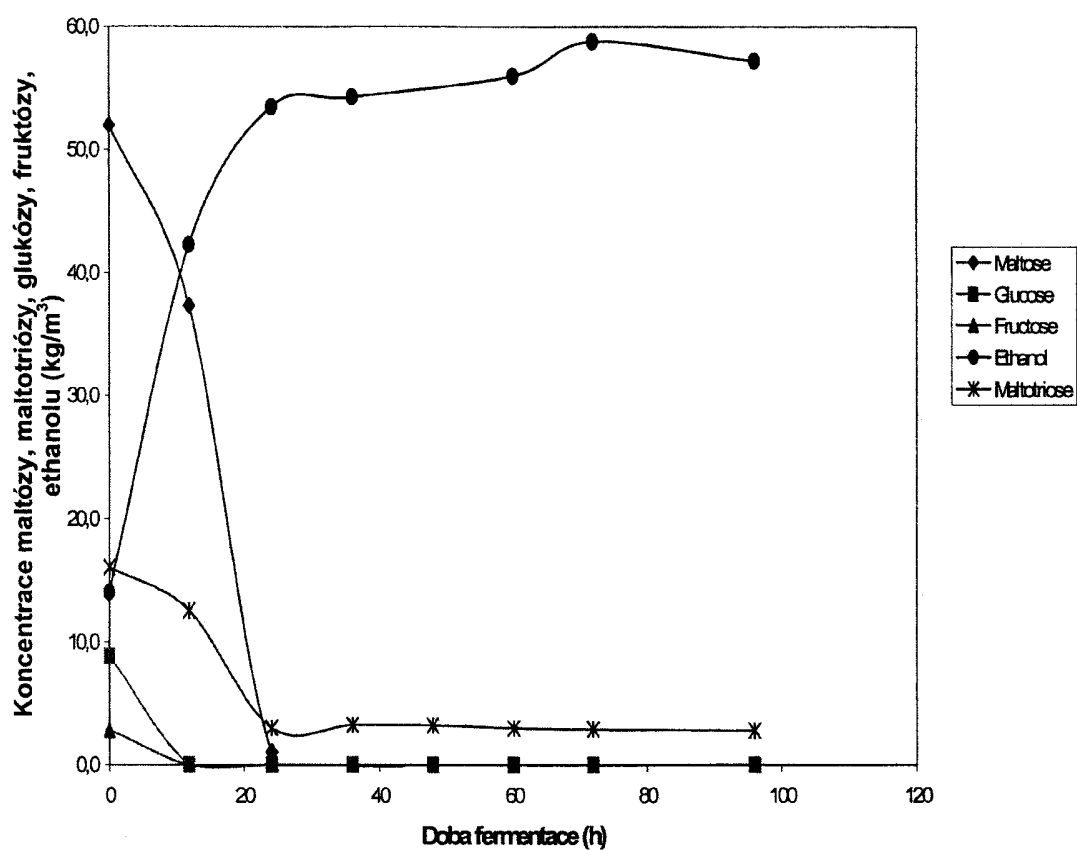
Doba fermentace se značně zkrátila pokaždé, když byly imobilizované kvasinky naočkovány do čerstvé sladiny, jak je patrné z obr. 6.4 (a), (b) a (c), znázorňujících maltózu, maltotriózu, glukózu, fruktózu a ethanol v závislosti na době fermentace pro tři cykly fermentace v opakovaných vsázkách. Z těchto obrázků je patrné, že doba úplné spotřeby cukrů byla pro R1 64 h, pro R2 44 h a pro R3 26 h. Při kontrolní fermentaci s volně suspendovanými kvasinkami, která neobsahovala imobilizované kvasinky, znázorněné na obr. 6.5, trvalo 82 h, než došlo k úplné spotřebě cukrů. Z grafu na obr. 6.4 je také patrné, že konečná koncentrace ethanolu byla nejvyšší při třetí z opakovaných vsázkových fermentací s imobilizovanými kvasinkami. Protože kappa–karagenan je hydro–gel, je určité množství ethanolu přenášeno v perličkách, když se očkují do čerstvé sladiny. Proto byl v čase nula pro R2 a R3 ve fermentační kapalině přítomen v určitém množství ethanol a počáteční koncentrace glukózy, maltózy, maltotriózy a fruktózy byla při fermentaci s imobilizovanými kvasinkami (obr. 6.4) nižší v porovnání s kontrolní fermentací s volnými kvasinkami, která je znázorněna na obr. 6.5. Byly vypočteny výtěžky fermentace tak, aby mohl být výtěžek v gramech ethanolu na gramy spotřebovaných cukrů zkoumán na srovnatelné bázi.



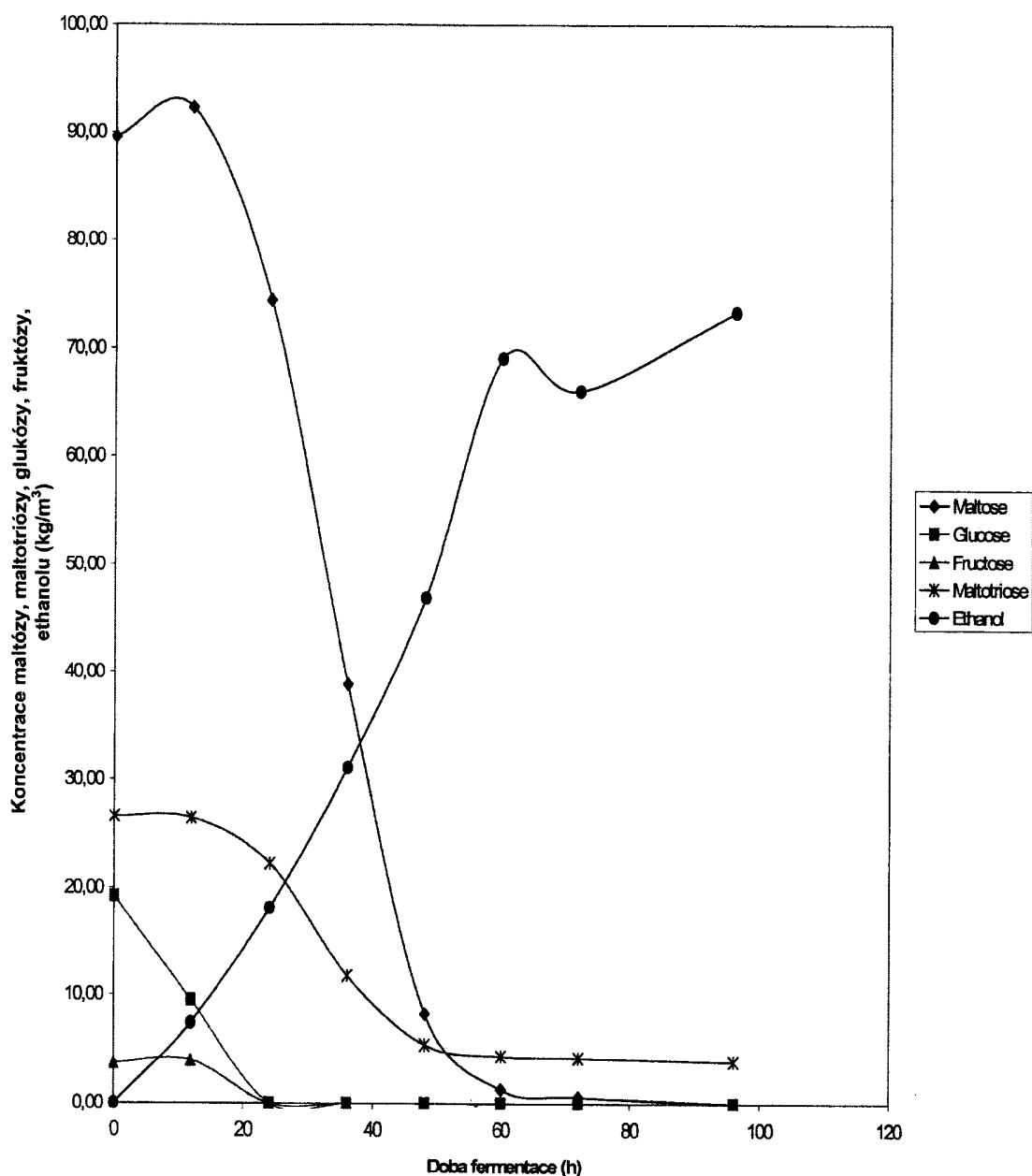
Obr. 6.4. a) R1, koncentrace maltózy, maltotriózy, glukózy, fruktózy a ethanolu v závislosti na době fermentace pro opakované vsázkové fermentace s použitím ležákových kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách.



Obr. 6.4. b) R2, koncentrace maltózy, maltotriózy, glukózy, fruktózy a ethanolu v závislosti na době fermentace pro opakované vsázkové fermentace s použitím ležákových kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách.

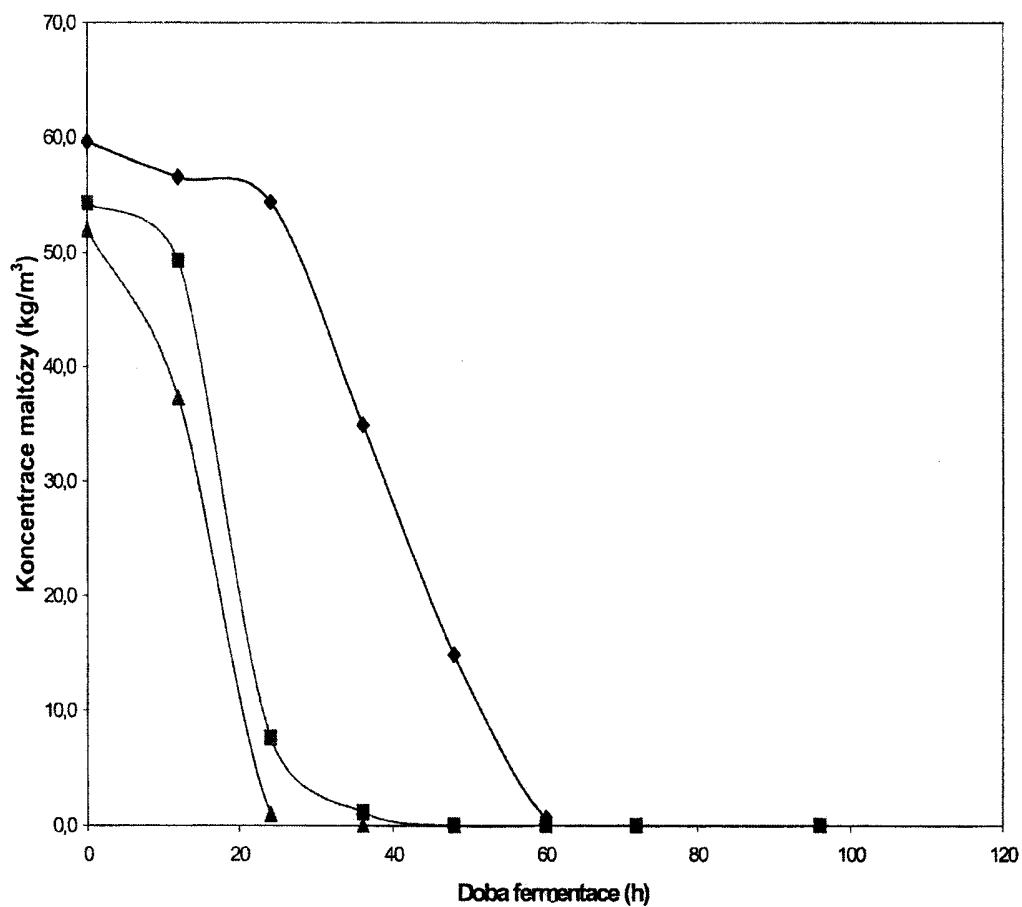


Obr. 6.4. c) R3, koncentrace maltózy, maltotriózy, glukózy, fruktózy a ethanolu v závislosti na době fermentace pro opakované vsázkové fermentace s použitím ležákových kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách.

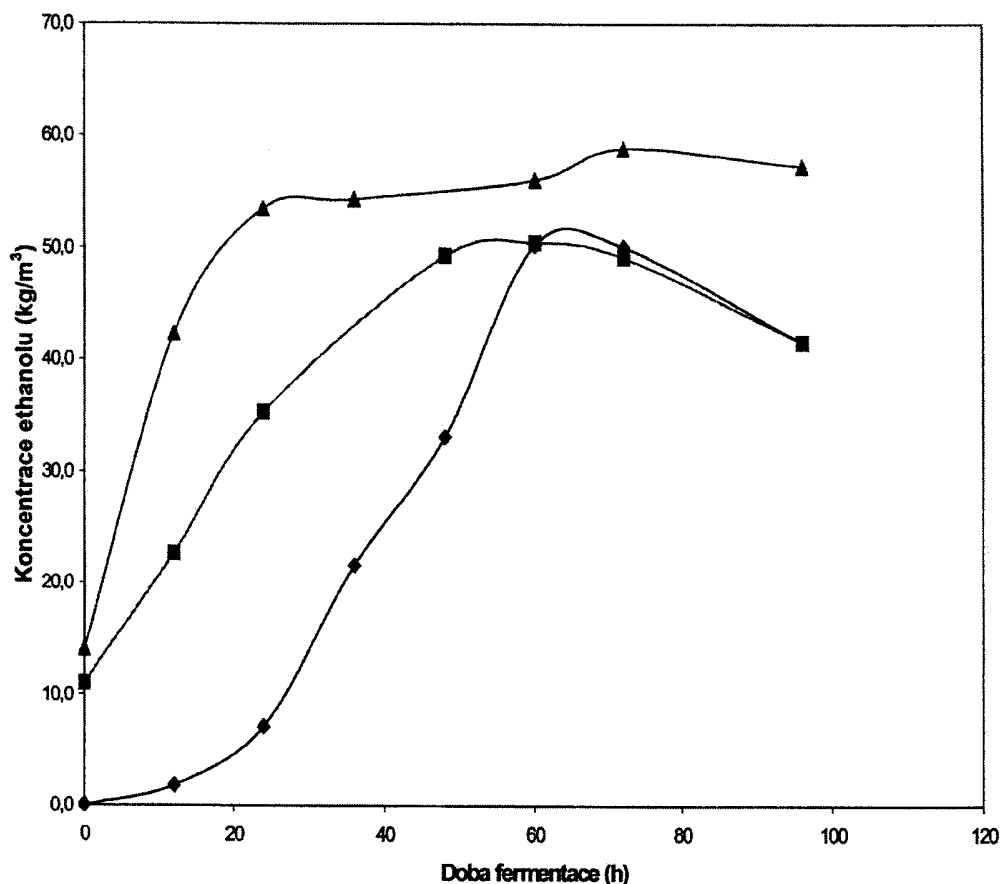


Obr. 6.5. Koncentrace maltózy, maltotriózy, glukózy, fruktózy a ethanolu v závislosti na době fermentace pro kontrolní fermentace s volně suspendovanými ležákovými kvasinkami (bez imobilizovaných kvasinek).

Obrázky 6.6 (a) a (b) porovnávají koncentraci maltózy, resp. ethanolu v závislosti na době fermentace pro R1, R2 a R3. Během opakované R1 byla maltóza kvasinkami spotřebována téměř bezprostředně po naočkování do čerstvé sladiny. Koncentrace ethanolu dosahovaly v opakované R1 dříve svých maxim a rovněž dosahovaly vyšších koncentrací než první dvě vsázkové fermentace. Jak je vidět z obr. 6.6 (b), počáteční zpoždění produkce ethanolu v R1 se drasticky snížilo, když byly tyto imobilizované kvasinky znovu naočkovány do R2, a dále se snížilo po naočkování do R3.

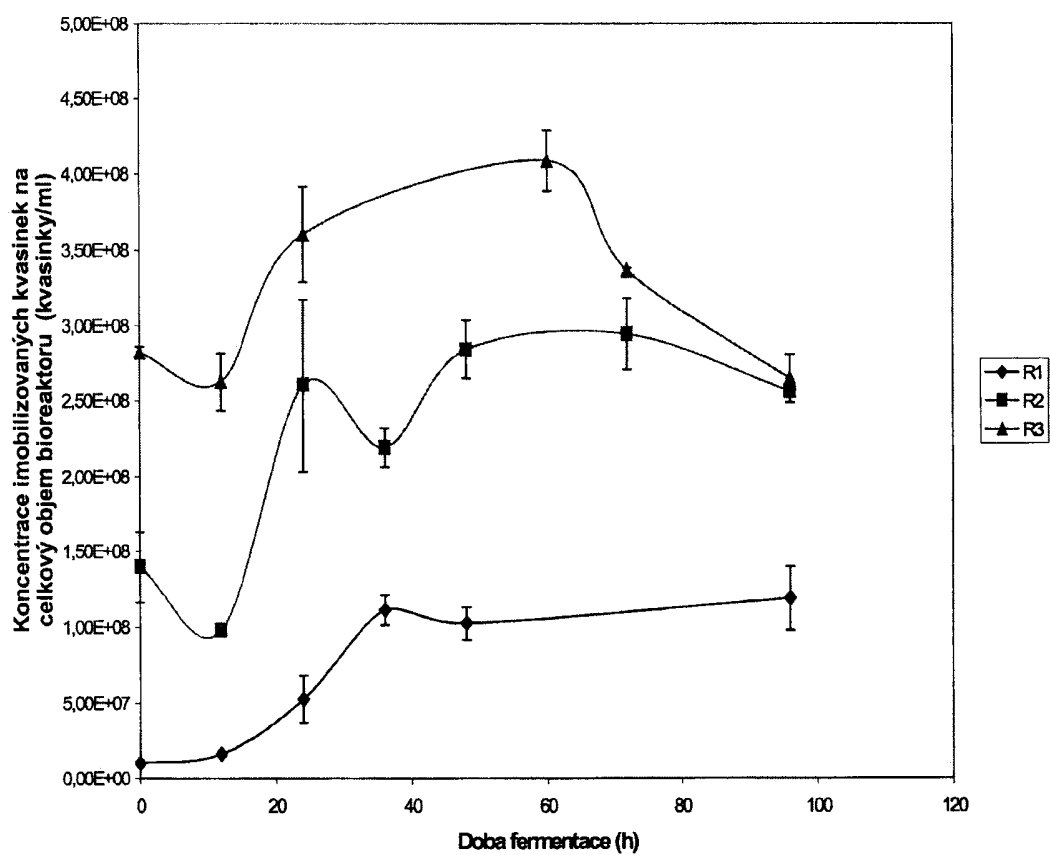


Obr. 6.6. a) Koncentrace maltózy v závislosti na době fermentace pro opakované vsázkové fermentace R1, R2 a R3 s použitím ležákových kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách.

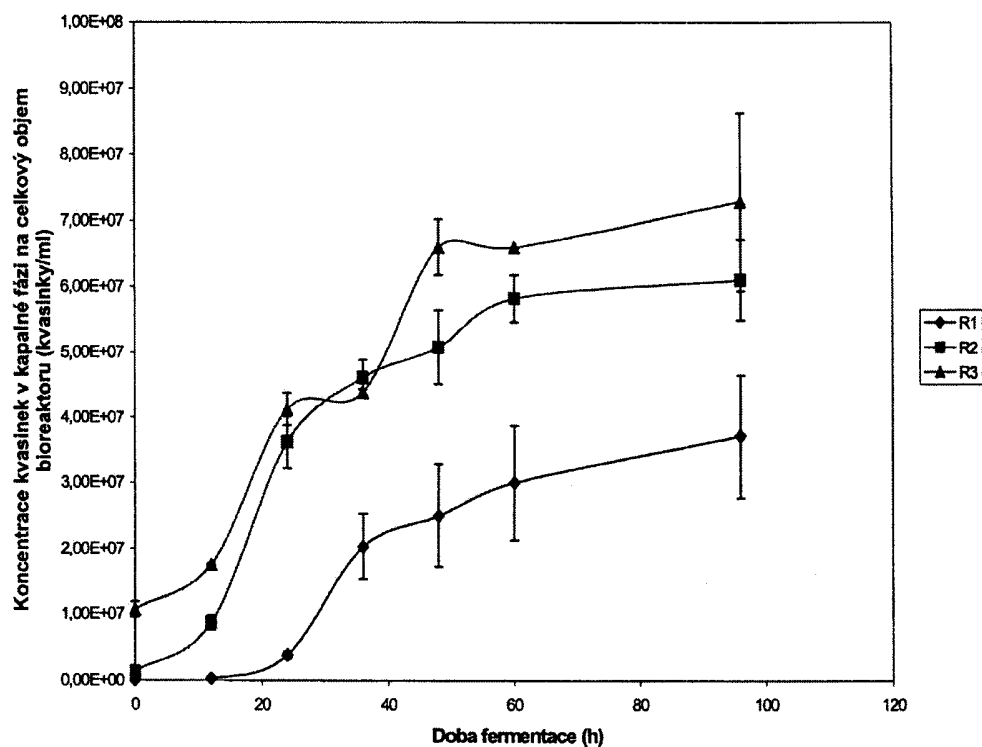


Obr. 6.6. b) Koncentrace ethanolu v závislosti na době fermentace pro opakované vsázkové fermentace R1, R2 a R3 s použitím ležákových kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách..

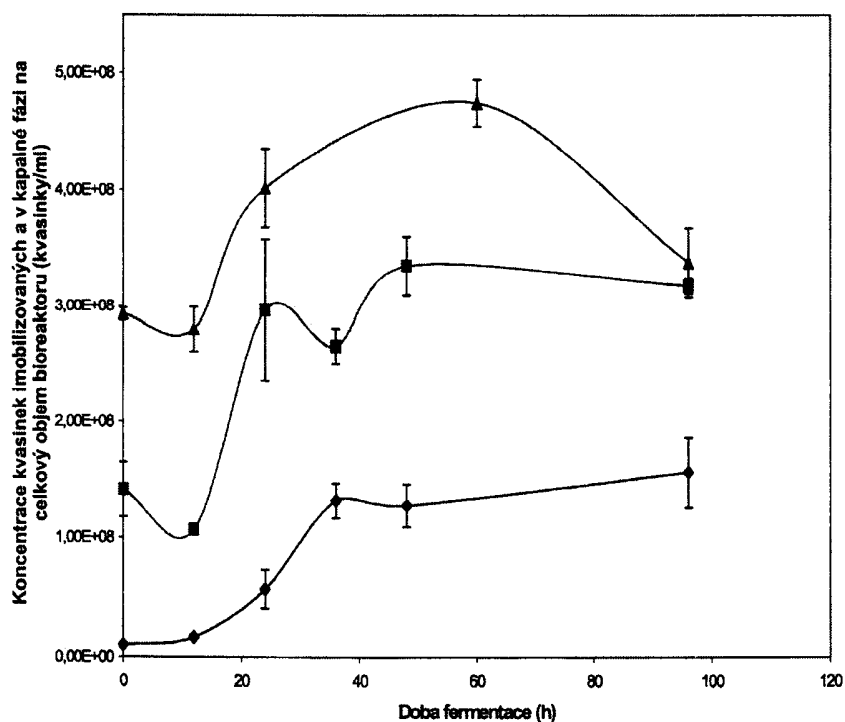
Obr. 6.7 (a) ukazuje koncentraci imobilizovaných kvasinek na celkový objem bioreaktoru v závislosti na době fermentace pro R1, R2, a R3. Volné kvasinky, uvolněné z imobilizační matrice do kapalně fáze při těchto fermentacích, v závislosti na čase jsou znázorněny na obr. 6.7 (b). Na obr. 6.7 (c) je pro tyto tři vsázky znázorněno celkové množství imobilizovaných a volných kvasinek na celkový objem reaktoru. Obr. 6.7 (a) ukazuje, že koncentrace imobilizovaných kvasinek v kappa-karagenanovém gelu po jejich počátečním naočkování do sladiny v R1 stále rostla. Když byly kvasinky pak naočkovány do čerstvé sladiny pro opakování v R2, objevoval se v gelových perličkách stále růst. Když byly enkapsulované kvasinky naočkovány do čerstvé sladiny potřetí, rychlost zvyšování koncentrace imobilizovaných kvasinek se zpomalila. Koncentrační profil volných kvasinek, uvolněných z kappa-karagenanové gelové matrice do kapalně fáze, imobilizovaných kvasinek a celkových kvasinek při fermentaci pro R1 je znázorněna na obr. 6.8.



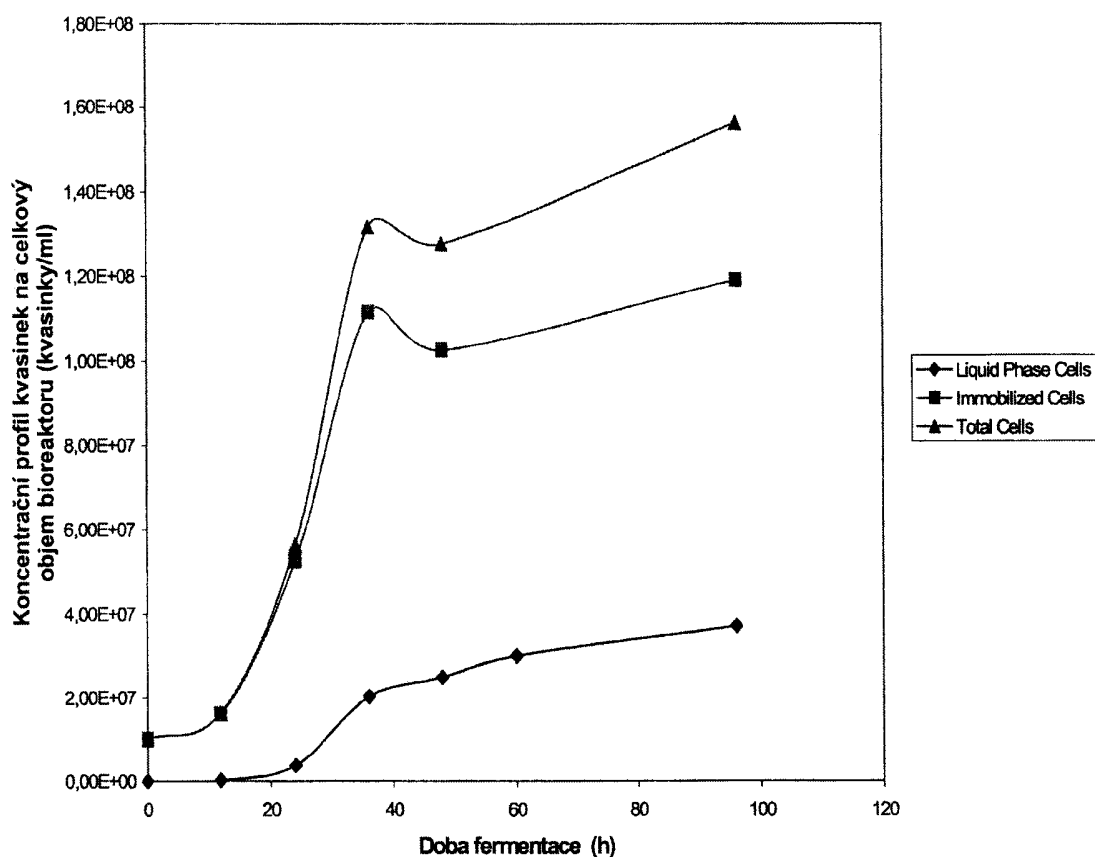
Obr. 6.7. a) Průměrná koncentrace imobilizovaných ležákových kvasinek na celkový objem bioreaktoru v závislosti na době fermentace pro fermentace R1, R2 a R3. Úsečky chyb představují dolní a horní meze experimentálních dat ($n = 2$).



Obr. 6.7. b) Koncentrace ležákových kvasinek, uvolněných do kapalně fáze, na celkový objem bioreaktoru v závislosti na době fermentace pro fermentace R1, R2 a R3. Úsečky chyb představují dolní a horní meze experimentálních dat ($n = 2$).

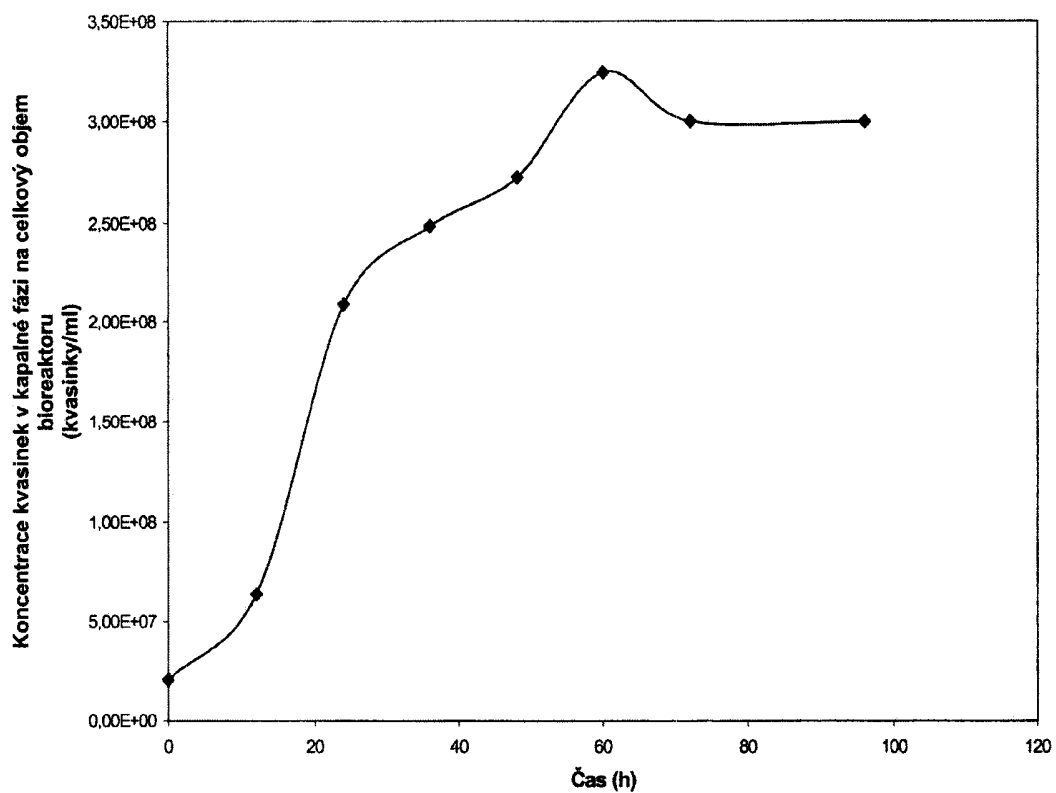


Obr. 6.7. c) Celková koncentrace ležákových kvasinek (imobilizovaných i v kapalně fázi) na celkový objem bioreaktoru v závislosti na době fermentace pro fermentace R1, R2 a R3. Úsečky chyb představují dolní a horní meze experimentálních dat ($n = 2$).

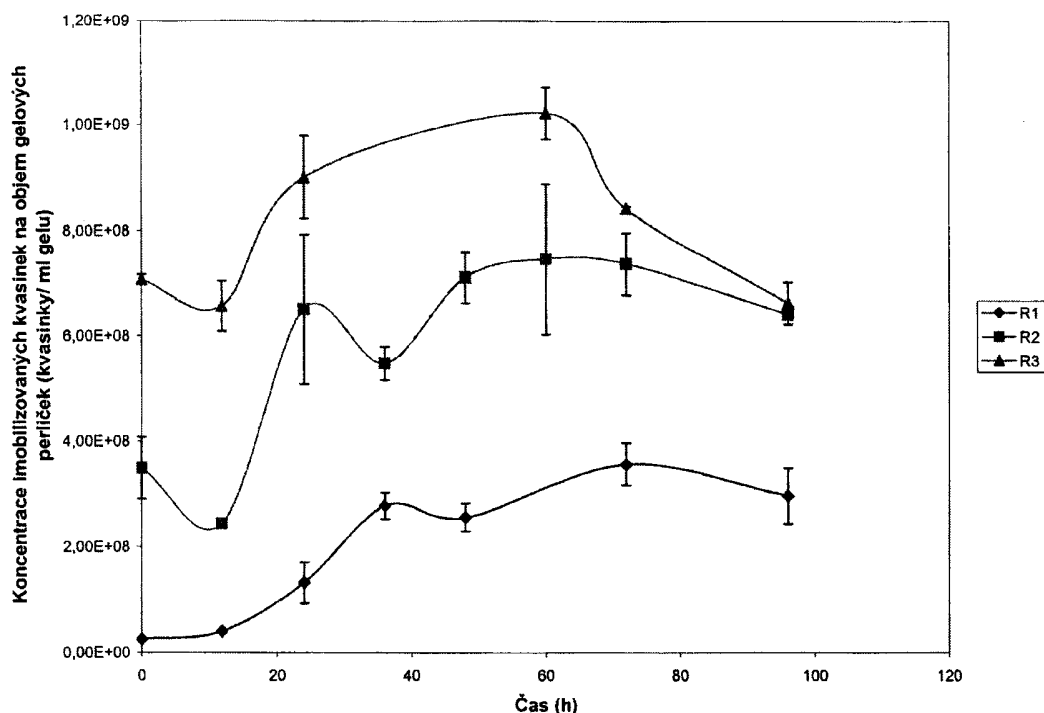


Obr. 6.8. Profil koncentrace imobilizovaných kvasinek, kvasinek v kapalně fázi a celkový (imobilizovaných i v kapalně fázi) v závislosti na době fermentace pro první ze tří opakovaných fermentací R1 s použitím ležákových kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách.

V R1 koncentrace kvasinek imobilizovaných v kappa-karagenanových gelových perličkách stoupala rychlostí podobnou jako při kontrolní fermentaci, která obsahovala pouze kvasinky v kapalně fázi. To bylo potvrzeno porovnáním křivky průměrného růstu kontrolní fermentace s volnými buňkami na obr. 6.9 s podobnou růstovou křivkou kvasinek imobilizovaných v karagenanu v R1 na obr. 6.10. Během R1 nebyly gelové perličky ještě plně kolonizovány a zdá se, že gelová matrice neměla inhibiční efekt na růst kvasinek v perličkách. Při R2 se zdálo, že matrice omezuje růst kvasinek v gelové perličce, na což poukazuje nižší vzrůst počtu kvasinek během tohoto fermentačního cyklu. To může být způsobeno povahou gelu nebo nahloučením kvasinek v perličkách nebo nedostatkem dodávky živin pro kvasinky.



Obr. 6.9. Průměrná koncentrace volně suspendovaných ležákových kvasinek při kontrolní fermentaci ($n = 3$) na celkový objem bioreaktoru v závislosti na době fermentace. Během těchto fermentací nebyly přítomny žádné imobilizované kvasinky.



Obr. 6.10. Koncentrace imobilizovaných ležákových kvasinek na ml gelových perliček v závislosti na době fermentace pro fermentace R1, R2 a R3. Úsečky chyb představují dolní a horní meze experimentálních dat ($n = 2$).

V tabulce 6.1 jsou shrnuty výtěžky ethanolu ze zkvasitelných cukrů substrátu, $Y_{P/S}$, pro tři vsázkové fermentace a kontrolu. V tabulce 6.2 jsou rovněž uvedeny volumetrické produktivity ethanolu v bioreaktoru, vypočtené pomocí dat uvedených v tabulce 6.1. Výtěžky ethanolu z cukrů se v jednotlivých fermentacích nebo v kontrole vzájemně příliš nelišily. Všechny výtěžky byly nad 90 % teoretického výtěžku 0,51, předpokládaného z Guy–Lussacovy rovnice. Jak bylo dříve uvedeno, produkce biomasy a dalších vedlejších produktů z kvasinek brání tomu, aby mohlo být dosaženo účinnosti vyšší než 95 % teoretické (Hardwick, 1995). Volumetrická produktivita ethanolu v bioreaktoru se ve třech opakovaných vsázkových fermentacích v jednotlivých vsázkách významně lišila. Produktivita ethanolu se s každým cyklem opakované vsázkové fermentace zvyšovala a v R3 byly imobilizované kvasinky produktivnější než v kontrolní fermentaci. Celkové množství ethanolu produkované v R2 nebylo významně větší než množství produkované v R1, ale doba fermentace byla menší než polovina v R1 a v kontrolní fermentaci. Existuje mnoho faktorů, které mohly přispět k této zvýšené rychlosti fermentace imobilizovaných kvasinek s každým opakováním vsázky, jako je adaptace kvasinek na podmínky fermentace a progresivně rostoucí koncentrace kvasinek. Celkový počet kvasinek na objem bioreaktoru je pouze v R3 významně větší než v kontrole. Na obr. 6.7 (b) znázorňuje graf závislosti koncentrace volně suspendovaných kvasinek (uvolněných z gelové matrice) v kapalině na době fermentace, že počet kvasinek uvolněných z gelových perliček s každou vsázkovou generací vzrůstá. Jakmile se perličky kvasinkami více zaplnily, zdá se, že uvolňovaly více kvasinek do kapalně fáze. Hüsken et al. (1996) prováděli studie, v nichž zkoumali expanzi kolonií bakteriálních buněk a jejich praskání, resp. uvolňování z kappa–karagenanových gelových plátků. Vives et al. (1993) uvádějí, že maximální koncentrace kvasinek, jaké dosáhli v kappa–karagenanových gelových perličkách, byla 10^9 kvasinek na gram gelu, což je koncentrace, která byla dosažena v gelových částicích při R2. Podobné maximální koncentrace kvasinek se vyskytovaly během kontinuální fermentace v části B. Maximální náplň gelu kvasinkami v gelové matici však závisí na počáteční náplni kvasinek, složení gelu a dalších faktorech.

Tabulka 6.1. Výtěžek $Y_{P/S}$ produktu P, ethanolu, ze substrátů, glukózy (Glc), fruktózy (Frc), maltózy (Mal) a maltotriózy (DP3) pro R1, R2, R3 a kontrolní fermentaci s volně suspendovanými kvasinkami.

Vsázka	t_f^*	t_0	Glc _f	Frc _f	Mal _f	DP3 _f	P _f	Glc ₀	Frc ₀	Mal ₀	DP3 ₀	P ₀	$Y_{P/S}$
Fermentace	(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
Kontrola	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

*Symbol t_f je čas v hodinách do dokončení konzumace maltózy a index f označuje koncentraci daného analytu v čase $t = t_f$.

Tabulka 6.2. Produktivita ethanolu v bioreaktoru [$V_{\text{ethanol}} = (\text{kg produkovaného ethanolu}) / (\text{m}^3 \text{ objemu bioreaktoru} \cdot \text{h})$] pro vsázkové fermentace s imobilizovanými kvasinkami (R1, R2 a R3) v porovnání se vsázkovými fermentacemi s volně suspendovanými kvasinkami.

Fermentace	$V_{\text{Ethanol}} (\text{kg} / \text{m}^3 \cdot \text{h})^*$
R1	0,470
R2	0,668
R3	1,246
Kontrola s volnými kvasinkami	0,805

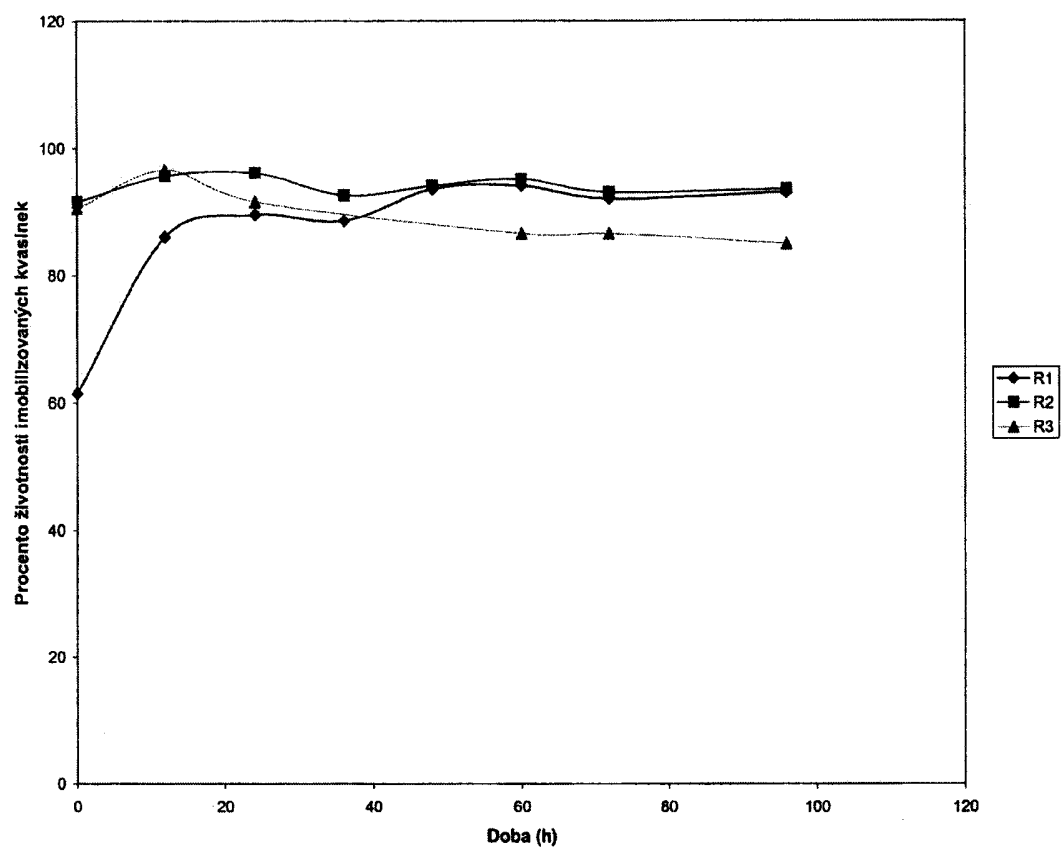
* vypočteno po úplné konzumaci maltózy.

5 Další faktor ovlivňující zvýšenou produktivitu bioreaktoru, pozorovanou při každé opakované vsázkové fermentaci, zahrnuje adaptaci kvasinek. Ke konci první fermentace kvasinky adaptovaly svůj metabolický aparát na dané podmínky fermentace. To může vést ke zkrácení lag fáze na začátku následujících vsázkových fermentací a ke zvýšení rychlosti fermentace. Během této studie byly všechny kontrolní fermentace prováděny s čerstvě připravenými ležákovými kvasinkami. Bylo by zajímavé přeočkovat volně suspendované kontrolní kvasinky vedle přeočkovaných imobilizovaných a dále zkoumat tento efekt ve vztahu k efektům koncentrace kvasinek.

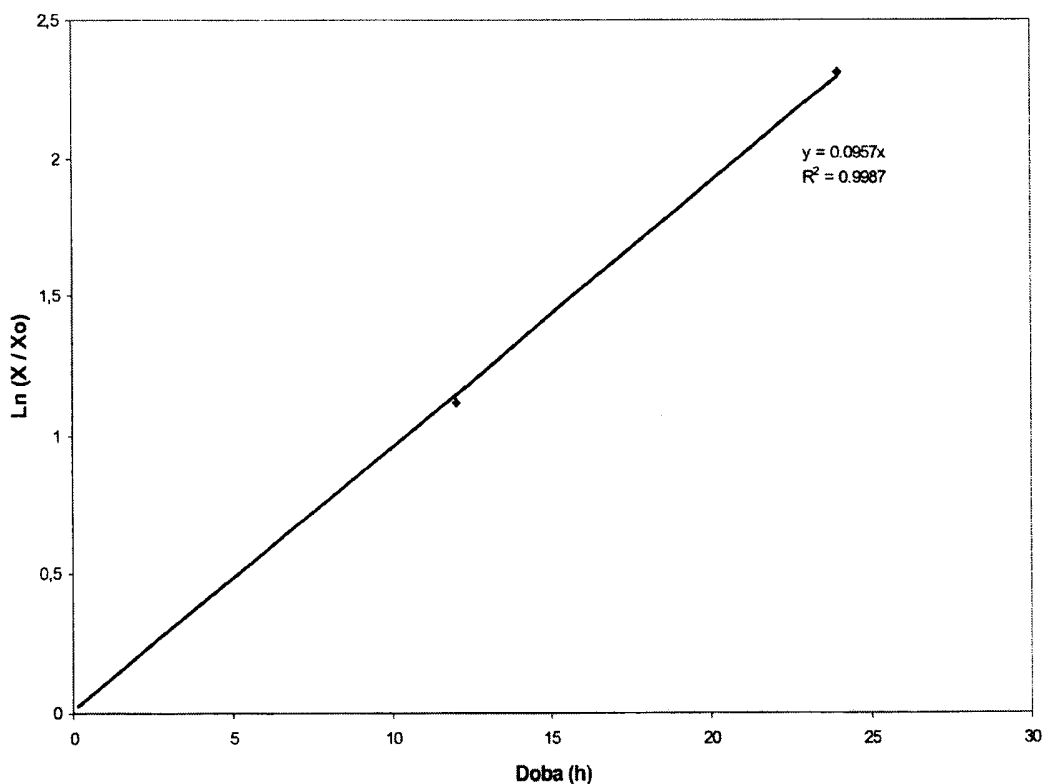
10 Obr. 6.11 ukazuje, že životnost imobilizovaných kvasinek s použitím methylenové modři jako indikátoru byla nízká (< 50 %), pokud byly imobilizované kvasinky naočkovány původně do sladiny v R1, ale po 48 h fermentace byla životnost imobilizovaných kvasinek nad 90 %. Kvasinky rychle kolonizovaly perličky a životnost zůstala vysoká i v R3. Avšak při opakované R3 životnost ke konci fermentace mírně stagnovala. Během všech tří opakovaných fermentací ale měly volné kvasinky, které byly uvolněny do kapalného média větší životnost než jejich imobilizované protějšky. Imobilizační matrice může tedy mít negativní vliv na životnost kvasinek (limitace v důsledku přenosu hmoty a/nebo prostorová omezení), nebo mohou být životaschopné kvasinky uvolňovány z imobilizační matrice do kapaliny přednostně oproti neživotaschopným kvasinkám.

20 S použitím zprůměrovaných dat ze tří oddělených kontrolních fermentací s volně suspendovanými kvasinkami obsažených v příloze 1 byl vytvořen graf $\ln(X/X_0)$ versus doba fermentace, který je znázorněn na obr. 6.12. Směrnice je rovná místní maximální specifické rychlosti růstu kvasinek při 21 °C s mícháním rychlostí 150 min⁻¹ v pivovarské sladině. Bylo zjištěno, že místní maximální specifická rychlost růstu kvasinek je 0,096 h⁻¹ a doba zdvojnásobení kvasinek byla 7,22 h. Hodnota $\mu_{\max}$ zjištěná v této práci byla definována jako místní $\mu_{\max}$, protože, jak je uvedeno v sekci Teorie, skutečné $\mu_{\max}$ používané v Monodově rovnici se získá, pouze je-li S významně větší než Monodova konstanta K_s . Je třeba dalších prací ke zjištění Monodovy konstanty K_s limitujícího substrátu v těchto fermentacích, aby bylo možno potvrdit, že vypočtené místní $\mu_{\max}$ je skutečné maximum, jak je definováno Monodovou rovnicí.

30



Obr. 6.11. Životnost imobilizovaných ležákových kvasinek (methylenová modř) v závislosti na době fermentace pro fermentace R1, R2 a R3.



Obr. 6.12. $\ln(X/X_0)$ oproti době vsázkové fermentace během exponenciální růstové fáze zprůměrovaných kontrolních vsázkových fermentací s volně suspendovanými kvasinkami, kde X je koncentrace kvasinek v čase t a X_0 je koncentrace kvasinek v čase $t = 0$ ($n = 3$).

Část B: Životnost a morfologické charakteristiky imobilizovaných kvasinek při prodloužené době fermentace

5

Předtím, než byly gelové perličky vystaveny fermentačnímu médiu a po vytvoření imobilizovaných gelových perliček procesem s použitím statického míchadla byla koncentrace kvasinek $2,6 \times 10^7$ kvasinek/ml gelových perliček (tabulka 6.3, kde hodnoty jsou průměrem dvou vzorků). SEM zobrazení ukazuje, že kvasinky jsou individuálně a rovnoměrně rozděleny v celé gelové perličce (obr. 24).

10

Tabulka 6.3. Životnost (methylenová modř) a koncentrace volně suspendovaných a imobilizovaných ležákových kvasinek zachycených v kappa–karagenanových gelových perličkách v průběhu doby fermentace.

Doba	Způsob fermentace	Volně suspendované kvasinky		Imobilizované kvasinky	
		v kapalně fázi		v gelové fázi	
		životnost (%)	konc.kvasinek (buněk/ml v kapalině)	životnost (%)	konc. kvasinek (buněk/ml gelu)
0	-	-	-	-	2,6E+07
2 dny	vsázková	98	5,5E+07	92	2,35E+08
2 měsíce	kontinuální	93	2,35E+08	76	8,60E+08
6 měsíce	kontinuální	92	2,11E+08	<50*	1,40E+09*

*založeno na jediném vzorku.

5

Po 2 dnech fermentace byla životnost >90 % a koncentrace kvasinek v gelové perličce vzrostla desetkrát (tabulka 6.3). Kvasinky (>90% životaschopnost) se také začaly z gelu uvolňovat do kapalně fermentační fáze a dosáhly koncentrace 10^7 buněk/ml kapaliny. Uvnitř gelových perliček se vytvořily malé kolonie kvasinek s mnoha jizvami po očkách na jednotlivých kvasinkách, jak je patrné z obr. 25.

10

Životnost imobilizovaných kvasinek po 2 měsících kontinuální fermentace v bioreaktoru s plynovým výtahem klesla (tabulka 6.3), ale kvasinky volně v kapalně fázi zůstaly vysoce životaschopné (>90 %), a toto zjištění bylo podpořeno během několika různých kontinuálních fermentací v pilotních bioreaktorech s plynovým výtahem. SEM na obr. 26 ukazuje, že po dvou měsících se k obvodu perličky vytvořily velké kolonie kvasinek, což podporuje výsledky jiných pracovníků (Bancel a Hu, 1996; Gódia et al., 1987; Wada et al., 1979; Wang et al., 1982). V několika vzorcích bylo pomocí SEM zobrazení provedeno porovnání morfologie kvasinek umístěných u vnějšího okraje perličky s kvasinkami nacházejícími se ve středu gelové perličky. Kvasinky nacházející se při obvodu byly vejčité a hladké s mnoha jizvami po očkách (obr. 27), což ukazuje na multiplikaci kvasinek (Smart, 1995). Kvasinky, které byly zobrazeny ve středu perličky (obr. 28), se zdály zdeformované a vykazovaly málo známek tvorby jizev po očkách. Nedostatek jizev po očkách může být známkou možného omezení živin, jako je kyslík, ve středu perliček. Povrchová nepravidelnost pozorovaná na povrchu kvasinek na obr. 28 může být také známkou stárnutí kvasinek (Barker a Smart, 1996; Smart, 1999).

15

20

25

Životnost kvasinek imobilizovaných v karagenanovém gelu po 6 měsících kontinuální fermentace v bioreaktoru s plynovým výtahem klesal pod 50 % (tabulka 6.3). Je třeba uvést, že zatímco po šesti měsících byla koncentrace a životnost imobilizovaných kvasinek zjišťována pouze pro jeden údaj, údaje po pěti měsících byly podobné; koncentrace imobilizovaných kvasinek $1,14 \times 10^9$ buněk/ml gelu a životnost <50 %. Zatímco u imobilizovaných kvasinek byl pozorován postupný pokles životnosti v čase, životnost kvasinek v kapalně fázi zůstala spolehlivě vysoká, kromě toho, i když byla životnost imobilizovaných kvasinek v perličkách jako celek nízká, bioreaktor produkoval během těchto šesti měsíců kontinuální fermentace plně fermentované pivo. Mezi možné důvody tohoto pozorování patří významný přínos vysoce životaschopných volně suspendovaných kvasinek k fermentaci. Rovněž existuje potenciální přínos životaschopných imobilizovaných kvasinek, umístěných na periferii gelové perličky, kde je méně bariér pro přenos hmoty, v porov-

30

35

nání s kvasinkami nacházejícími se ve středu perličky. Není jasné, zda mají imobilizované kvasinky schopnost se v gelové matrici přemísťovat nebo zda zůstávají stacionární na místě, kde byly na počátku. Koncentrace 10^9 buněk/ml gelových perliček byla maximální hodnota, dosažená u těchto perliček během šesti měsíců kontinuální fermentace.

5

Na obr. 29 je pomocí SEM zobrazena celá perlička. Tato perlička má dutý střed a tuto strukturu vykazovala přibližně polovina všech zkoumaných perliček. Dutina může být výsledkem degradace gelové struktury karagenanu a dále může být podpořena preparací SEM. Tato dutina nebyla pozorována u čerstvě připravených perliček. Předchozí práce jiných autorů (Bancel et al., 1996) ukázala, že rostoucí kvasinky vyvolávají zeslabování gelové sítě. Audet et al. (1988) uvádějí, že

10

Během celého šestiměsíčního experimentu s fermentací piva byl bioreaktor s plynovým výtahem testován alespoň jednou týdně na kontaminaci. Nikdy během experimentu nebyly detekovány bakteriální kontaminanty. V posledních dvou měsících pokusu byly detekovány kontaminující kvasinky v koncentraci, která se pohybovala mezi 1 a 5 cfu/ml. Tyto kvasinky byly schopny růst na médiu PYN při 37 °C, ale nerostly aerobně ani anaerobně na médiu DUBA (selektivním pro bakterie), nezkvašovaly dextriny a nevykazovaly růst na médiu CuSO_4 (selektivním pro divoké kvasinky).

20

Po pěti měsících byl průměrný procentický podíl respiračně deficitních kvasinek 7 %, což je vyšší, než se normálně vyskytuje při použití tohoto kmene v průmyslových vsázkových fermentacích (průměr 2 %). Další autoři publikovali podobná zjištění (Norton a D'Amore, 1995). Respiračně deficitní kvasinky vznikají mutací, která způsobuje neschopnost kvasinek dýchat glukózu na oxid uhličitý a vodu. Tyto kvasinky mají mitochondrie s trvale zhoršenou aktivitou a obvykle vznikají v důsledku mutace mitochondriální DNA (Hardwick, 1995).

25

Nálezy z preparátů SEM mohou být matoucí. Pro neinvazivní zkoumání kvasinek se používají technologie jako jaderná magnetická resonance (NMR) (Fernandez, 1996) a konfokální mikroskopie (Bancel a Hu, 1996). Zobrazovací techniky NMR výzkumníkům umožňují studovat transport, tok a prostorovou distribuci kvasinek a biochemikálií v biofilmech. Výzkumníci (Bancel a Hu, 1996) rovněž ukázali, že konfokální laserovou skanovací mikroskopii lze použít k pozorování buněk imobilizovaných v porézních želatinových mikronosičích s použitím sériových optických řezů.

35

Přestože se methylenová modř používá v pivovarnickém průmyslu jako standardní indikátor životnosti kvasinek, má tato metoda mnoho nevýhod (Mochaba et al., 1998). Zjišťuje, zda je populace kvasinek životaschopná, na základě schopnosti životaschopných buněk oxidovat toto barvivo na jeho bezbarvou formu. Neživotaschopné buňky schopnost oxidovat barvivo nemají, a tudíž zůstávají modré (O'Connor-Cox et al., 1997). Metody počítání na plotnách a kultivace na sklíčkách jsou založeny na schopnosti buněk růst a produkovat makrokolonie na agarových plotnách nebo mikrokolonie v médiu pokrývajícím mikroskopické sklíčko (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Probíhající práce na zkoumání dlouhodobé životaschopnosti kvasinek v imobilizovaných matricích ve firmě Labatt nyní používají nejen methylenovou modř, ale také výše uvedené metody, a rovněž vyvíjejí techniku konfokální mikroskopie s použitím vitálního barvení. Kromě měření životaschopnosti kvasinek je nutno se v budoucích pracích zaměřit také na otázku „vitality“ imobilizovaných kvasinek. Zatímco životaschopnost se používá k popisu schopnosti buněk růst a reprodukovat se, vitalita měří fermentační výkon kvasinek, jejich aktivitu nebo schopnost se zotavit ze stresu (Smart et al., 1999).

50

Kapitola 7. Dosahování příchutě v systému kontinuálním fermentace s plynovým výtahem

7.1. Experimentální postup

Použití kontinuální fermentace pro výrobu piva je velmi odlišné od jiných aplikací používajících imobilizované buňky, protože výsledný produkt se neměří z hlediska jedné dané složky, jako je ethanol. Místo toho jde o rovnováhu více chemických sloučenin, které musejí být vyváženy, aby poskytly kvalitní konečný produkt. Byly zkoumány účinky kyslíku na chuťové metabolity kvasinek během kontinuální primární fermentace a během sekundární vsázkové prodlevy. Účinek do-
 5 by zdržení na chuťové metabolity byl rovněž zkoumán na dvou úrovních. Konečně byl ke sladice, přiváděné do kontinuální fermentace, přidán komerční enzymový preparát alfa-acetolaktát dekarboxylázy a byla monitorována celková koncentrace diacetylu v kapalně fázi.

10 7.1.1. Účinek relativních množství vzduchu ve fluidizačním plynu bioreaktoru na metabolity kvasinek během primární kontinuální fermentace

Množství vzduchu, a tedy kyslíku, ve fluidizačním plynu bioreaktoru se měnilo, zatímco doba zdržení, teplota a všechny další regulovatelné proměnné procesu byly udržovány konstantní. Cel-
 15 kový objemový průtok plynu byl udržován konstantní na 472 m/min za normálního tlaku, teplota byla 15 °C a během celého pokusu byly používány kappa-karagenanové gelové perličky, obsahující imobilizované kvasinky LCC 3021 s počáteční náloží kvasinek 1×10^8 buněk/ml gelu. Během pokusu byly použity čtyři různé objemové průtoky vzduchu (tabulka 7.1) a průměrná doba zdržení v bioreaktoru R_4 byla 1,18 dne

20

Tabulka 7.1. Objemové průtoky vzduchu dodávaného rozdělovačem do bioreaktoru během kontinuální fermentace. Celkový objemový průtok dodávaný do reaktoru byl 472 ml/min za normálního tlaku, přičemž zbytek plynu tvořil oxid uhličitý.

25

Objemový průtok vzduchu (ml/min)	Procentický podíl vzduchu ve fluidizačním plynu (% v/v)	Zahájení (dny)	Ukončení (dny)	Celková doba (dny)
94	19,9	10	26	17
354	75,0	27	40	14
34	7,2	41	58	18
0	0	59	66	8

Během experimentu byly opakovaně prováděny následující analýzy: volný aminový dusík (FAN), celkové zkvasitelné uhlohydráty (jako glukóza), ethanol, celkový diacetyl, těkavý podíl piva (vybrané estery a alkoholy) a koncentrace a životnost kvasinek v kapalně fázi. Bioreaktor
 30 byl také alespoň jednou týdně testován na kontaminaci.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku v kapalně fázi v bioreaktoru byla měřena, když byl stav kontinuální fermentace pro každý objemový průtok vzduchu považován za pseudo-ustálený (mini-
 35 mum ze tří obrátů reaktoru).

7.1.2. Vsázková prodleva po fermentaci: Účinky kyslíku na metabolity kvasinek

I když množství kyslíku ve fluidizačním plynu bioreaktoru bylo relativně nízké (34 ml/min za normálního tlaku), byly koncentrace acetaldehydu a celkového diacetylu, zjištěné během experi-
 40 mentu provedeného v sekci 7.1.2, pro severoamerický trh ležákového piva nepřijatelně vysoké. Proto byl přijat nový přístup, kdy byla kapalina odebírána z kontinuálního primárního bioreaktoru za účelem snížení koncentrace těchto dvou sloučenin udržována 48 hodin ve vsázce při mírně zvýšené teplotě 21 °C. Výsledky z předchozí sekce 7.1.2 také naznačily významný vliv, jaký
 45 mělo množství vzduchu ve fluidizačním plynu na měřené chuťové sloučeniny. Proto byl zkou-

mán vliv aerobních versus anaerobních podmínkách za primární fermentací, kde docházelo k sekundární vsázkové prodlevě, na chuťové metabolity kvasinek.

5 Kontinuální primární fermentace byla v tomto pokusu prováděna v 50l bioreaktoru s plynovým výtahem s použitím vysoce flokulentní varianty kmene kvasinek LCC3021, protože požadavky na objem vzorku byly příliš velké vzhledem k objemu bioreaktoru 8 l. Pracovní podmínky byly 1180 ml/min CO₂ a 189 ml/min vzduchu za normálního tlaku ve fluidizačním plynu, průměrná doba zdržení v bioreaktoru R_t 1,0 den, teplota 15 °C a vysokostupňová pivovarská ležáková sladina 17,5 °P.

10

Byly odebrány celkem 4 vzorky (uzavírací lahvičky 100 ml), z nichž dva byly zpracovávány za anaerobních podmínek a druhé dva byly vystaveny aerobnímu prostředí.

15

Anaerobní zpracování vzorků probíhalo následovně: dvě 100 ml a šest 25 ml lahviček bylo ošetřeno v autoklávu a pak umístěno do anaerobního boxu (Labmaster 100, mbraun, USA) s argonem jako proplachovacím plynem. 100 ml lahvičky se nechaly 45 min ekvilibrovat a pak byly uzavřeny pomocí hliníkových zátek a Teflon[®] septa. K odběru vzorků z bioreaktoru byla použita 50 ml injekční stříkačka vybavená 3" jehlou velikosti 16, dezinfikovaná 70% (v/v) roztokem ethanolu, přičemž bylo propíchnuto septum membrány vzorkovacího ventilu, a vzorek byl nastříknut do 100 ml předem propláchnutých anaerobních lahviček. Lahvičku bylo nutno pomocí další sterilní 20 injekční jehly odvzdušnit, aby se uvolnil tlak v lahvičce během plnění. Aerobní vzorky byly vystaveny atmosféře při odběru z bioreaktoru, přičemž byl membránový vzorkovací ventil bez použití injekční jehly plně otevřen do neuzavřených 100 ml vzorkovacích lahviček.

25

Kapalný vzorek byl ponechán 2 h v klidu při teplotě místnosti, aby se umožnilo usazení kvasinek z roztoku, přičemž koncentrace kvasinek v kapalině pak byla přibližně 10⁶ buněk/ml. Po usazení byla kapalina z každé 100 ml lahvičky dekantována do tří 25 ml lahviček. Anaerobní vzorky byly zpracovávány v anaerobním boxu, aby se minimalizoval příjem kyslíku, zatímco aerobní vzorky byly zpracovávány v digestoři s laminárním prouděním. Každý ze vzorků ve 100 ml lahvičkách 30 byl rozdělen do 3 menších 25 ml lahviček, takže analýzy vzorků mohly být prováděny beze změny průběhu fermentace kvůli odebírání vzorků. Jakmile byly aerobní vzorky přeneseny do menších lahviček, byly bez uzavěru inkubovány při 21 °C. Anaerobní vzorky byly přeneseny do tří menších lahviček a uzavřeny hliníkovou zátkou a Teflon[®] septem. Aby se zabránilo vytvoření přetlaku v důsledku vývinu oxidu uhličitého v lahvičkách a zároveň vystavení vzorků aerobní 35 vnější atmosféře, byla septa propíchnuta jehlou. Konec jehly, vystavený vnější atmosféře, byl ponořen do ethanolu (méně než 1 cm tlakové hlavy), aby se zabránilo zpětnému proudění vzduchu do vzorku. Na analýzu byly vzorky odebírány po 2, 24 a 48 hodinách. Byl také odebrán vzorek přímo z bioreaktoru a okamžitě analyzován, aby se zjistil stav fermentace v bioreaktoru v době odběr. Vzorky byly analyzovány na celkové zkvasitelné uhlohydráty (jako glukóza), ethanol, celkový diacetyl a těkavé podíly piva (vybrané estery a alkoholy).

40

7.1.3. Vliv doby zdržení kapaliny na metabolity kvasinek během kontinuální primární fermentace piva

45

Pro zjištění vlivu doby zdržení kapaliny na metabolickou aktivitu kvasinek byl proveden experiment, při němž byla během kontinuální primární fermentace piva s kvasinkami LCC3021 imobilizovanými v kappa–karagenanových gelových perličkách aplikována stupňovitá změna objemového průtoku sladiny. Teplota v bioreaktoru byla po dobu pokusu udržována konstantní na 17 °C. Objemový průtok plynu, dodávaného do bioreaktoru, byl rovněž konstantní, 472 ml/min za normálního tlaku. Plyn tvořila směs vzduchu (11 ml/min za normálního tlaku) a oxidu uhličitého 50 (461 ml/min za normálního tlaku). Počáteční koncentrace kvasinek v kappa–karagenanovém gelu byla 2,6 x 10⁷ buněk/ml gelové perličky a bioreaktor obsahoval 40 % (v/v) perliček.

55

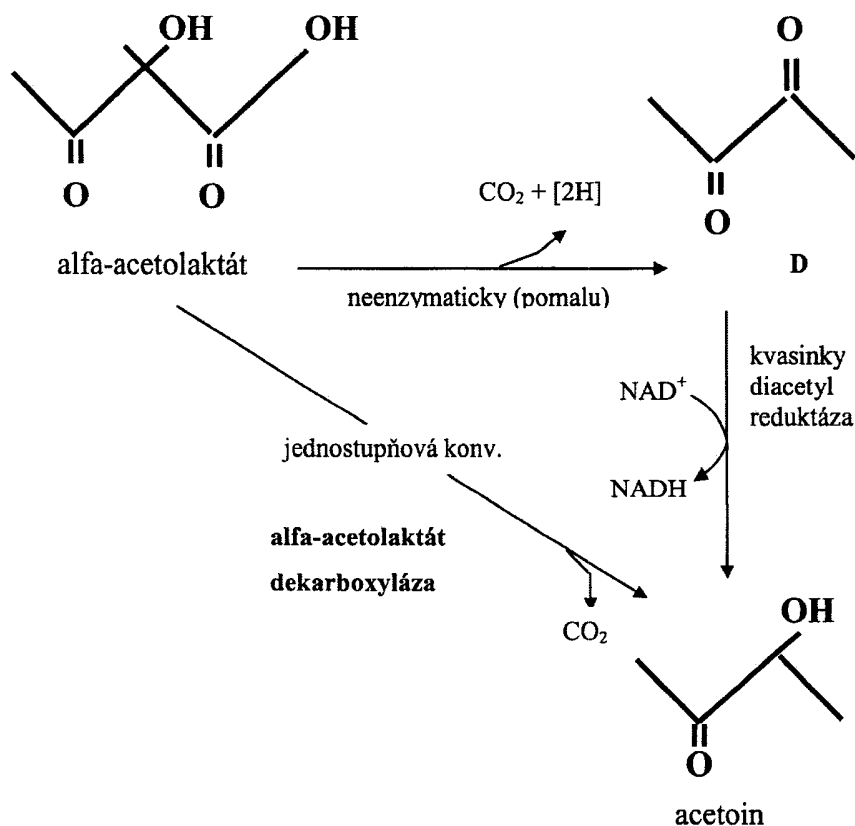
Během pokusu byly opakovaně prováděny tyto analýzy: uhlohydráty, volný aminový dusík (FAN), celkové zkvasitelné uhlohydráty (jako glukóza), ethanol, celkový diacetyl, těkavý podíl

piva (vybrané estery a alkoholy) a koncentrace a životnost kvasinek v kapalně fázi. Bioreaktor byl také alespoň jednou za týden testován na kontaminaci.

7.1.4. Použití komerčního preparátu alfa-acetolaktát dekarboxylázy k redukci celkového diacetylů během kontinuální primární fermentace piva.

Vysoké koncentrace diacetylů považuje většina severoamerických pivovarníků za nežádoucí chuťový defekt piva. Při dosud prováděných kontinuálních primárních fermentacích byly koncentrace celkového diacetylů stále nad prahovou hladinou pro tradiční vsázkové fermentace (70 až 150 $\mu\text{g/l}$) u severoamerického ležáku. Při vsázkové fermentaci se diacetyl snižuje v pozdějších stadiích fermentace, kdy již není přítomen kyslík, a nepřivádějí se další cukry. V systému kontinuální fermentace se do bioreaktoru dodává jednak rozdělovačem konstantní hladina kyslíku a jednak čerstvá sladina. Proto byla zkoumána nová strategie omezení koncentrace diacetylů v kontinuálním bioreaktoru s použitím komerčního enzymového preparátu.

Při fermentaci sladiny vzniká diacetyl, jestliže je alfa-acetolaktát, meziproduct syntézy valinu, oxidativně dekarboxylován vně kvasinky. Kvasinka pak reabsorbuje diacetyl a přeměňuje je na méně chuťově aktivní acetoin. Tato oxidativní dekarboxylace alfa-acetolaktátu na diacetyl je rychlost určující při vsázkových fermentacích sladiny. Při kontinuální fermentaci opouští celkový diacetyl bioreaktor v nepříjemně vysokých koncentracích (300 až 400 $\mu\text{g/l}$). Komerční enzym alfa-acetolaktát dekarboxyláza (ALDC) od Novo-Nordisk A/S může převádět alfa-acetolaktát přímo na acetoin, a tak zamezit tvorbě nežádoucího meziproductu diacetylů (obr. 7.1) (Jepsen, 1993).



Obr. 7.1. Působení alfa-acetolaktát dekarboxylázy (ALDC).

Do sladiny v bioreaktoru byla přidávána alfa-acetolaktát dekarboxyláza pro zjištění jejího čistého efektu na celkovou koncentraci diacetylů. Byly zkoumány i jiné strategie snižování diacetylů. Byly zkoumány i jiné strategie snižování diacetylů, včetně vsázkové prodlevy po fermentaci za

tepla po dobu 48 h a imobilizovaných systémů sekundární fermentace, technologie od Alpha-Laval (Anon, 1997). Obě tyto další strategie vykázaly úspěch při snižování hladiny diacetylu po fermentaci, ale ani jedna neovlivnila hladinu diacetylu u zdroje (tj. na výstupu z bioreaktoru). Použitím ALDC ve sladince ke snižování koncentrace diacetylu vycházejícího z bioreaktoru je možno minimalizovat nebo eliminovat doby zpracování po skončení fermentace.

Aktivita ALDC je optimální při pH 6,0 v ležákové sladině při 10 °C. Při pH 5,0, typickém pro průmyslové sladiny, je aktivita ALDC maximalizována při teplotě 35 °C (Anon, 1994). Za typických podmínek kvašení piva, tj. nižší teploty a pH, je aktivita ALDC nižší než optimální.

Helath Canada novelizovala v r. 1997 kanadské předpisy pro potraviny a léčiva (SOR/97–81) a povolila použití ALDC v alkoholických nápojích, což otevřelo dveře jejímu použití v pivovarech v Kanadě. *Bacillus subtilis*, nesoucí gen pro ALDC (E.C. 4.1.1.5) z *Bacillus brevis*, produkuje enzym ALDC. Protože ALDC je enzym, produkováný geneticky upraveným organismem (GMO), existují otázky vnímání veřejností, které je třeba před použitím tohoto enzymu v potravinářském produktu vzít v úvahu.

Pro tyto experimenty byly použity ležákové kvasinky LCC3021. Vysokostupňová ležáková pivovarská sladina o hodnotě 17,5 °P byla dodána pivovarem Labatt London. Byl monitorován ethanol, celkové zkvasitelné uhlohydráty (jako glukóza), celkový diacetyl a koncentrace kvasinek v kapalně fázi. Kvasinky byly imobilizovány v kappa–karagenanových gelových perličkách, jak je popsáno v kapitole 4. Bioreaktor byl ponechán běžet tři obraty a poté se předpokládalo, že dosáhl pseudo–ustáleného stavu. Jak je uvedeno výše, metoda použitá v této práci pro diacetyl se označuje „celkový diacetyl“, protože měří množství diacetylu i jeho prekursoru alfa–acetolaktátu. Snížení celkového diacetylu, pozorované během tohoto experimentu, tedy bylo součtem účinku enzymu přeměňujícího alfa–acetolaktát přímo na acetoin a následné snížení koncentrace jeho derivátu diacetylu.

Alfa–acetolaktát dekarboxyláza (ALDC) byla dodána jako laskavý dar pro laboratorní účely od Novo Nordisk A/S, Dánsko, pod značkou Maturex® L. Aktivita enzymu byla 1500 ADU/g, kde ADU je množství enzymu, které ze standardních podmínek dekarboxylací alfa–acetolaktátu produkuje 1 μmol acetoinu za minutu, jak je popsáno v metodice Novo Nordisk, Method AF27 (Anon, 1994).

Podmínky kontinuální fermentace: Kontinuální fermentace byly prováděny v 8l bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicí, naočkováném 40 % (v/v) kappa–karagenanových gelových perliček, obsahujících imobilizované ležákové kvasinky. Bioreaktor byl probubláván směsí oxidu uhličitého (438 ml/min za normálního tlaku) a vzduchu (34 ml/min za normálního tlaku). Teplota fermentace byla během pokusů udržována na 15 °C a doba zdržení v bioreaktoru R_t byla 1,5 dne. Celková koncentrace diacetylu byla monitorována za těchto podmínek a bylo dosaženo průměrné kontrolní koncentrace diacetylu v pseudo–ustáleném stavu. Pak se ke sladině přidala ALDC v koncentraci 72 μg/l (108 ADU/l) a byla monitorována reakce celkové koncentrace diacetylu v bioreaktoru.

Experiment 1: Z bioreaktoru byla odebrána sladina do 20l nádoby z nerezové oceli a zahřívána 45 min na 100 °C v autoklávu. Při dodávání do bioreaktoru byla sladina udržována na 2 °C ve vodní lázni s kontrolovanou teplotou. Jakmile bylo v bioreaktoru dosaženo koncentrace celkového diacetylu v pseudo–ustáleném stavu, bylo ke sladině v 20l nádobě přidáno 72 μg/l (108 ADU/l) ALDC. Počáteční nálož biomasy v kappa–karagenanových gelových perličkách byla 3×10^7 buněk/ml gelu.

Experiment 2: Pro minimalizaci nebezpečí kontaminace byl systém tvořen uzavřenou smyčkou na výstupu a byly provedeny i další úpravy popsané v kapitole 4. Stejně jako v experimentu 1 byla sladina odebírána z pivovaru do 20l nádoby z nerezové oceli a autoklávována 45 min při 100 °C. Při napouštění do bioreaktoru byla sladina udržována vodní lázni s kontrolovanou teplotou na 2 °C. Počáteční nálož biomasy v kappa–karagenanových gelových perličkách byla 3×10^7

buněk/ml gelu. Jakmile byla v bioreaktoru dosažena celková koncentrace diacetylu pseudo-ustáleného stavu, bylo ve 20l nádobě ke sladidně přidáno 72 µg/l (108 ADU/l) ALDC.

- 5 *Experiment 3:* Neokysličená pivovarská sladina 17,5 °P (14 hl) byla jímána do velké uchovávací nádoby (T-1) v pilotním zařízení. Pak byla mžikově pasterizována a uchovávána s probubláváním oxidem uhličitým, aby byla dodržena konstantní koncentrace rozpuštěného kyslíku <0,10 mg/l, jak je popsáno v kapitole 5. Z této nádrže byla sladina přiváděna do bioreaktoru, dokud nebylo dosaženo koncentrace celkového diacetylu pseudo-ustáleného stavu. Pak byla po zbytek pokusu ke sladidně asepticky přidávána ALDC (72 µg/l). Přidávání ALDC bylo prováděno měřením množství sladiny, zbývajících ve skladovací nádobě, a vypočtením množství ALDC potřebného k uvedené koncentraci enzymu na cílovou hodnotu 72 µg/l (108 ADU/l). Příslušné množství enzymu pak bylo rozpuštěno v 10 l sterilní sladiny. Tento roztok byl přenesen do 20l tlakové nádoby z nerezové oceli, která byla pomocí sterilního potrubí napojena na vzorkovací otvor uchovávací nádoby na sladinu (T-1). Pak byla do uchovávací nádoby na sladinu tlačena ALDC pomocí tlaku sterilního oxidu uhličitého. Pro zajištění správného promíchání roztoku
- 10 ALDC se sladinou byl průtok oxidu uhličitého do tanku na 1 hodinu zvýšen na 4720 ml/min za normálního tlaku a pak vrácen na normální hodnotu. V uchovávací nádobě pak bylo dost sladiny s přídatkem ALDC pro dokončení pokusu. Počáteční nálož biomasy v kappa-karagenanových gelových perličkách byla 10⁸ buněk/ml gelu.

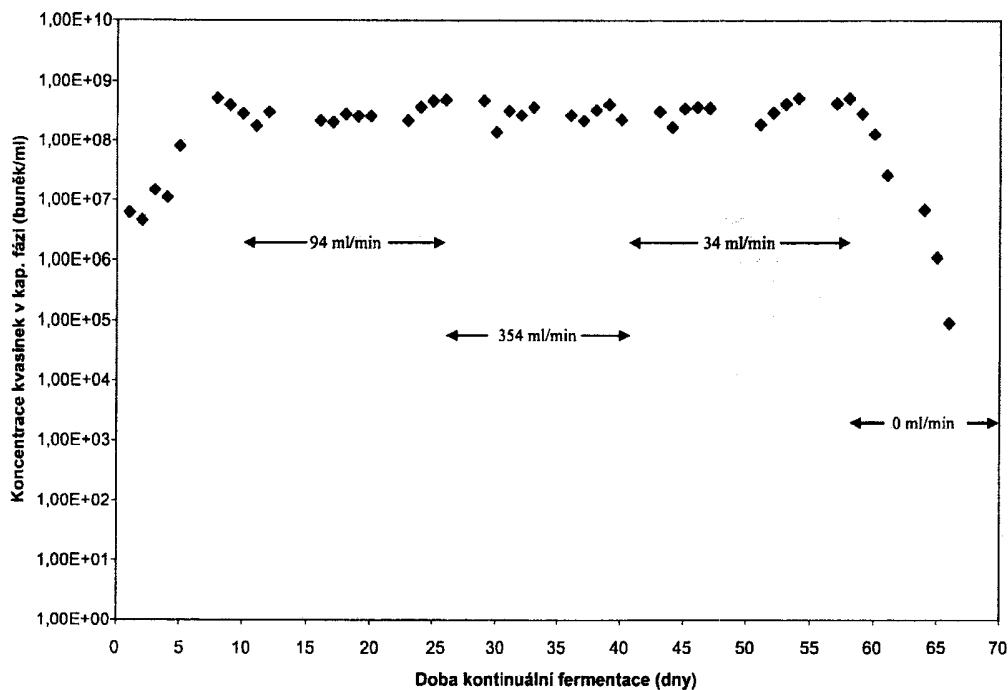
20 7.2. Výsledky a diskuse

7.2.1. Vliv relativních množství vzduchu ve fluidizačním plynu bioreaktoru na metabolity kvasinek během primární kontinuální fermentace

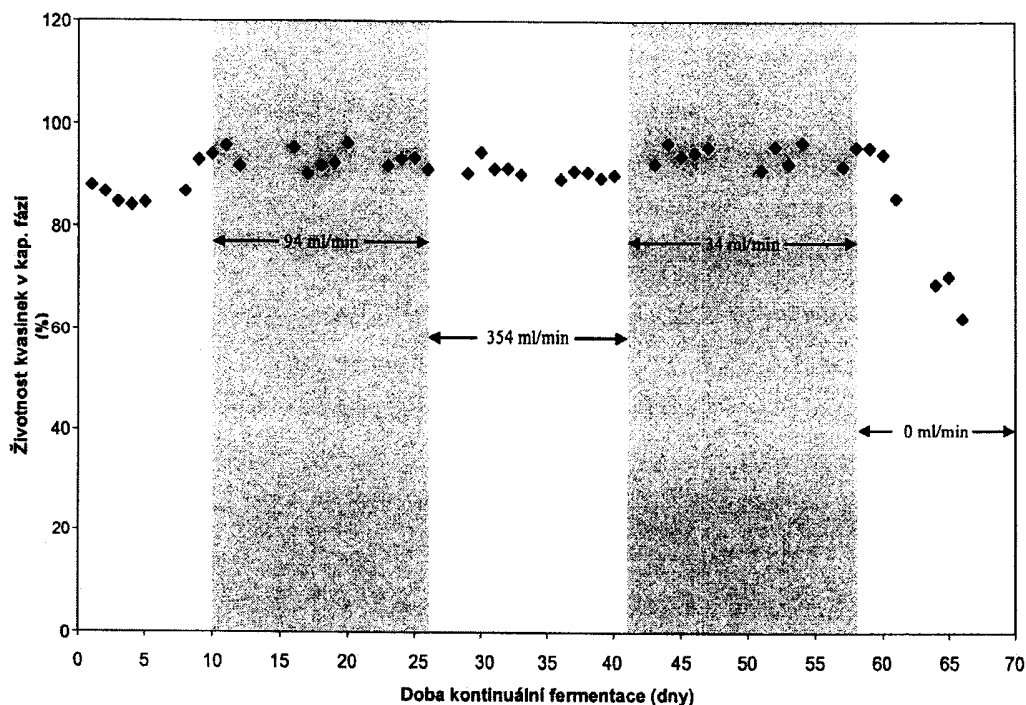
- 25 Na obr. 7.2 až 7.11 je vynesena životnost a koncentrace kvasinek v kapalně fázi, volný aminový dusík (FAN), celkové zkvasitelné uhlohydráty (jako glukóza), koncentrace ethanolu, celkového diacetylu, acetaldehydu, ethylacetátu, 1-propanolu, isobutanolu, isoamylacetátu, isoamylalkoholu, ethylhexanoátu a ethyloktanoátu proti době kontinuální fermentace. Všechny provozní podmínky bioreaktoru byly v průběhu pokusu udržovány konstantní s výjimkou procentického podílu vzduchu v probublávacím plynu bioreaktoru, který je vyznačen přímo v obrázcích. V tabulce
- 30 7.2 jsou uvedeny průměry pro každý analyt v pseudo-ustáleném stavu (po minimálně třech obrazech reaktoru).
- 35 Tabulka 7.2. Souhrnná tabulka vlivu objemového průtoku vzduchu rozdělovačem do bioreaktoru na koncentrace kvasinek a klíčových metabolitů kvasinek v kapalně fázi v bioreaktoru při době zdržení R_t 1,18 dne, průměry při pseudo-ustáleném stavu.

Průměrná* koncentrace analytu	Objemový průtok vzduchu (ml/min)		
	94	354	34
konc. kvasinek (buněk/ml)	3,87E+08	2,98E+08	4,73E+08
celková zkvasitelná glukóza (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
celkový diacetyl (ug/l)	346	1417	389
acetaldehyd (mg/l)	75,62	329,48	28,63
ethylacetát (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
isoamylacetát (mg/l)	0,38	0,21	0,30
isoamylalkohol (mg/l)	58,62	61,64	59,16
ethylhexanoát (mg/l)	0,060	0,030	0,053
Průměrná* koncentrace analytu	Objemový průtok vzduchu (ml/min)		
ethyl oktanoát (mg/l)	0,031	0,013	0,025

- 5 Obr. 7.2 a 7.3 ukazují, že populace kvasinek v kapalině během tohoto experimentu nedosáhla nuly. Chuťové sloučeniny, které byly v této práci studovány, byly produkovány kombinací volných a imobilizovaných kvasinek a nebyl stanovován relativní přínos z jednotlivých zdrojů. V této práci byl více než jeden zdroj volně suspendovaných kvasinek: růst biomasy a kvasinky, které byly do kapalného média uvolněny z gelových perliček. Výzkum na složitých modelech uvolňování a růstu kvasinek ukázal, že jsou-li kvasinky uvolňovány z biofilmů, i když bioreaktor
- 10 pracuje při velkém zředění, bude ve výstupní kapalině stále určitá populace kvasinek (Karamanov, 1991).



Obr. 7.2. Koncentrace kvasinek v kapaln  fázi proti relativn  době kontinu ln  fermentace. V grafu je uveden objemov  průtok vzduchu za normálního tlaku, dod van  do bioreaktoru rozdělovačem. Zbylou   st plynu tvořil oxid uhličitý a celkov  objemov  průtok plynu byl během celého pokusu konstantn  472 ml/min za normálního tlaku.



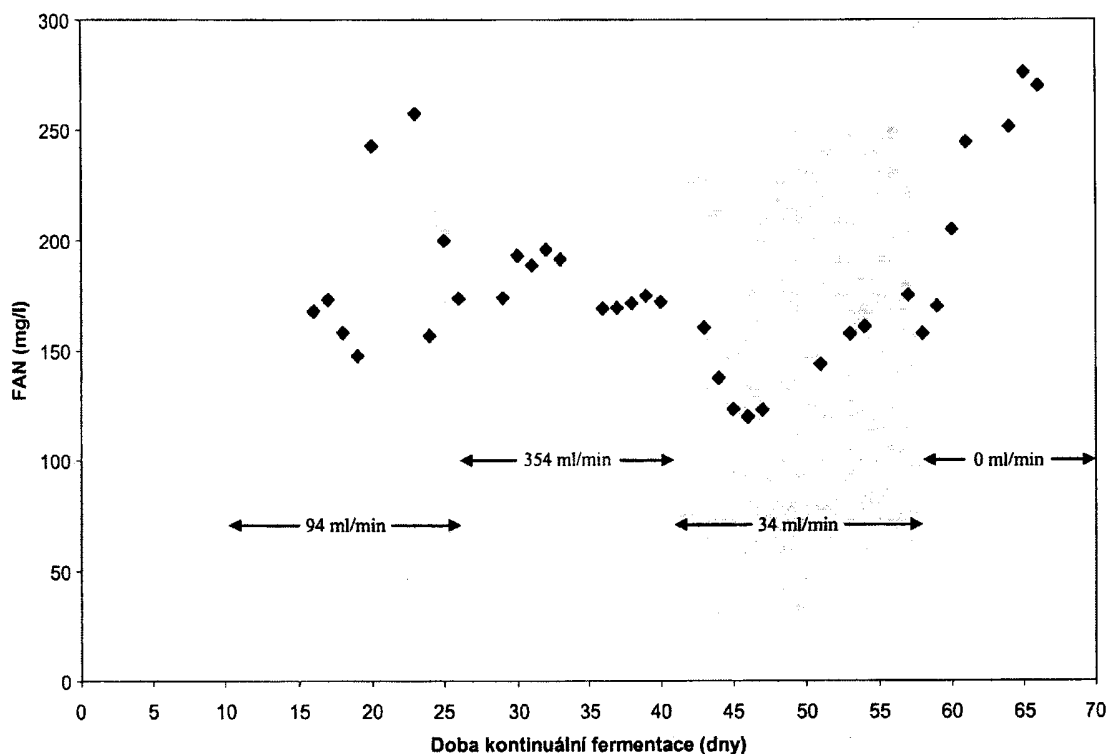
Obr. 7.3.  ivotnost kvasinek v kapaln  fázi proti relativn  době kontinu ln  fermentace. V grafu je uveden objemov  průtok vzduchu za normálního tlaku, dod van  do bioreaktoru rozdělovačem. Zbylou   st plynu tvořil oxid uhličitý a celkov  objemov  průtok plynu byl během celého pokusu konstantn  472 ml/min za normálního tlaku.

Na obr. 7.4 byla vynesena koncentrace volného aminového dusíku (FAN) v kapalně fázi. Je zajímavé, že minimální koncentrace FAN byly při 34 ml/min vzduchu za normálního tlaku. Toto nekoincidovalo s maximální koncentrací ethanolu nebo minimální koncentrací celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza).

5

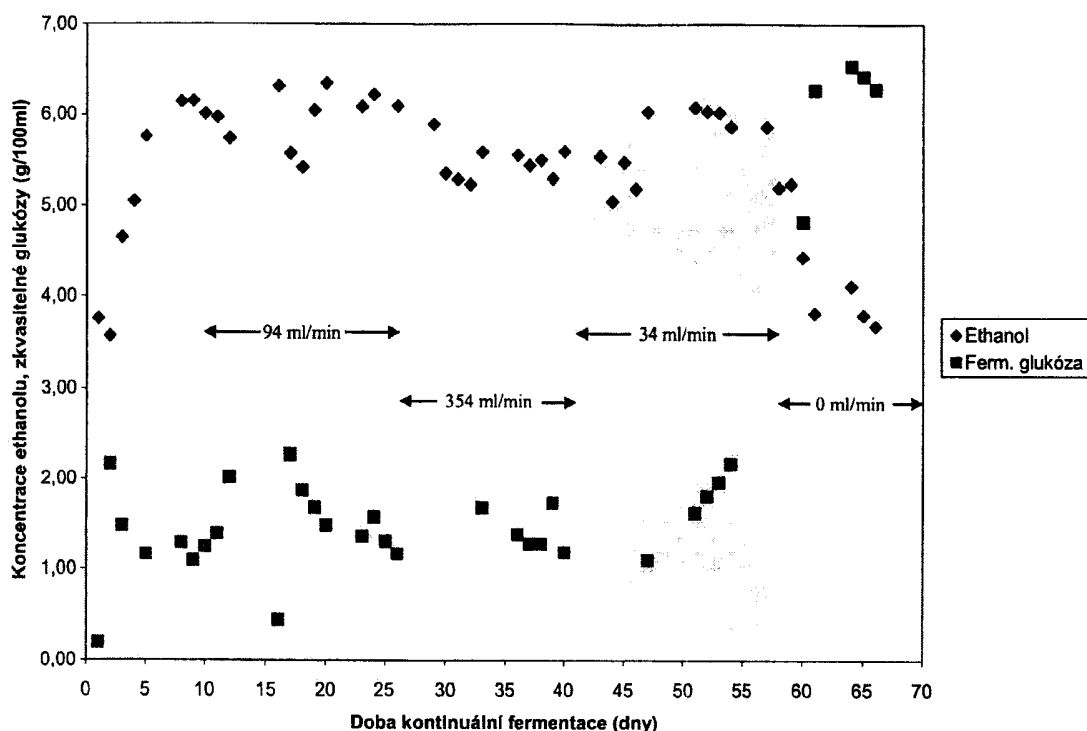
Koncentrace ethanolu v kapalně fázi bioreaktoru klesala, zatímco celkové zkvasitelné uhlohydráty (jako glukóza) stoupaly, pokud byl objemový průtok vzduchu v probublávacím plynu zvýšen z 94 na 354 ml/min, jak je zřejmé z obr. 7.5. To může naznačovat, že v důsledku zvýšené dostupnosti kyslíku dochází k větší respiraci kvasinek oproti fermentaci. Když byl objemový průtok opět snížen z 354 ml/min na 34 ml/min za normálního tlaku, koncentrace ethanolu opět stoupla, avšak nedosáhla koncentrace, která byla pozorována při průtoku 94 ml/min za normálního tlaku. Je obtížné přesně porovnávat koncentraci ethanolu při 34 ml/min a 94 ml/min za normálního tlaku, protože jsou přítomny další faktory ovlivňující systém, které vyplývají ze stárnutí kvasinek, účinků trvalého vystavení relativně vysokému množství kyslíku po dobu, kdy byl průtok 354 ml/min za normálního tlaku, a změn v populaci imobilizovaných kvasinek. Na obr. 2.4 znázornili White a Portno (1978) změny koncentrací chuťových metabolitů kvasinek s dobou kontinuální fermentace v jejich věžovém fermentoru.

15



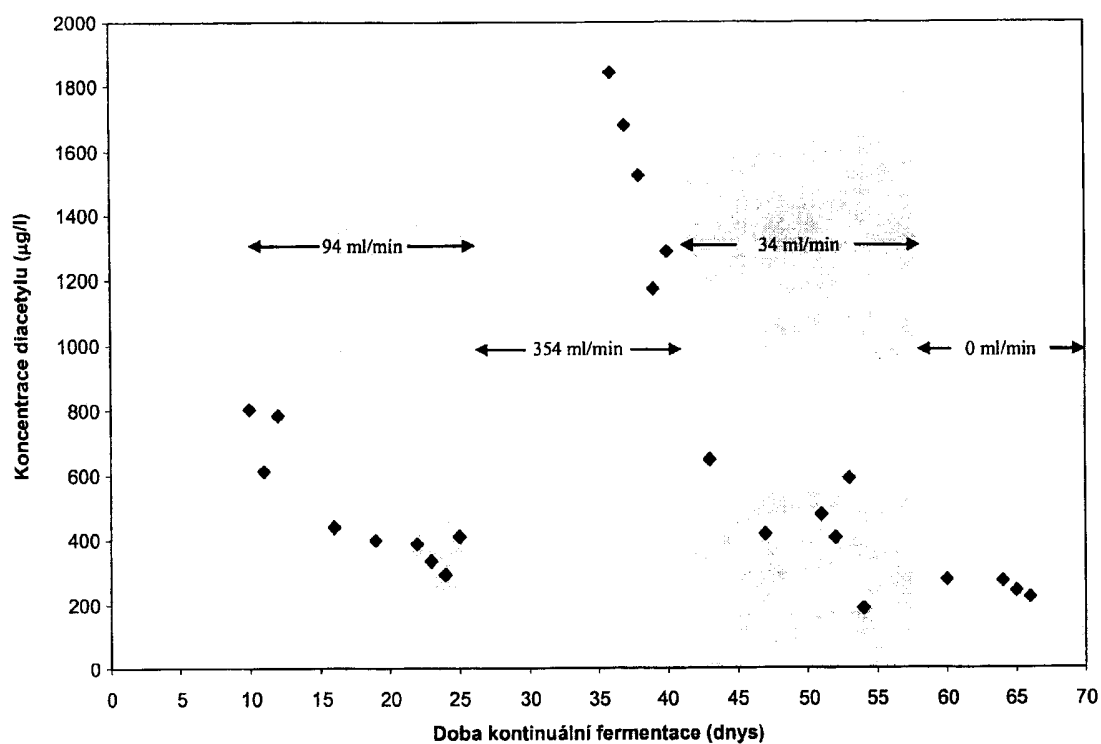
Obr. 7.4. Koncentrace volného aminového dusíku, zbývajícího ve sladině, v závislosti na relativní době kontinuální fermentace. V grafu je uveden objemový průtok vzduchu rozdělovačem za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkový objemový průtok plynu byl během experimentu udržován konstantně na 472 ml/min za normálního tlaku.

20

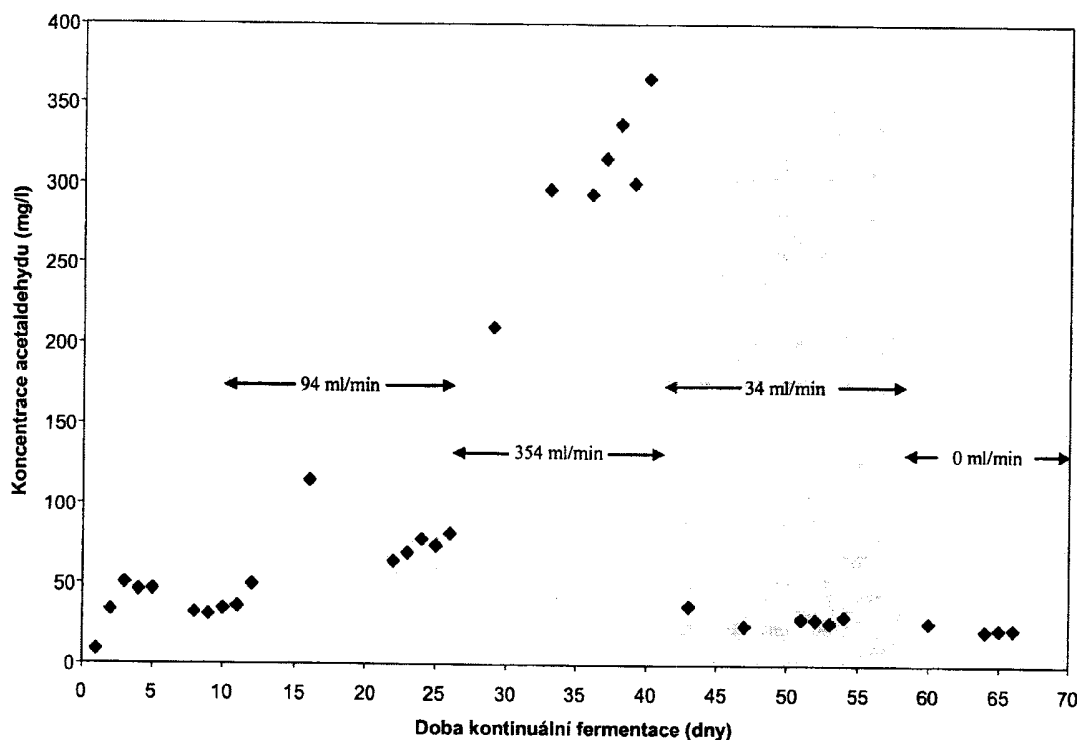


Obr. 7.5. Koncentrace ethanolu a celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza) v závislosti na relativní době kontinuální fermentace V grafu je uveden objemový průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru rozdělovačem za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkový objemový průtok plynu byl během experimentu udržován konstantně na 472 ml/min za normálního tlaku.

- Na obr. 7.6 je zřejmý zvýrazněný efekt kyslíku na produkci celkového diacetylu. Protože diacetyl se všeobecně považuje za nežádoucí chuťovou složku piva, je jedním z hlavních důvodů optimalizace množství kyslíku v bioreaktoru kontrola hladiny této chuťové složky. Po fázi s 354 ml/min vzduchu byl průtok snížen na 34 ml/min za normálního tlaku a celkový diacetyl poklesl. Během vsázkové fermentace je známo, že zvýšená hladina kyslíku vede ke zvýšení tvorby alfa-acetolaktátu, prekursoru diacetylu (Kunze, 1996).
- 10 Na obr. 7.7 vznikl zřetelný vztah mezi množstvím vzduchu v probublávacím plynu a acetaldehydu. Se vzrůstem procentického podílu vzduchu v probublávacím plynu vzrostlo rovněž množství acetaldehydu. Acetaldehyd dodává pivu charakter zeleného jablka a v komerčních pivech je normálně přítomen v množstvích nižších než 20 mg/l.

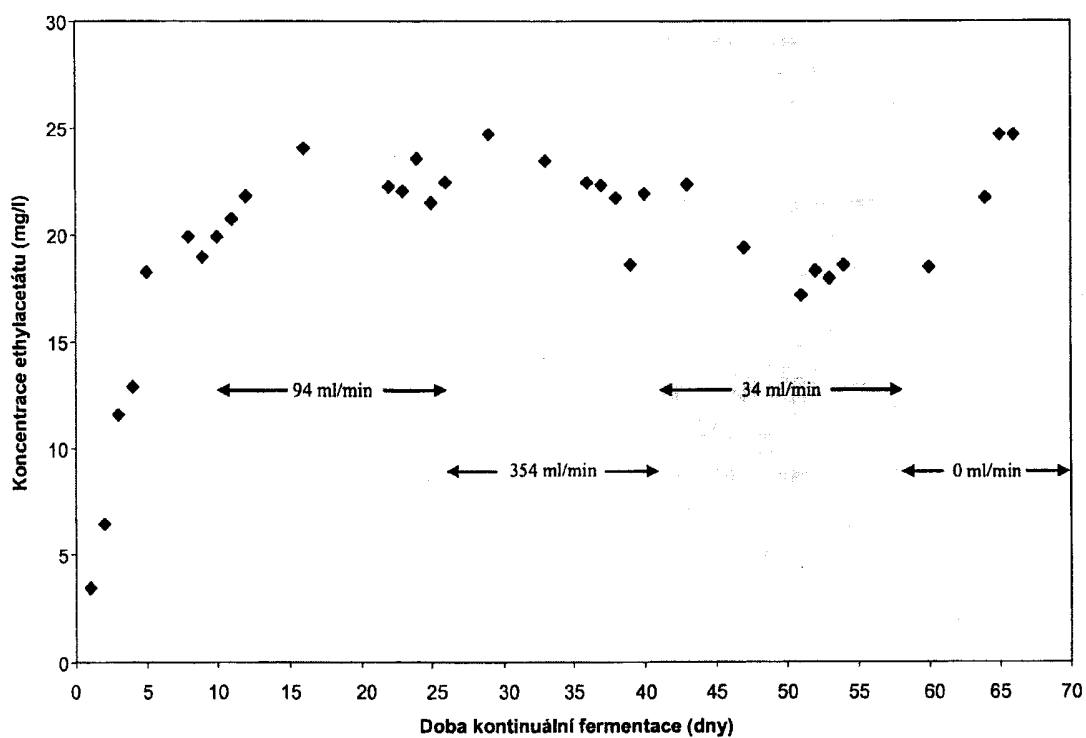


Obr. 7.6. Koncentrace celkového diacetylu v kapalně fázi v závislosti na relativní době kontinuální fermentace. V grafu je uveden objemový průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru rozdělovačem za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkový objemový průtok plynu byl během experimentu udržován konstantně na 472 ml/min za normálního tlaku.



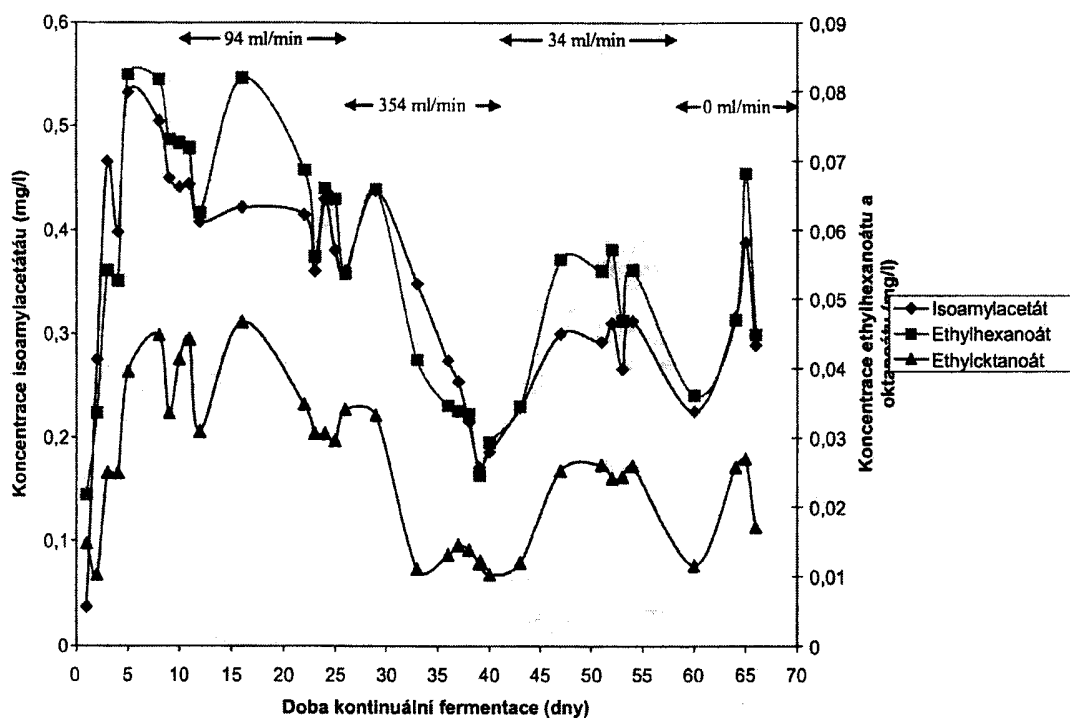
Obr. 7.7. Koncentrace acetaldehydu v kapaln  fázi v závislosti na relativn  době kontinu ln  fermentace V grafu je uveden objemov  průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru roz  lova em za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkov  objemov  průtok plynu byl během experimentu udr zov n konstantn  na 472 ml/min za normálního tlaku.

V tabulce 7.2 a na obr. 7.8 a  7.9 jsou uvedeny koncentrace v pseudo ust len m stavu pro ethylacetát, isoamylacetát, ethylhexanoát a ethyloktanoát v závislosti na době kontinu ln  fermentace. Pro všechny m řen  estery vedla skokov  změna rychlosti aerace z 94 na 354 ml/min za normálního tlaku k poklesu koncentrace. Když byla rychlost aerace sn  ena z 354 ml/min na 34 ml/min za normálního tlaku, koncentrace isoamylacetátu, ethylhexanoátu a ethyloktanoátu stouply. Nestouply však na hodnoty, pozorovan  při aeracn  rychlosti 94 ml/min. Charakter odpovídá těchto sloučenin se navzájem blízce podobal, s tím, že ethylhexanoát a ethyloktanoát vykazovaly relativn j   fluktuace než isoamylacetát. Koncentrace ethylacetátu d le klesla, kd   byl objemov  průtok vzduchu snížen na 34 ml/min za normálního tlaku. Pro všechny estery m řen  v této studii vykazovaly koncentrace vzrůst, kd   byl vzduch z fluidiza n ho plynu zcela odstraněn. Koncentrace každého esteru vzrostla a pak se ustálila s tím, jak rychle klesala koncentrace kvasinek v kapaln  fázi reaktoru.



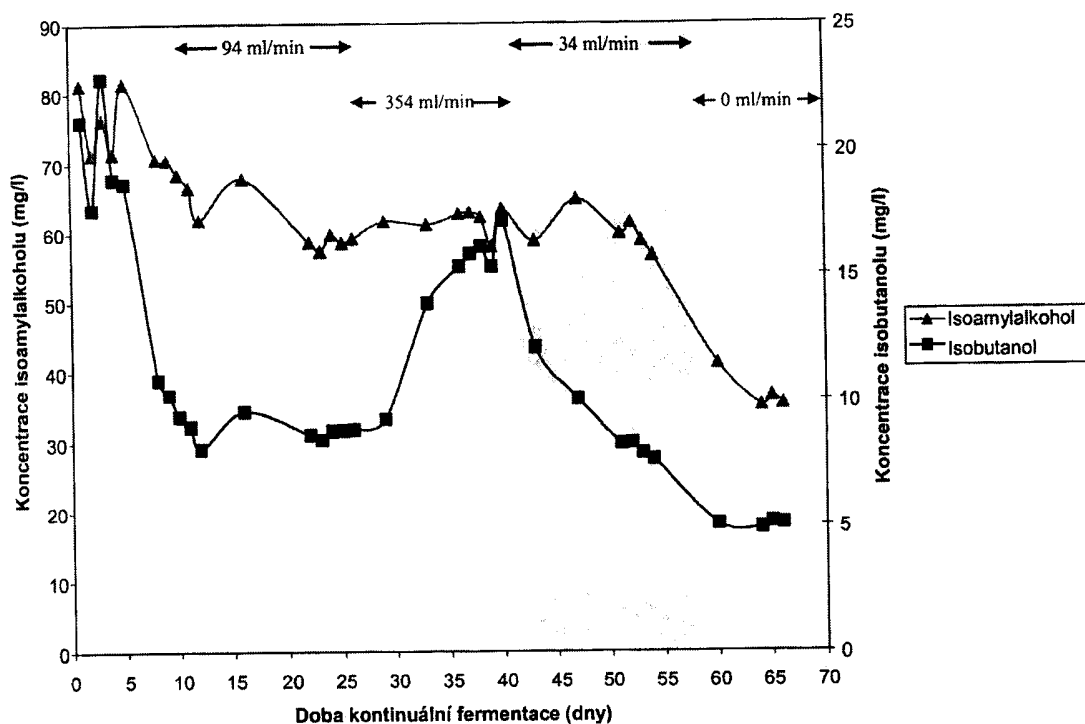
Obr. 7.8. Koncentrace ethylacetátu v závislosti na relativní době kontinuální fermentace

V grafu je uveden objemový průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru rozdělovačem za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkový objemový průtok plynu byl během experimentu udržován konstantně na 472 ml/min za normálního tlaku.

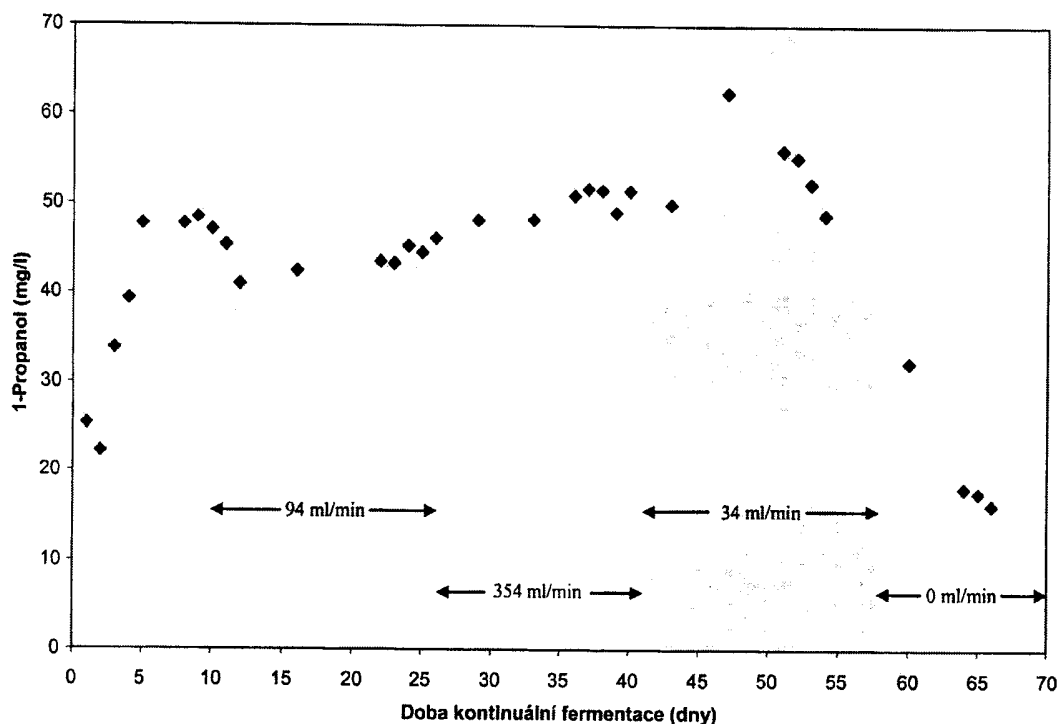


Öbr. 7.9. Koncentrace isoamylacetátu, ethylhexanoátu a ethyloktanoátu v kapaln fázi v závislosti na relativn době kontinuln fermentace. V grafu je uveden objemov průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru rozdělovačem za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkov objemov průtok plynu byl během experimentu udrvn konstantn na 472 ml/min za normálního tlaku.

5 Vyšší alkoholy isoamylalkohol, isobutanol a l-propanol v závislosti na době kontinuln fermentace jsou uvedeny na obr. 7.10 a 7.11. Pro měřené alkoholy se koncentrace v důsledku skokov změny aerace z 94 na 354 ml/min za normálního tlaku zvyšila. Isobutanol vykazoval při změně rychlosti aerace největší fluktuace. Koncentrace l-propanolu byly bezpen pod prahovou hodnotou chuti 600 až 800 mg/l, ale během celého experimentu kontinuln fermentace byly vysoko nad hodnotou typickou pro komern vszkov vyrbn piva, kde je tato koncentrace obvykle pod 16 mg/l. To nebyl případ isoamylalkoholu nebo isobutanolu, které byly v normálních mezích. M se za to, že sloučenina l-propanol vzniká reduki kyselého propionátu (Gee a Ramirez, 1994). Jin (Hough et al., 1982; Yamauchi et al., 1995) spojují tvorbu l-propanolu také s metabolismem aminokyselin α -aminomseln a threoninu, přičemž odpovídající oxo-kyselinou, resp. aldehydem je α -oxomseln kyselina, resp. propionaldehyd.



Obr. 7.10. Koncentrace isoamylalkoholu a isobutanolu v kapaln  fázi v závislosti na relativn  době kontinu ln  fermentace. V grafu je uveden objemov  průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru rozdělovačem za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkov  objemov  průtok plynu byl během experimentu udr zov n konstantn  na 472 ml/min za normálního tlaku.



Obr. 7.11. Koncentrace 1-propanolu v kapaln  fázi v závislosti na relativn  době kontinu ln  fermentace. V grafu je uveden objemov  průtok vzduchu dodávaného do bioreaktoru roz  lova em za normálního tlaku. Zbytek plynu tvořil oxid uhličitý a celkov  objemov  průtok plynu byl během experimentu udržován konstantn  na 472 ml/min za normálního tlaku.

Protože nadbyte n  množství diacetylů, acetaldehydu a přiboudlinových alkoholů jsou v pivu nežadoucí, je regulace kyslíku v znamn  pro omezen  jejich produkce. Jak je diskutováno v přehledu literatury, jestliže se zvýší dodávka kyslíku pro kvasinky, dojde ke zv šen  anaboli-
 5 k  tvorbě prekursorů aminokyselin, a tudíž nadbytku v  ších alkoholů, oxokyselin a diacetylů. Je známo, že koncentrace esterů se s dostupností kyslíku snižuje, protože tvorba esterů je katalyzo-
 v na acetyltransferázou. Acetyltransfer za je inhibována nenasycenými mastnými kyselinami a ergosterolem, což dále zvýšuje přítomnost kyslíku (norton a D'Amore, 1994).

Pro podmínky bioreaktoru, pou it  v tomto experimentu, byly koncentrace rozpuštěného kyslíku v pseudo ust len m stavu (minim ln  po třech obrazech reaktoru) nam řen  v kapaln  fázi bi-
 10 oreaktoru bl zk  nule (m n  než 0,03 mg/l).

Tento experiment neumožňoval přim  srovnání dat pro fluidizační plyn pro průtoky 94 ml/min a 34 ml/min vzduchu za normálního tlaku, protože byly odděleny v  ším průtokem vzduchu (354 ml/min). Je tomu tak proto, že fyziologick  stav kvasinek, vyplývající z vystaven  předchozím
 15 podmínkám bioreaktoru, imobilizační matrice a doba kontinu ln  fermentace mohly způsobit dal  zmn  kone n  chuti.

V  adn m okamžiku během toho experimentu nebyla v bioreaktoru detekována kontaminace.

Za účelem vyv  en  potřeby kvasinek mít k dispozici ur it  množství kyslíku k uchování sv  životnosti a nutnosti kyslík minimalizovat pro získání piva s žadoucím chuťovým profilem je
 25 možno zkoumat dal  strategie, jako přídavek živin, například zinku, hořčiku, nebo dodávání

dalších exogenních sloučenin potřebných k udržení životnosti kvasinek. Takové přídavky umožní další snížení potřeby kyslíku pro kvasinky. Další možností je pracovat po většinu doby s velmi nízkou koncentrací kyslíku a s pravidelnými periodickými pulsy dodávky kyslíku kvasinkám pro uchování jejich životnosti.

5

7.2.2. Vsázková doba zdržení po fermentaci: Účinek vystavení kyslíku na metabolity kvasinek

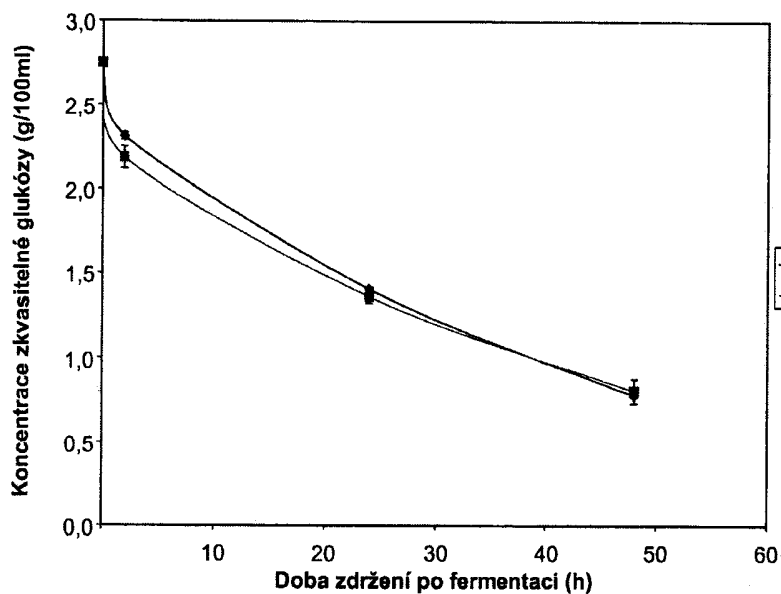
Protože po skončení primární fermentace nebyl celkový diacetyl v normálním rozmezí pro komerční pivo, bylo přijato několik přístupů ke snížení koncentrace této sloučeniny na přijatelnou úroveň. Jeden takový přístup spočívá v aplikaci doby zdržení za tepla bezprostředně po kontinuální primární fermentaci.

Na obr. 7.12 až 7.21 jsou vyneseny koncentrace celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza), ethanolu, celkového diacetylu, acetaldehydu, ethylacetátu, 1–propanolu, isobutanolu, isoamylacetátu, isoamylalkoholu a ethylhexanoátu v kapalně fázi proti době zdržení po fermentaci. Vzorky, odebrané z primárního kontinuálního fermentoru v pseudo–ustáleném stavu, byly udržovány za aerobních nebo anaerobních podmínek, jak je uvedeno v legendě ke každému obrázku.

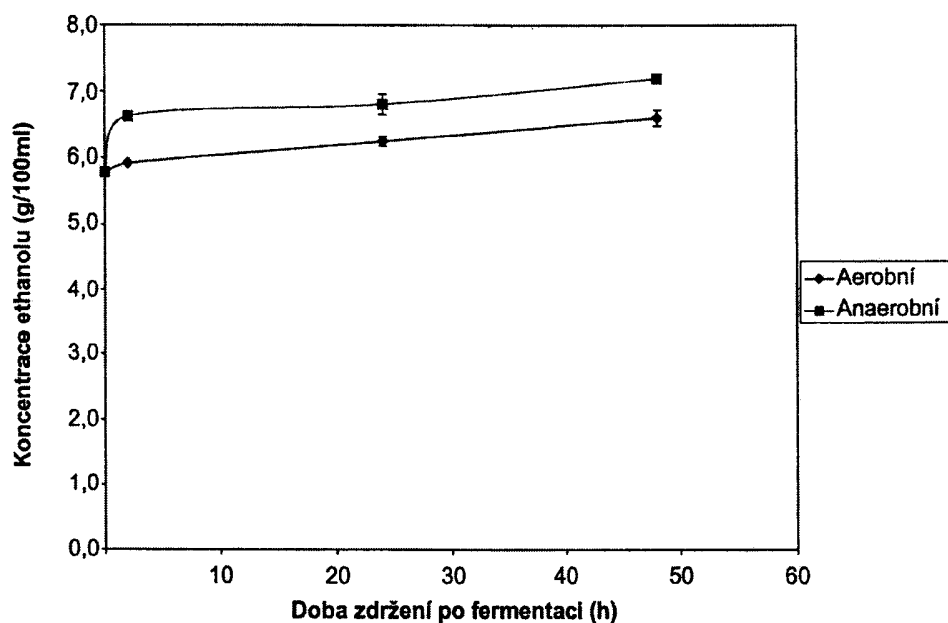
Na obr. 7.12 koncentrace celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza) jak u aerobního, tak anaerobního vzorku během prvních dvouhodin klesala rychle a pak po zbytek doby zdržení klesala pomaleji. Možným důvodem tohoto pozorování je, že během prvních dvou hodin bylo přítomno více kvasinek před dekantací a koncentrace cukrů byla na začátku doby zdržení vyšší. Nebyl významný rozdíl v příjmu zkvasitelné glukózy mezi aerobním a anaerobním vzorkem, i když zpočátku byly určité rozdíly pozorovány.

Koncentrace ethanolu na obr. 7.13 stoupla na začátku doby zdržení rychle a pak u anaerobního i aerobního vzorku stoupala v čase téměř paralelně. Počáteční stoupnutí ethanolu pro anaerobní vzorek souhlasilo s dobou, kdy docházelo k největší konzumaci cukru. Na konci doby zdržení byla koncentrace ethanolu vyšší u anaerobně ošetřených vzorků.

30



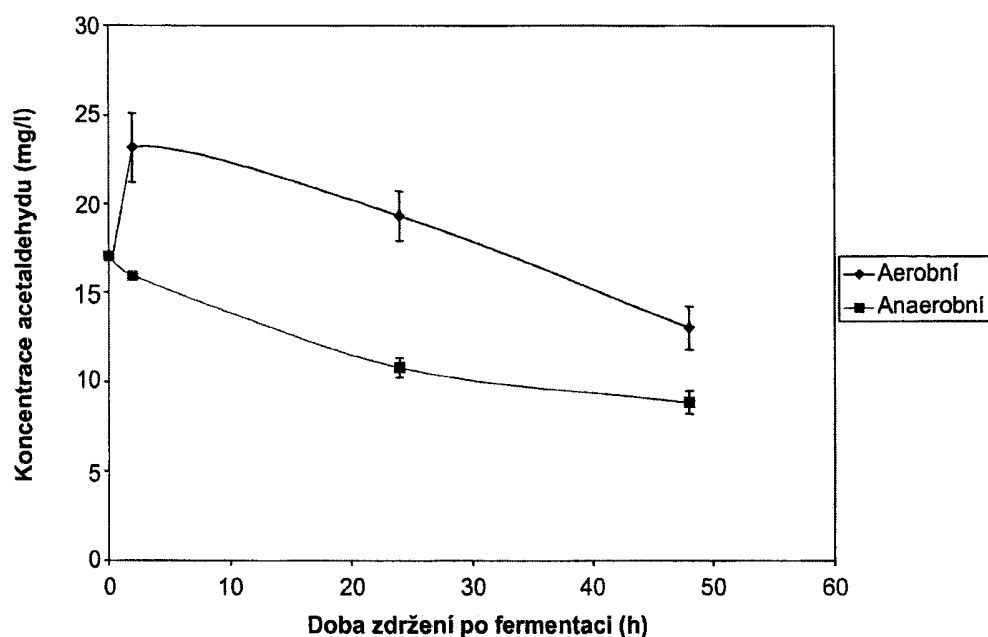
Obr. 7.12. Střední koncentrace zkvasitelné glukózy v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).



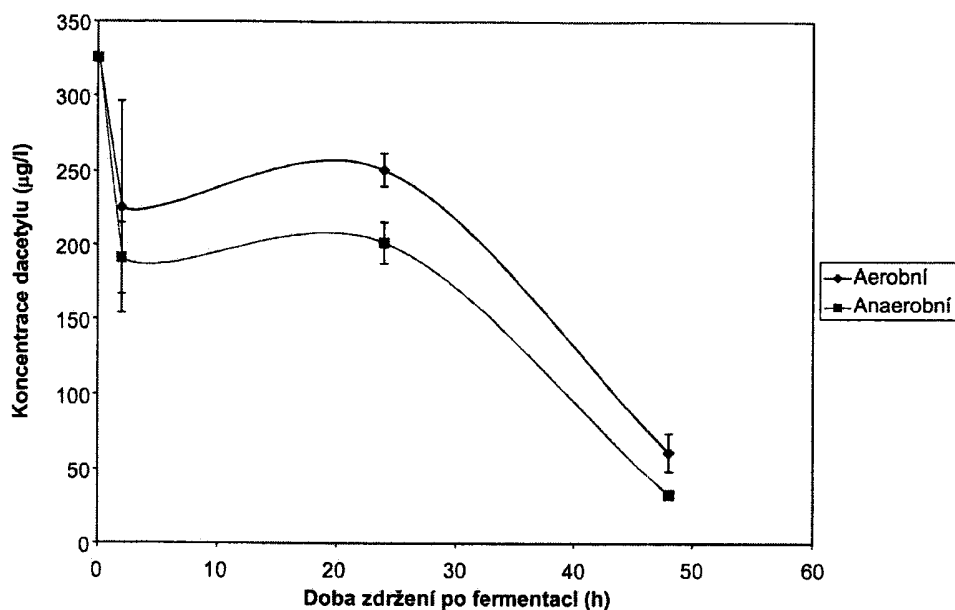
Obr. 7.13. Střední koncentrace ethanolu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).

Na obr. 7.14 vykazaly aerobní vzorky brzký vzestup acetaldehydu po vystavení aerobním podmínkám vně bioreaktoru. Za tento výsledek může odpovídat kombinace aerobních podmínek se spotřebou cukru a produkcí ethanolu. Ke konci 48hodinové doby zdržení klesla koncentrace acetaldehydu v anaerobním vzorku ze 17 mg/l na 9 mg/l, takže pak odpovídala specifikacím pro kvalitní severoamerický ležák (méně než 10 mg/l).

Koncentrace celkového diacetylu v závislosti na době zdržení je uvedena na obr. 7.15. Výsledky ukazují, že eliminace kyslíku ze systému během této doby zdržení poskytuje příznivější podmínky pro redukcí diacetylu. Tvar křivky celkového diacetylu může souviset s úbytkem volného aminového dusíku a následnou intracelulární produkcí valinu, jehož je diacetyl vedlejším produktem (Nakatani et al., 1984a; Nakatani et al., 1984b). Koncentrace celkového diacetylu na konci primární kontinuální fermentace byla 326 $\mu\text{g/l}$ a na konci anaerobní doby zdržení 33 $\mu\text{g/l}$, což je bezpečně pod chuťovým prahem pro komerční piva.



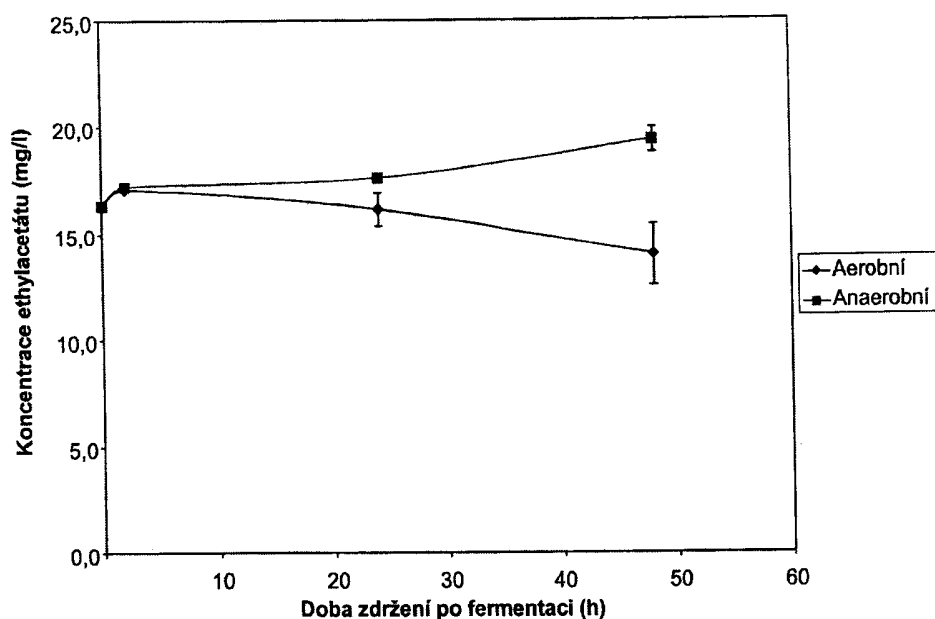
Obr. 7.14. Střední koncentrace acetaldehydu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).



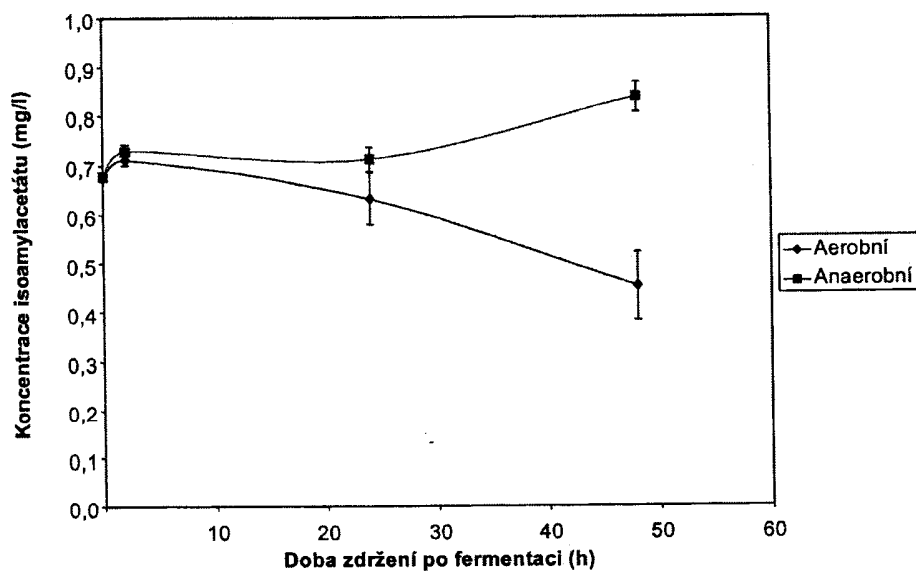
Obr. 7.15. Střední koncentrace celkového diacetylu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).

Na obr. 7.16 až 7.18 jsou vyneseny koncentrace esterů ethylacetátu, isoamylacetátu a ethylhexanoátu proti době zdržení po fermentaci. U všech esterů bylo pozorováno stejné schéma pro aerobní i anaerobní vzorky. Koncentrace esterů se mezi anaerobními a aerobními vzorky nelišila až do pozdější fáze doby zdržení, kdy koncentrace esterů v aerobních vzorcích poklesla a v anaerobních se zvýšila. Protože koncentrace esterů v kontinuálních fermentacích je poněkud nízká ve srovnání s koncentrací vyskytující se v komerčním pivu, je žádoucí volit takové podmínky, které favorizují produkci esterů.

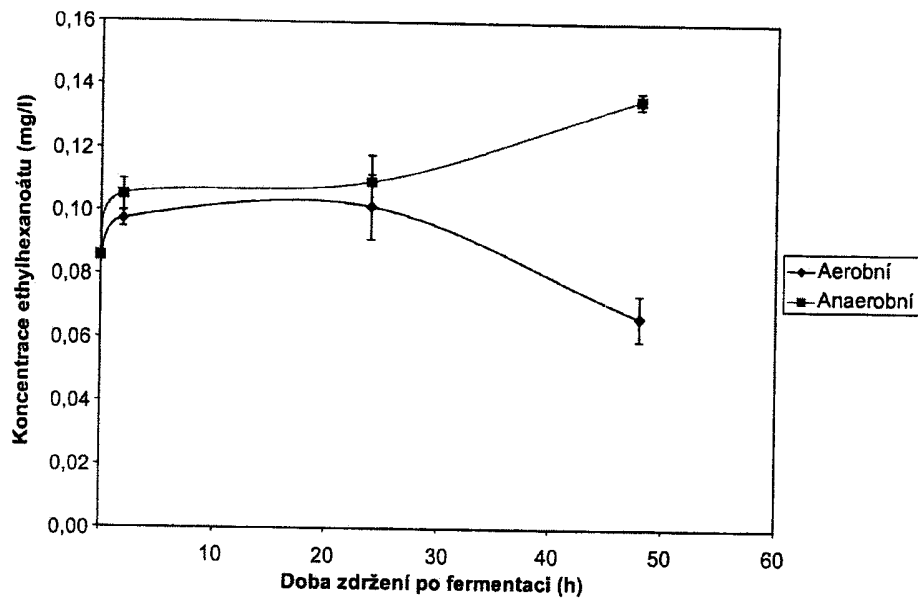
10



Obr. 7.16. Střední koncentrace ethylacetátu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).

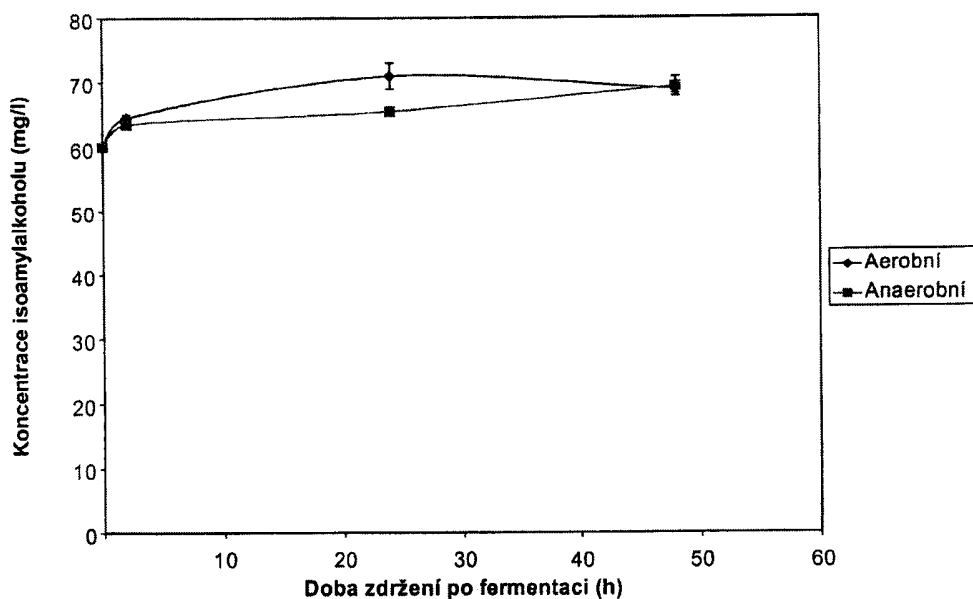


Obr. 7.17. Střední koncentrace isoamylacetátu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).

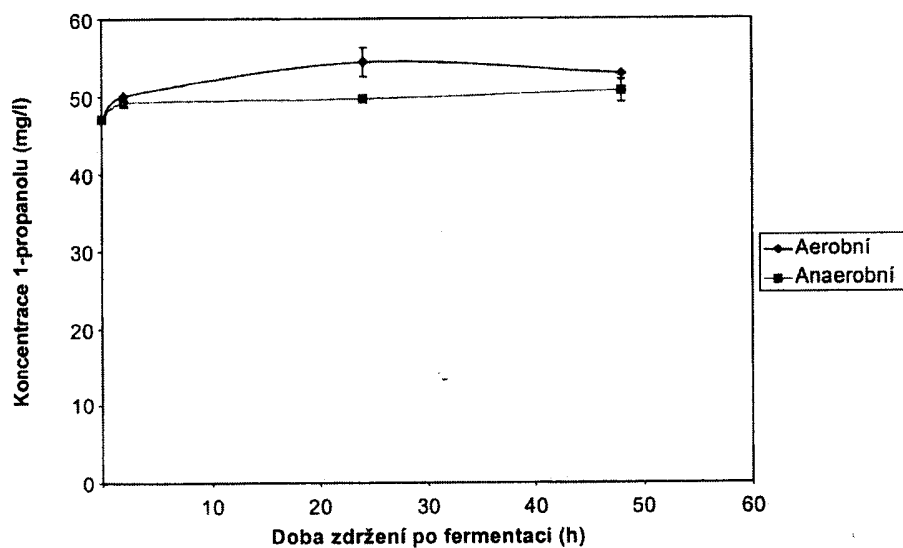


Obr. 7.18. Střední koncentrace ethylhexanoátu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).

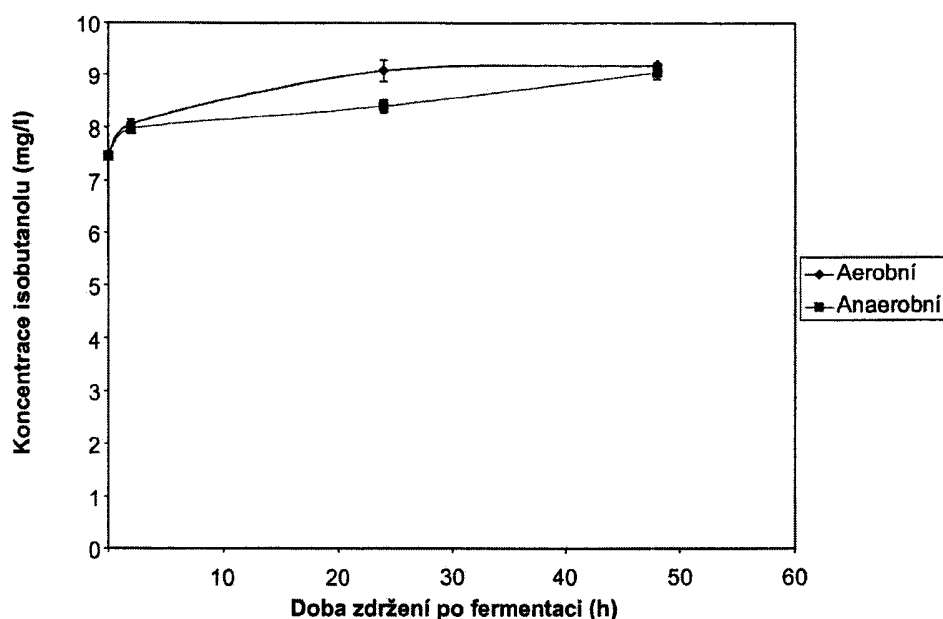
Obr. 7.19 až 7.21 ukazují koncentraci isoamylalkoholu, 1-propanolu a isobutanolu proti době zdržení po fermentaci. Na konci 48hodinové doby zdržení nebyly u těchto alkoholů pozorovány významné rozdíly mezi aerobním a anaerobním zpracováním. Vzorky po 24 h však vykazaly ve všech případech vyšší koncentraci při aerobním zpracování.



Obr. 7.19. Střední koncentrace isoamylalkoholu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).



Obr. 7.20. Střední koncentrace 1-propanolu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Chybové úsečky představují horní a dolní mez experimentálních dat ($n = 2$).



Obr. 7.21. Střední koncentrace isobutanolu v závislosti na době zdržení po fermentaci pro aerobně a anaerobně ošetřené vzorky po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. ($n = 2$).

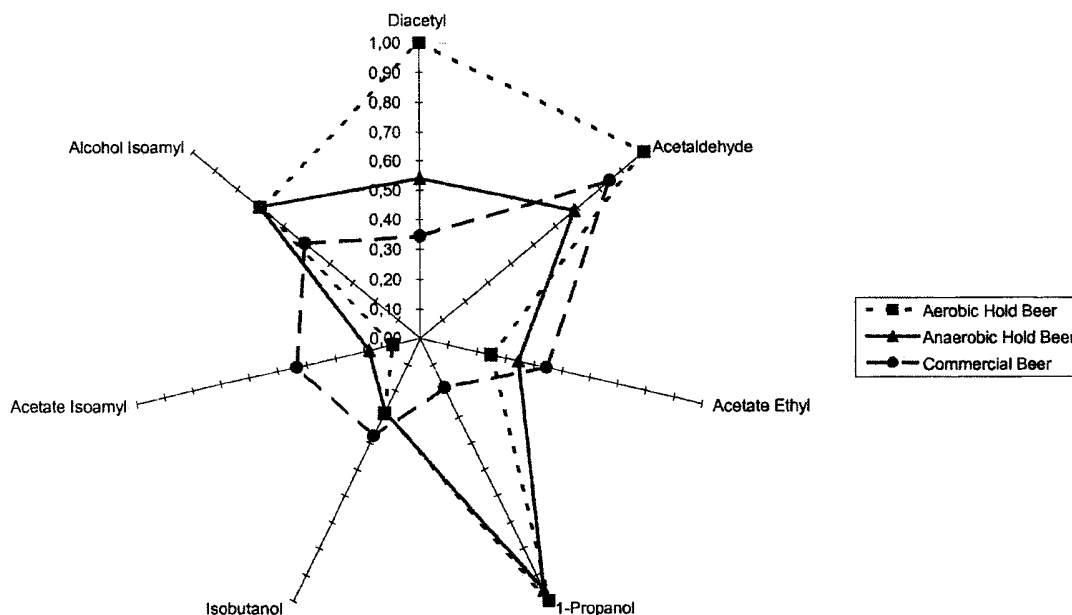
Radarový graf na obr. 7.22 umožňuje srovnání počtu chuťových sloučenin po 48 h doby zdržení za aerobních a anaerobních podmínek s profilem komerčního piva. Radarové grafy se v pivovarnickém průmyslu používají obvykle k usnadnění zkoumání a srovnávání různých charakteristik piva dohromady v jednom grafu (Sharpe, 1988). Z tohoto obrázku je zřejmé, že kontinuálně fermentované pivo, udržované za anaerobních podmínek, se nejvíce blíží typickému tržnímu pivu. Z přílohy 6 je zřejmé, že anaerobní kapalina byla v normálních rozmezích pro tržní pivo, kromě 1-propanolu, který byl významně vyšší než u vsázkově fermentovaných piv. Tato vyšší hodnota u 1-propanolu byla pozorována u všech kontinuálně fermentovaných piv v této práci.

Tvorba 1-propanolu probíhala ve stadiu primární kontinuální fermentace a během doby zdržení se významně nesnížila, ať byly podmínky aerobní či anaerobní. Kunze (1996) uvádí, že ke zvýšení vyšších alkoholů, jako je 1-propanol, během vsázkové fermentace přispívají tyto faktory: míchání, intenzivní provzdušňování sladiny a opakované přidávání čerstvé sladiny k existujícím kvasinkám.

Optimální se tedy zdá zcela eliminovat sekundární dobu zdržení optimalizací podmínek v bioreaktoru pro primární kontinuální fermentaci. Další výhody však lze získat použitím doby zdržení, optimalizací teploty zdržení (odstraňování diacetylu kvasinkami je silně závislé na teplotě), množstvím kvasitelných cukrů zbývajících v kapalině na začátku doby zdržení, optimalizací koncentrace přítomných kvasinek, hydrodynamickými charakteristikami nádoby (odstranění diacetylu může být vylepšeno zlepšením kontaktu mezi kvasinkami a pivem) a dalšími opatřeními k eliminaci kyslíku v tomto stadiu.

Výpočty objemové produktivity piva jsou uvedeny v příloze 3. Postup, popisovaný v této sekci, s kontinuálním bioreaktorem pracujícím s dobou zdržení 24 h a s následnou vsázkovou prodlevou 48 h, je 1,8krát produktivnější než současný průmyslový vsázkový proces. Relativně rychlý průmyslový vsázkový proces s dobou cyklu 7,5 dne má objemovou produktivitu piva $0,093 \text{ m}^3$ produkovaného piva / (m^3 objemu nádoby $\times$ den), zatímco zde popisovaný kontinuální proces má

- produktivitu $0,165 \text{ m}^3$ produkovaného piva / (m^3 objemu nádoby x den). Kdyby další výzkum umožnil zkrácení vsázkové doby prodlevy na méně než 24 h, stala by se produktivita piva 2,3krát větší než průmyslový vsázkový standard. Pokud by se dosáhlo ideálního scénáře s 24-h kontinuálním procesem a žádnou vsázkovou prodlevou, byla by objemová produktivita piva 7,5krát vyšší než vsázkový standard. Kromě zvýšené objemové produktivity je nutno s pečlivou analýzou relativních provozních nákladů vybalancovat dodatečné přínosy, realizované přechodem z vsázkového na kontinuální proces, jako je kratší doba k dodání na trh, snížení velikosti pivovaru a méně častá propagace kvasinek.
- Jiní výzkumníci (Kronlöf a Virkajärvi, 1996; Nakanishi et al., 1993; Yamauchi et al., 1995) se zaměřili na vývoj vícestupňové kontinuální fermentace, kde první stupeň kontinuální fermentace (aerobní) vede pouze k částečné spotřebě zkvasitelných cukrů přítomných ve sladidně. I když tato strategie vykazala určitý úspěch, pokud jde o produkci chuti, jsou tyto systémy složité. První aerobní stádium těchto procesů také vytváří prostředí, které je více náchylné k mikrobiální kontaminaci (tj. vysoká koncentrace cukru, teplota a kyslík, s nízkou koncentrací ethanolu). V systému bioreaktoru s plynovým výtahem, popisovaném v této práci, má bioreaktor nízkou koncentraci zkvasitelných cukrů, nízké pH, vysokou koncentraci ethanolu a nízkou koncentraci kyslíku, což činí prostředí nehostinným pro potenciální kontaminanty.



- Obr. 7.22. Radarový graf normalizovaných koncentračních dat, získaných po 48 h aerobního nebo anaerobního uchovávání po primární kontinuální fermentaci v bioreaktoru s plynovým výtahem. Normalizovaná data jsou založena na průměrech zdvojených vzorků a data pro komerční piva byla vzata jako střed dat uvedených v příloze 6.

7.2.3. Vliv doby zdržení kapaliny na klíčové metabolity kvasinek během kontinuální primární fermentace piva

- Obr. 7.23 až 7.28 ukazují analytické výsledky, získané z kapalně fáze bioreaktoru. V tabulce 7.3 jsou uvedeny průměrné koncentrace a průtoky měřených analytů v pseudo-ustáleném stavu (po

minimálně třech obrazech bioreaktoru) při dvou dobách zdržení kapaliny, použitých během tohoto experimentu. Zatímco životnost kvasinek v kapalně fázi se při zvýšení průtoku sladiny do bioreaktoru významně nezměnila, koncentrace kvasinek se změnila, jak je zřejmé z obr. 7.23.

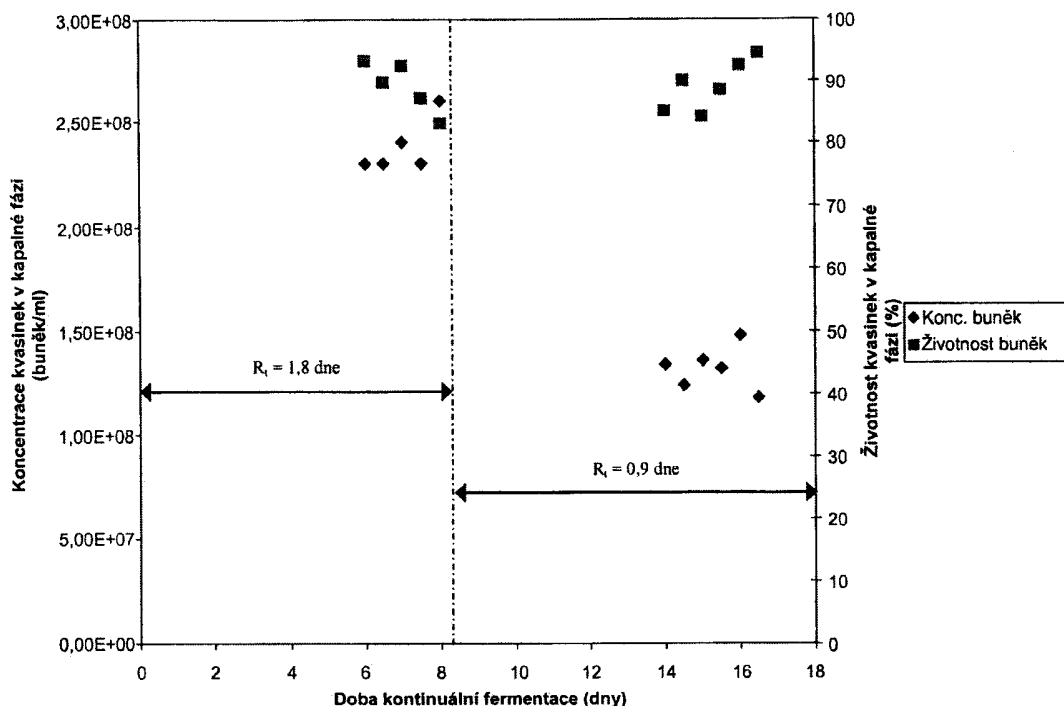
5

Tabulka 7.3 (a) Souhrnná tabulka vlivu doby zdržení v bioreaktoru na koncentrace kvasinek a jejich klíčových metabolitů v kapalně fázi, průměry v pseudo–ustáleném stavu; (b) Souhrnná tabulka vlivu doby zdržení v bioreaktoru na průtok kvasinek a jejich klíčových metabolitů v kapalině na výstupu z bioreaktoru, průměry v pseudo–ustáleném stavu.

10

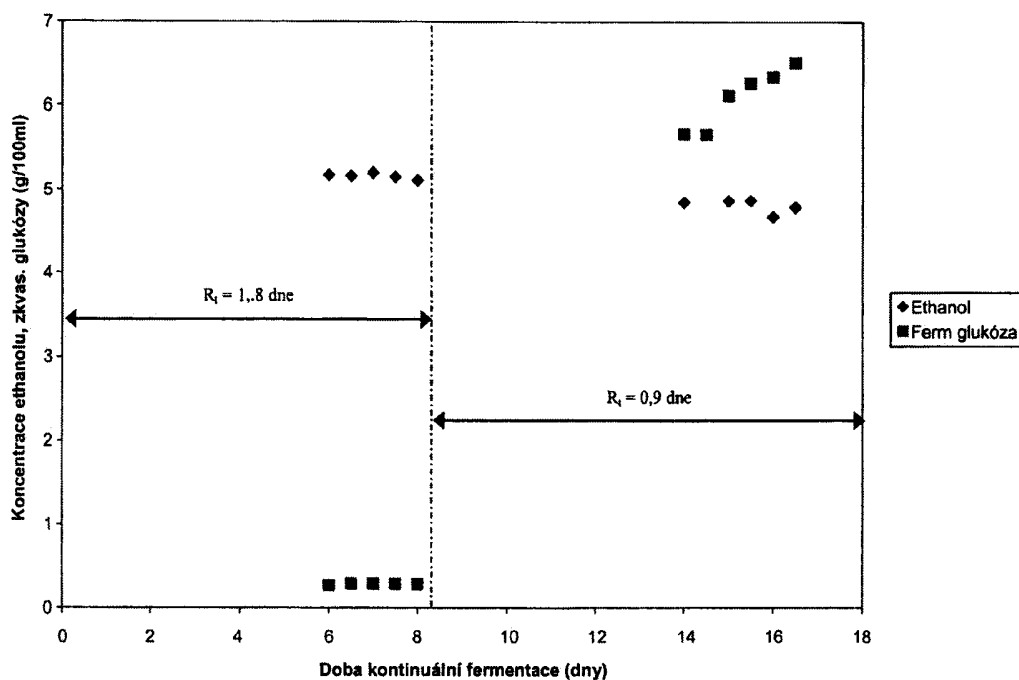
(a) Průměrná koncentrace analytu	Doba zdržení v bioreaktoru	
	1,8 dne	0,9 dne
konc. kvasinek (buněk/ml)	2,38E+08	1,32E+08
celk. zkvas. glukóza (g/100 ml)	0,29	6,09
FAN (mg/l)	106,3	246,4
ethanol (g/100 ml)	5,16	4,80
celkový diacetyl (ug/l)	292	460
acetaldehyd (mg/l)	19,47	37,07
ethylacetát (mg/l)	41,00	38,29
1-propanol (mg/l)	44,95	13,53
isobutanol (mg/l)	22,78	9,13
isoamylacetát (mg/l)	0,90	1,28
isoamylalkohol (mg/l)	76,67	51,39

(b) Průměrný průtok analytu	Doba zdržení v bioreaktoru	
	1,8 dne	0,9 dne
Průtok kvasinek (buněk/min)	7,38E+08	8,22E+08
celk. zkvas. glukóza (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
celkový diacetyl (g/min)	9,06E-07	2,81E-06
acetaldehyd (g/min)	6,04E-05	2,26E-04
ethylacetát (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
isoamylacetát (g/min)	2,80E-06	7,30E-06
isoamylalkohol (g/min)	2,38E-04	3,13E-04

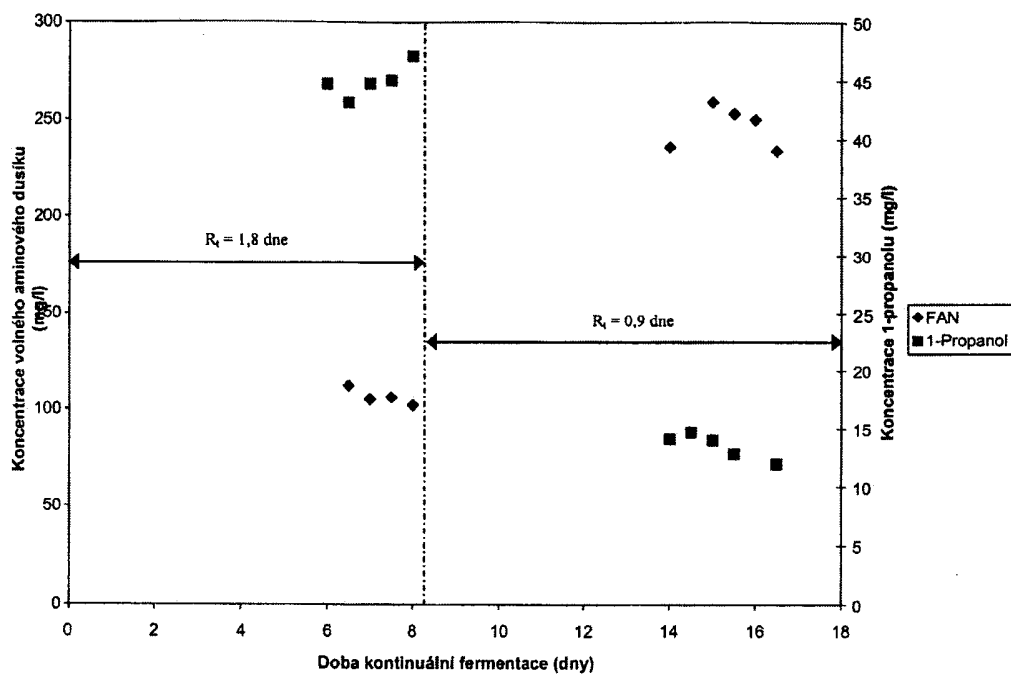


Obr. 7.23. Koncentrace kvasinek v kapaln  fázi v závislosti na relativn  době kontinu ln  fermentace, vliv doby zdržení kapaliny v bioreaktoru. R_t je doba zdržení kapaliny v bioreaktoru ve dnech.

Na obr. 7.24 a 7.25 se koncentrace substrátů sladiny, volného aminového dusíku (FAN) i celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza), zvy ily, když doba zdržení kapaliny poklesla z 1,8 na 0,9 dne. Z hmotových bilancí v tabulce 7.4 se se sn  zenou dobou zdržení v bioreaktoru rychlost spotřeby celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza) zvyšila, zatímco rychlost spotřeby volného aminového dusíku se snížila. Faktor v t   ku $Y_{P/S}$ produktu fermentace ethanolu z fermentovateln ho glukózového substrátu se při sn   en  doby zdržení kapaliny zvy il z 0,3 na 0,5. Protože systém byl probubláván vzduchem a oxidem uhličitým, byly v plyn n  fázi pravd podobn  menší ztráty ethanolu, což by mělo dopad na faktor v t   ku $Y_{P/S}$ ovlivn n m bilance ethanolu. Výzkum prov d n  ve spolupráci s Budacem a Margaritisem (1999) kvalitativn  demonstroval s použitím metody plynov  chromatografie–hmotov  spektroskopie (GC–MS), že v hlavov m prostoru bioreaktoru s plynovým výtahem jsou během kontinu ln  fermentace detekovány t kav  chu ov  podíly piva zahrnující ethanol, acetaldehyd, ethylacetát a isoamylacetát.



Obr. 7.24. Koncentrace ethanolu a zkvasitelné glukózy v kapalně fázi v závislosti na relativní době kontinuální fermentace, vliv doby zdržení kapaliny v bioreaktoru. R_t je doba zdržení kapaliny v bioreaktoru ve dnech.



Obr. 7.25. Koncentrace volného aminového dusíku a 1-propanolu v kapalně fázi v závislosti na relativní době kontinuální fermentace, vliv doby zdržení kapaliny v bioreaktoru. R_t je doba zdržení kapaliny v bioreaktoru ve dnech.

Tabulka 7.4. Hmotová bilance volného aminového dusíku a celkových zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza) na základě průměrných dat z tabulky 7.3, vliv doby zdržení.

Doba zdržení	1,8 dne	0,9 dne	1,8 dne	0,9 dne
	volný aminový dusík		celková ferm. glukóza	
	(g/min)		(g/min)	
vstup*	8,84E-04	1,74E-03	4,71E-01	9,26E-01
výstup	3,65E-04	1,50E-03	8,93E-03	3,72E-01
spotřeba (ΔS)	5,18E-04	2,35E-04	4,62E-01	5,54E-01
Faktor výtěžku ($Y_{P/S}$)			0,3	0,5

*koncentrace na vstupu z přílohy 1

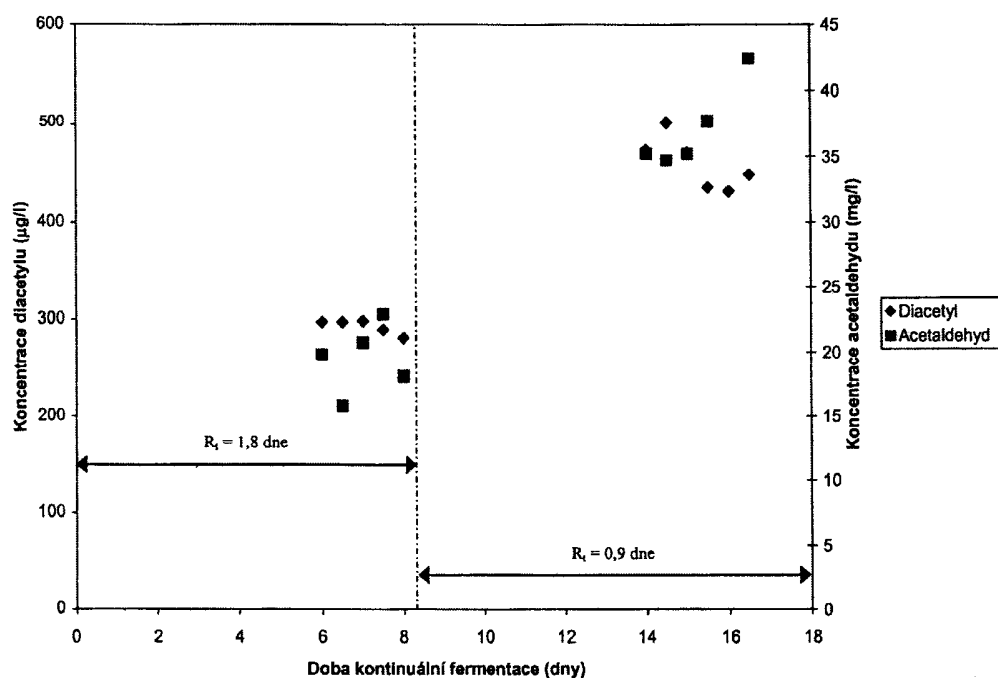
5

Koncentrace fermentačního produktu ethanolu v kapalně fázi se skokovou změnou doby zdržení kapaliny poklesla. Systém jako celek však při rychlejší době zdržení kapaliny produkoval více ethanolu, vyjádřeno hmotnostním průtokem. Protože cílem této práce bylo nejen izolovaně produkovat ethanol, ale spíše získat pivo s vyvážeností mnoha složek, musí být maximalizace produktivity ethanolu vyvážena s dalšími faktory. Na konci komerční primární fermentace piva musí být spotřebována většina zkvasitelného glukózového substrátu.

10

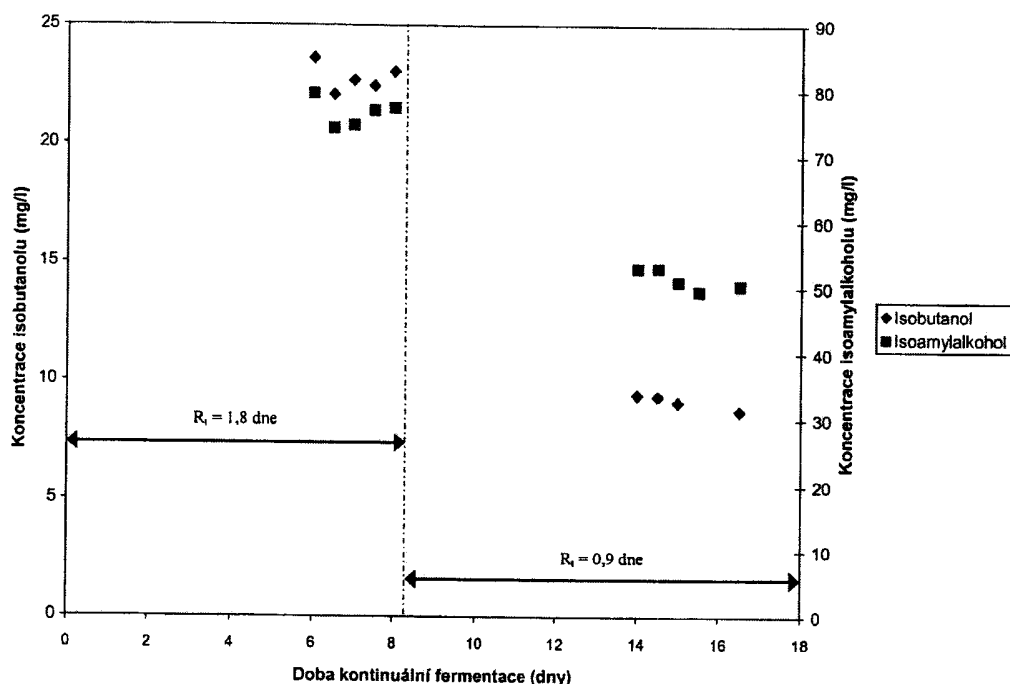
Na obr. 7.26 je uvedena odpověď koncentrace acetaldehydu a celkového diacetylů na skokovou změnu průtoku sladiny. U obou analytů jejich koncentrace i produktivita vzrostla se snížením doby zdržení kapaliny. Během vsázkové fermentace piva je během několika prvních dní fermentace kvasinkami vylučován acetaldehyd (Kunze, 1996).

15



Obr. 7.26. Koncentrace celkového diacetylů a acetaldehydu v kapalně fázi v závislosti na relativní době kontinuální fermentace, vliv doby zdržení kapaliny v bioreaktoru. R_1 je doba zdržení kapaliny v bioreaktoru ve dnech.

Obr. 7.25 a 7.27 ukazují vliv klesající doby zdržení v bioreaktoru na koncentrace vyšších alkoholů 1–propanolu, isobutanolu a isoamylalkoholu v kapalně fázi. U všech tří vyšších alkoholů po snížení doby zdržení v bioreaktoru koncentrace klesla.

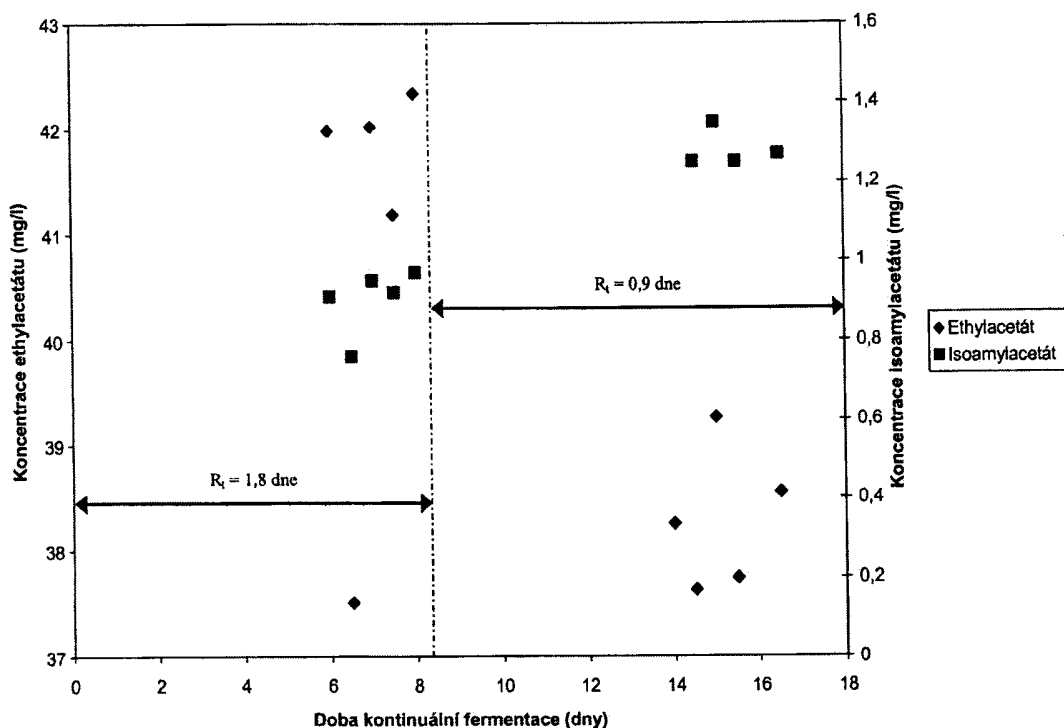


Obr. 7.27. Koncentrace isobutanolu a isoamylalkoholu v kapalně fázi v závislosti na relativní době kontinuální fermentace, vliv doby zdržení kapaliny v bioreaktoru. R_t je doba zdržení kapaliny v bioreaktoru ve dnech.

5

Hmotnostní průtoky ethylacetátu a isoamylacetátu uvedené v tabulce 7.3 (b) se oba v reakci na sníženou dobu zdržení kapaliny zvýšily. Na obr. 7.28 se koncentrace ethylacetátu v kapalně fázi snížila a koncentrace isoamylacetátu se zvýšila. Protože tento experiment umožnil zvýšení růstu kvasinek v kapalně fázi bez zvýšení dodávky kyslíku do systému, podporovaly podmínky v bioreaktoru produkci esterů. Hough et al. (1982) uvádějí, že podmínky zvýšeného růstu a sníženého kyslíku podporují tvorbu esterů.

10



Obr. 7.28. Koncentrace ethylacetátu a isoamylacetátu v kapalně fázi v závislosti na relativní době kontinuální fermentace, vliv doby zdržení kapaliny v bioreaktoru. R_t je doba zdržení kapaliny v bioreaktoru ve dnech.

7.2.4. Použití komerčního preparátu alfa-acetolaktát dekarboxylázy ke snížení celkového diacetylu během primární kontinuální fermentace piva

5

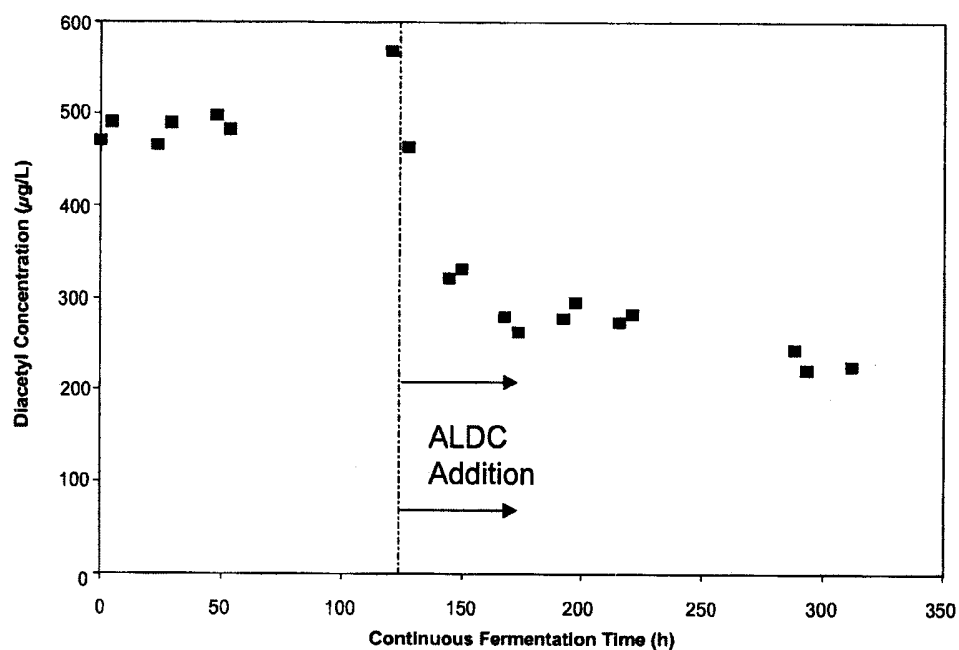
Experiment 1: Než mohl být pokus dokončen, byl bioreaktor kontaminován aerobně rostoucími Gram pozitivními koky. Bylo zjištěno, že byl kontaminován bioreaktor samotný, protože mikrobiologické testování sladiny kontaminaci nevykázalo. To ukázalo na nutnost modernizace bioreaktoru se zlepšenými zárukami proti kontaminaci. Avšak než byl systém uzavřen, byl pozorován pokles koncentrace celkového diacetylu, když byla k dodávce sladiny přidána ALDC. Z těchto dat však bohužel nebylo možno učinit jakýkoli závěr v důsledku matoucích efektů kontaminace.

10

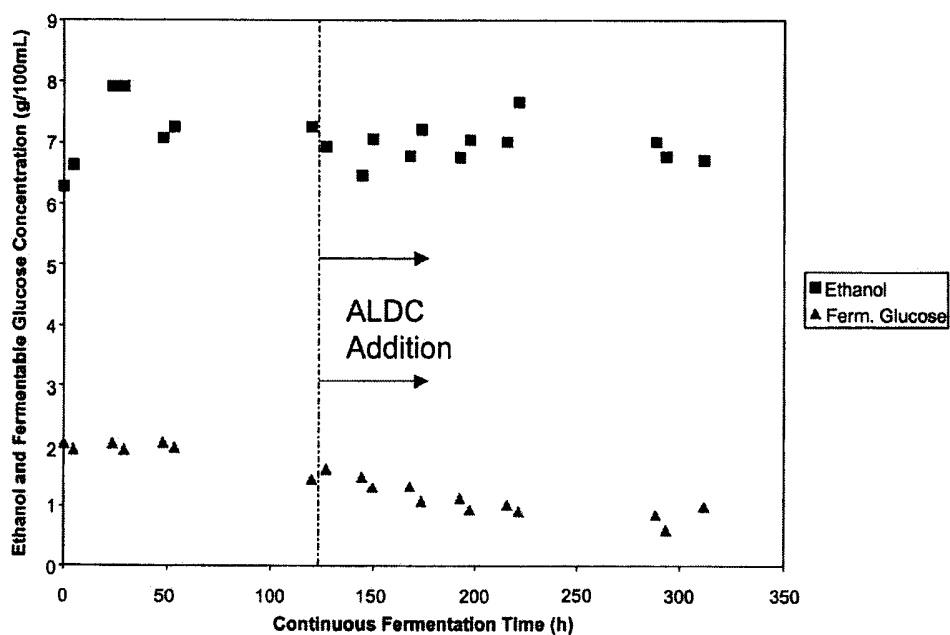
Experiment 2: Po četných modernizacích bioreaktoru pracoval systém během celé doby trvání experimentu 2 bez kontaminace. Data z tohoto experimentu jsou uvedena na obr. 7.29 až 7.31. V tabulce 7.5 jsou shrnuty průměrné koncentrace celkového diacetylu v pseudo-ustáleném stavu před přidávkou ALDC ke sladince a po něm. Celková koncentrace diacetylu klesla s přidávkou ALDC ke sladince o 47%, což činí použití tohoto enzymu slibným pro budoucnost (průměry jsou brány po třech dobách obrátu bioreaktoru). Jak je patrné na obr. 7.30 a 7.31, koncentrace celkových kvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza) a kvasinek se během tohoto pokusu mírně odchýlily, což mohlo být způsobeno mírnými rozdíly ve sladince, dodávané do bioreaktoru před a po přidávce ALDC.

15

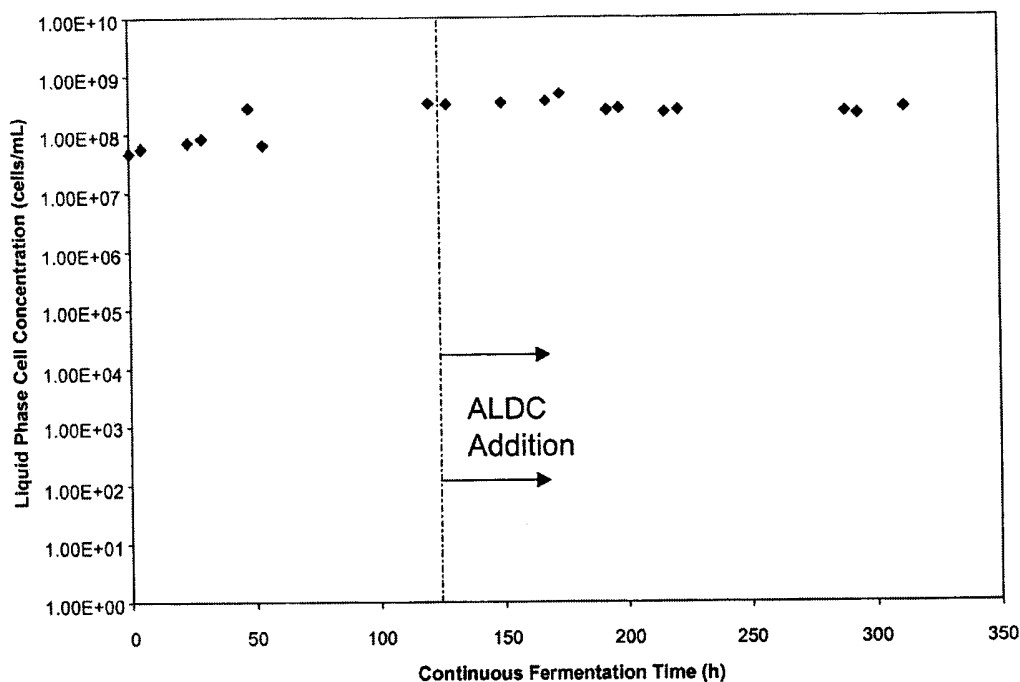
20



Obr. 7.29. Celková koncentrace diacetylů v kapalně fázi v závislosti na době kontinuální fermentace, efekt přidavku ALDC do fermentačního média sladiny, experiment 2.

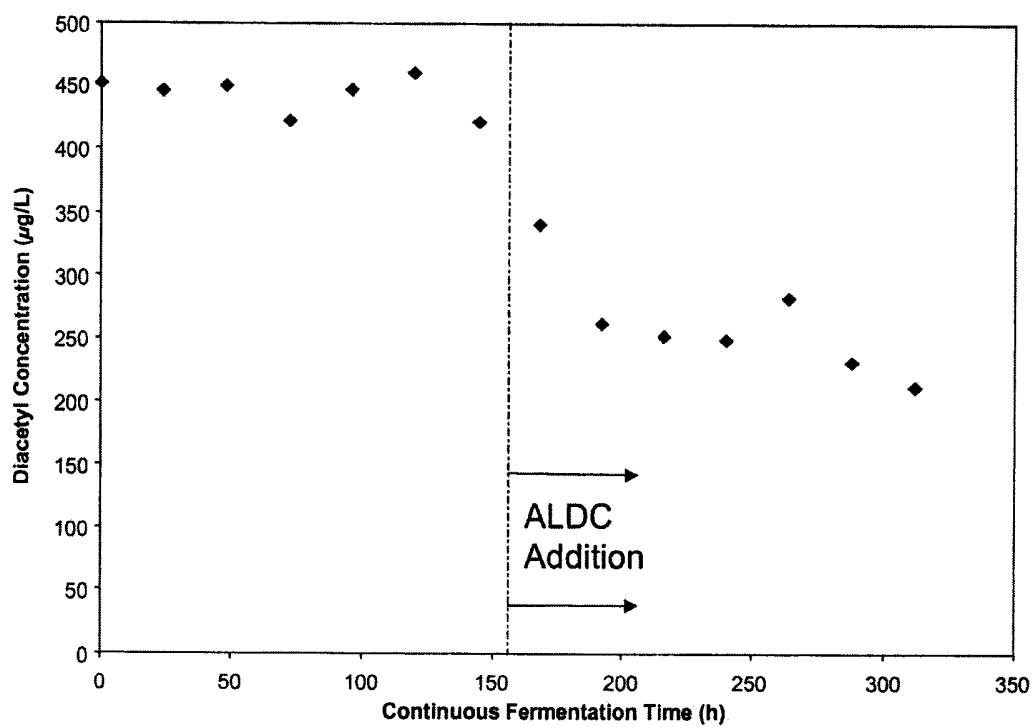


Obr. 7.30. Koncentrace zkvasitelných uhlohydrátů (jako glukóza) a ethanolu v kapalně fázi v závislosti na době kontinuální fermentace, efekt přidavku ALDC do fermentačního média sladiny, experiment 2.

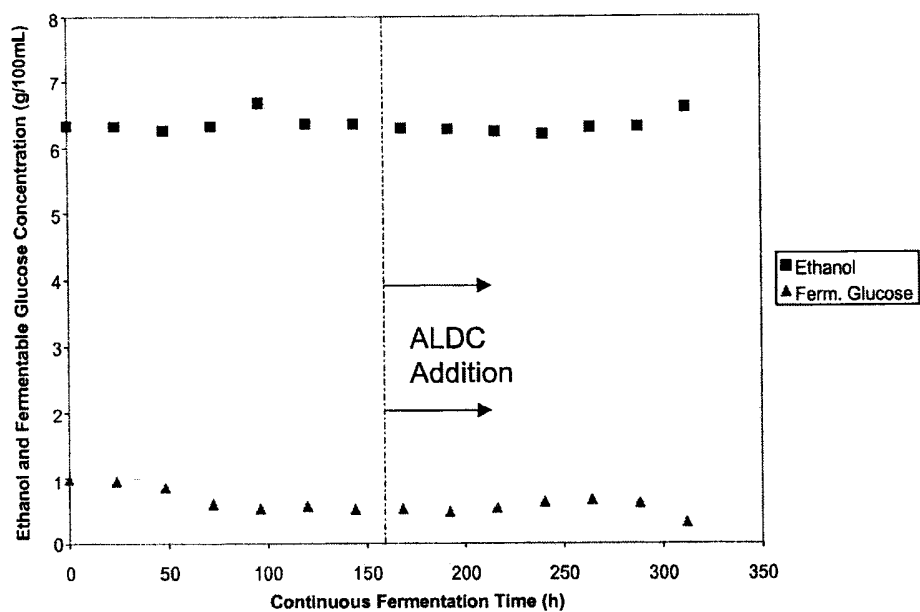


Obr. 7.31. Koncentrace kvasinek v kapaln  fázi v závislosti na době kontinu ln  fermentace, efekt p řidavku ALDC do fermentačního média sladiny, experiment 2.

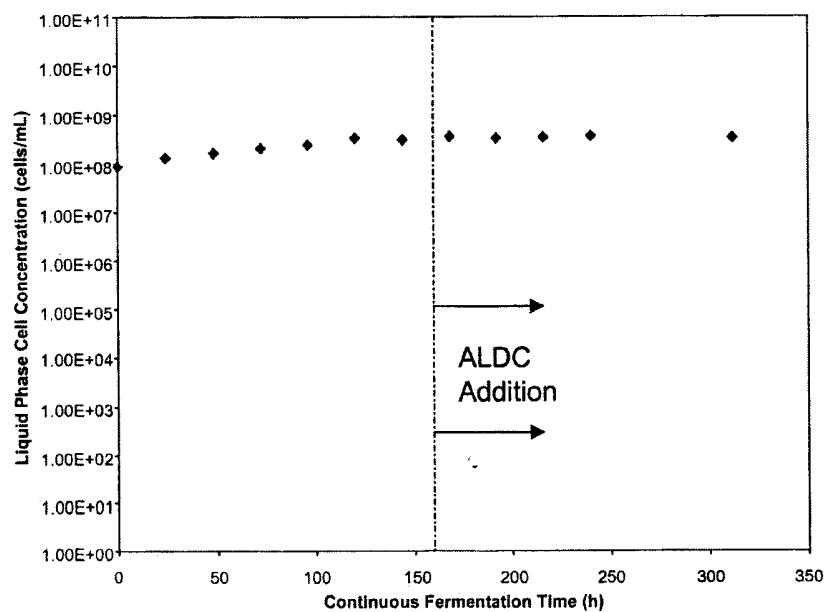
- Pro eliminaci potenci ln  matou ho vlivu variability sladiny bylo během experimentu 3 z varny odebráno velké množství sladiny (14 hl) a ALDC byla p řid na p ř mo ke sladiny zb yvaj c  v této uchovávací nádobě, jakmile bylo dosaženo základních hodnot pseudo ust len ho stavu. Tím se dále odstranily potenci ln  nekonzistence sladiny, které mohly ovlivnit p r b h fermentace v experimentu 2. Tato uchovávací nádoba sladiny byla opat řena také probubláváním oxidu uhličitého tak, aby byla hladina rozpuštěného kysli ku ve sladiny udržována konzistentn  na nízké úrovni.
- Experiment 3: Obr. 7.32 až 7.34 ilustrují efekt p řidavku ALDC k z sob  sladiny na koncentrace celkového diacetylu, celkových z kvasiteln ch uhlohydrátů (jako glukóza), ethanolu a voln  suspendovaných kvasinek během kontinu ln  fermentace piva. Tabulka 7,6 udává také p r m rnou celkovou koncentraci diacetylu v pseudo ust len m stavu p řed a po p řidavku ALDC k z sob  sladiny (p r m ry brány po třech obrazech bioreaktoru). V   dn m okam ziku tohoto experimentu nebyla detekována kontaminace. Koncentrace celkového diacetylu se po p řidavku ALDC sn řila o 45 %. Nebyly pozorovány v znamn  rozdi y v koncentraci ethanolu, celkových z kvasiteln ch uhlohydrátů (jako glukóza) ani voln  suspendovaných kvasinek, což souhlasí se vs zkov mi hodnotami, které zjistili Aschengreen a Jepsen (1992).



Obr. 7.32. Celková koncentrace diacetylu v kapaln  fázi v závislosti na době kontinu ln  fermentace, vliv p řidavku ALDC k fermentačnímu médiu sladiny, experiment 3.



Obr. 7.33. Koncentrace ethanolu a celkových zkvasitelných cukrů (jako glukóza) v kapalně fázi v závislosti na době kontinuální fermentace, vliv přidavku ALDC k fermentačnímu médiu sladiny, experiment 3.



Obr. 7.34. Koncentrace kvasinek v kapalně fázi v závislosti na době kontinuální fermentace, vliv přidavku ALDC k fermentačnímu médiu sladiny, experiment 3.

Výsledky experimentů 2 a 3 ukazují, že ALDC při kontinuální fermentaci v bioreaktorech s plynovým výtahem skutečně měla významný vliv na celkovou koncentraci diacetylu a poskytla průměrné snížení koncentrace celkového diacetylu 46 %. To umožňuje snížit nebo odstranit sekundární zpracování za účelem snížení koncentrace diacetylu v kontinuálních systémech s plynovým výtahem. Pro tyto počáteční experimenty bylo použito relativně vysokého dávkování ALDC a pokud by měl být tento enzym na proces aplikován, bylo by nutno optimalizovat množství, způsob a dobu jeho dávkování do sladiny. Dalších úspor by bylo možno dosáhnout, kdyby byl k dispozici enzym s vyšší aktivitou za podmínek pivovarských fermentací nebo kdyby enzym sám byl imobilizovaný, což by umožnilo jeho opětovné použití (Dulieu et al., 1996). Jinou úvahou by byla přijatelnost enzymových přísad, které byly získány s použitím geneticky upravených organismů, pro veřejnost.

Při dávce 2 kg/1000 hl, doporučené dodavatelem, a při ceně komerčního enzymového přípravku \$131,05/kg by se materiálové náklady fermentace zvýšily o \$0,26 / hl. V provedených experimentech bylo použito dávkování enzymu 72 µg/l (108 ADU/l), čili 7,2 kg/1000 hl ALDC, což znamená zvýšení materiálových nákladů o \$0,94/hl. Ekonomičnost použití ALDC pro snižování diacetylu při kontinuálních fermentacích s plynovým výtahem bude záviset na optimálním dávkování enzymu za podmínek bioreaktoru a na době ušetřené jeho použitím.

Tabulka 7.5. Souhrn průměrného efektu přídavku ALDC k fermentačnímu médiu sladiny v pseudo-ustáleném stavu na koncentraci celkového diacetylu během kontinuální fermentace piva v bioreaktoru s plynovým výtahem.

Experiment	Průměrná koncentrace celkového diacetylu		Procento snížení diacetylu
	(µg/l)		
	(bez ALDC)	(ALDC, 60 µl/l)	
Experiment II	495	260	47
Experiment III	445	245	45

*průměry založeny na hodnotách pseudo-ustáleného stavu po třech obrazech reaktoru

Výše uvedené podporuje domněnku, že kontinuální fermentace s použitím imobilizovaných kvasinek a asociovaných volných kvasinek v systému bioreaktoru s plynovým výtahem a sací trubicou je při výrobě piva reálnou alternativou k vsázkové fermentaci na základě následujících kritérií:

- dosaženo vyrovnané chuti
- vyšší objemová produktivita bioreaktoru
- minimální složitost
- prokázaný dlouhodobý kontinuální provoz
- regulace vzduchu (kyslíku) ve fluidizačním plynu pro kontrolu chuti
- možnost přídavku enzymu α -acetolaktát dekarboxylázy pro kontrolu diacetylu
- žádná bakteriální kontaminace
- finanční přínos.

Existuje ještě mnoho oblastí, které je nutno dále studovat, ale tato technologie je připravena k testování ve větším měřítku. Bioreaktory s plynovým výtahem se již v průmyslovém měřítku používají pro zpracování odpadní vody, takže zvětšení měřítka systému kontinuální fermentace piva se jeví technicky schůdným. Uvádí se, že pivovar Grolsch v Nizozemsku používá pro zpracování svých odpadních vod bioreaktor s plynovým výtahem o objemu 230 m³ (Driessen et al., 1997). Jednou z největších bariér pro kontinuální fermentaci v pivovarském průmyslu v komerčním měřítku může být přijatelnost nového procesu pro pivovarníky, protože jde o odvětví, které je hluboce svázáno s tradicí.

Údaje získané pro sekundární metabolity kvasinek, vznikající během kontinuální fermentace piva, prováděné v této práci, osvětlily význam regulace kyslíku ve fluidizačním plynu pro tvorbu chuti piva. Zjištěné výsledky ukázaly, že za daných provozních podmínek zvýšení množství vzduchu v bioreaktoru způsobilo zvýšení acetaldehydu, diacetylu a vyšších alkoholů (isoamylalkoholu a isobutanolu), zatímco koncentrace esterů (isoamylacetátu, ethylhexanoátu, ethyloktanoátu) a ethanolu se snížily. Z těchto dat vyplývá, že existuje možnost kontroly chuti piva pomocí složení fluidizačního plynu do bioreaktoru, a tudíž možnost výroby jedinečných produktů.

S výjimkou doby, kdy byl z fluidizačního plynu odstraněn vzduch, byla v kapalně fázi bioreaktoru udržována koncentrace volně suspendovaných kvasinek vyšší než 10⁸ buněk/ml. V systému tedy v bioreaktoru koexistovala více než jedna populace kvasinek, imobilizované kvasinky a kvasinky suspendované v kapalně fázi. Vzhledem k velkému množství životaschopných kvasinek, rostoucích v kapalně fázi bioreaktoru, existuje možnost použití kontinuálního bioreaktoru jako propagátoru kvasinek.

Když byla po skončení kontinuální primární fermentace přidána 48h vsázková prodleva, byl získán chuťový profil, který byl v mezích pro tržní piva. Teplota této prodlevy byla 21 °C a experimentálně byl prokázán význam minimalizace vystavení kapaliny vlivu kyslíku během prodlevy pro tvorbu chuti. Zavedením prodlevy se proces prodlouží o dva dny a zkomplikuje, ale stále je významně rychlejší než komerční vsázkové fermentace, která trvá mezi sedmi a čtrnácti dny.

Konečným ideálním stavem by bylo sekundární prodlevu zcela eliminovat optimalizací podmínek v primárním kontinuálním bioreaktoru. Dalšího zkrácení sekundární prodlevy lze však krátkodobě dosáhnout optimalizací teploty prodlevy (odstraňování diacetylu kvasinkami je silně závislé na teplotě), množství zkvasitelných cukrů zbývajících v kapalině na začátku prodlevy, koncentrace přítomných kvasinek, hydrodynamických charakteristik nádoby pro prodlevu (odstraňování diacetylu může být zlepšeno zlepšením kontaktu mezi kvasinkami a pivem) a pomocí dalších opatření k eliminaci kyslíku z tohoto stupně.

Další výzkumníci (Kronlof a Virkajarvi, 1996; Nakanishi et al., 1993; Yamauchi et al., 1995) se zaměřili na vývoj víceetapové kontinuální fermentace, ve které v prvním stupni kontinuální fermentace (aerobní) dochází k pouze částečné spotřebě zkvasitelných cukrů přítomných ve sladidě. Tato strategie sice vykazala určitý úspěch, pokud jde o produkci chuti, ale tyto systémy jsou složité. První aerobní stupeň těchto systémů navíc vytváří prostředí, které je náchylnější k mikrobiální kontaminaci (tj. vysoká koncentrace cukrů, teplota a kyslík s nízkou koncentrací ethanolu). V bioreaktoru s plynovým výtahem, popsaném v této práci, má bioreaktor v ustáleném stavu nízkou koncentraci zkvasitelných cukrů, nízké pH, vysokou koncentraci ethanolu a nízkou koncentraci kyslíku, což činí prostředí nehostinným pro potenciální kontaminanty. V méně rozvinutém pivovarnictví je minimalizace složitosti a vývoj robustního procesu, odolného vůči kontaminaci, významným faktorem úspěchu.

Přídavek komerčního přípravku alfa-acetolaktát dekarboxylázy (ALDC) ke sladidě dodávané do kontinuální fermentace vykázal průměrné snížení diacetylu o 46 %. Protože však ALDC je enzym, který je produkován geneticky upraveným organismem (GMO), existují zde problémy s vnímáním veřejností, na které je nutno brát ohled před použitím takového enzymu v komerčním

produktu. Kromě toho komerčně dostupné enzymy pro kontrolu diacetylu nemají optimální aktivitu za podmínek fermentace.

V průběhu šesti měsíců kontinuální fermentace s použitím imobilizace kappa-karagenanovým gelem si volně suspendované kvasinky v kapalně fázi uchovaly životnost větší než 90 %, zatímco životnost imobilizovaných kvasinek klesla na méně než 60 %. Fotografie z elektronového mikroskopu odhalily, že kvasinky umístěné blízko obvodu gelové perličky měly vícečetné jizvy po očkách a pravidelnou morfologii, zatímco kvasinky v blízkosti jádra perličky měly nepravidelný tvar a méně jizev po očkách, což ukazuje na zhoršený růst. Z mikrofotografií také vyplývá, že kvasinky umístěné v blízkosti jádra perličky vykazovaly znaky stárnutí. Jako je diskutováno v sekci 5, kappa-karagenanový gel má mnoho vlastností, které jej činí žádoucí imobilizační maticí pro kvasinky. Není však v současnosti k dispozici žádná průmyslová metoda výroby perliček, a protože kvasinky jsou v matici zachycovány jako součást procesu vzniku perliček, zvyšuje manipulace s perličkami v komerčním zařízení jeho složitost a náklady. V budoucnu by měly být zkoumány další metody imobilizace, jako je autoagregace nebo flokulace. Tím by se odstranila komplikovanost manipulace s perličkami v průmyslovém prostředí, a pokud by docházelo k pravidelnému praskání vloček kvasinek, bylo by zajištěno, že jsou z bioreaktoru pravidelně odstraňovány zestárlé kvasinky.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby alkoholických nápojů, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se použije bioreaktor s plynovým výtahem s vnitřní cirkulací k provedení stupně kontinuální fermentace, v němž je sladina obsahující zkvasitelné cukry počátečně zfermentována s použitím flokulentních kvasinek imobilizovaných autoagregací za omezené dodávky kyslíku a alespoň částečně zfermentovaný výstup z kontinuálního procesu se vede pro dokončení do stupně vsázkového zpracování.
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že alkoholickým nápojem je pivo.
3. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pivem je pivo světlého typu.
4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pivem je ležák.
5. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pivem je pivo severoamerického typu.
6. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kvasinkami jsou vysoce flokulentní nebo superflokulentní kvasinky.
7. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že fermentací je primární fermentace.
8. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že sladina se před fermentací probublává oxidem uhličitým.
9. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se v reaktoru používá probublávací oxid uhličitý obsahující asi 3 % kyslíku.
10. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dokončení primární fermentace se provádí v uvedeném stupni vsázkové prodlevy.

11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že se provádí snížení koncentrace diacetylu.
- 5 12. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že se provádí snížení koncentrace acetaldehydu.
13. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že koncentrace vyšších přiboudlinových alkoholů zůstává v podstatě nezměněna zpracovatelským stupněm vsázkové prodlevy.
- 10 14. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že výstup ze stupně kontinuální fermentace se rozvádí rozdělovačem do jedné z několika nádob vsázkové prodlevy, kde probíhá uvedený proces vsázkové prodlevy.
- 15 15. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedeným kontinuálním procesem je proces naočkování následujících vsázkových fermentací ve stupni vsázkové prodlevy.

20

22 výkresů

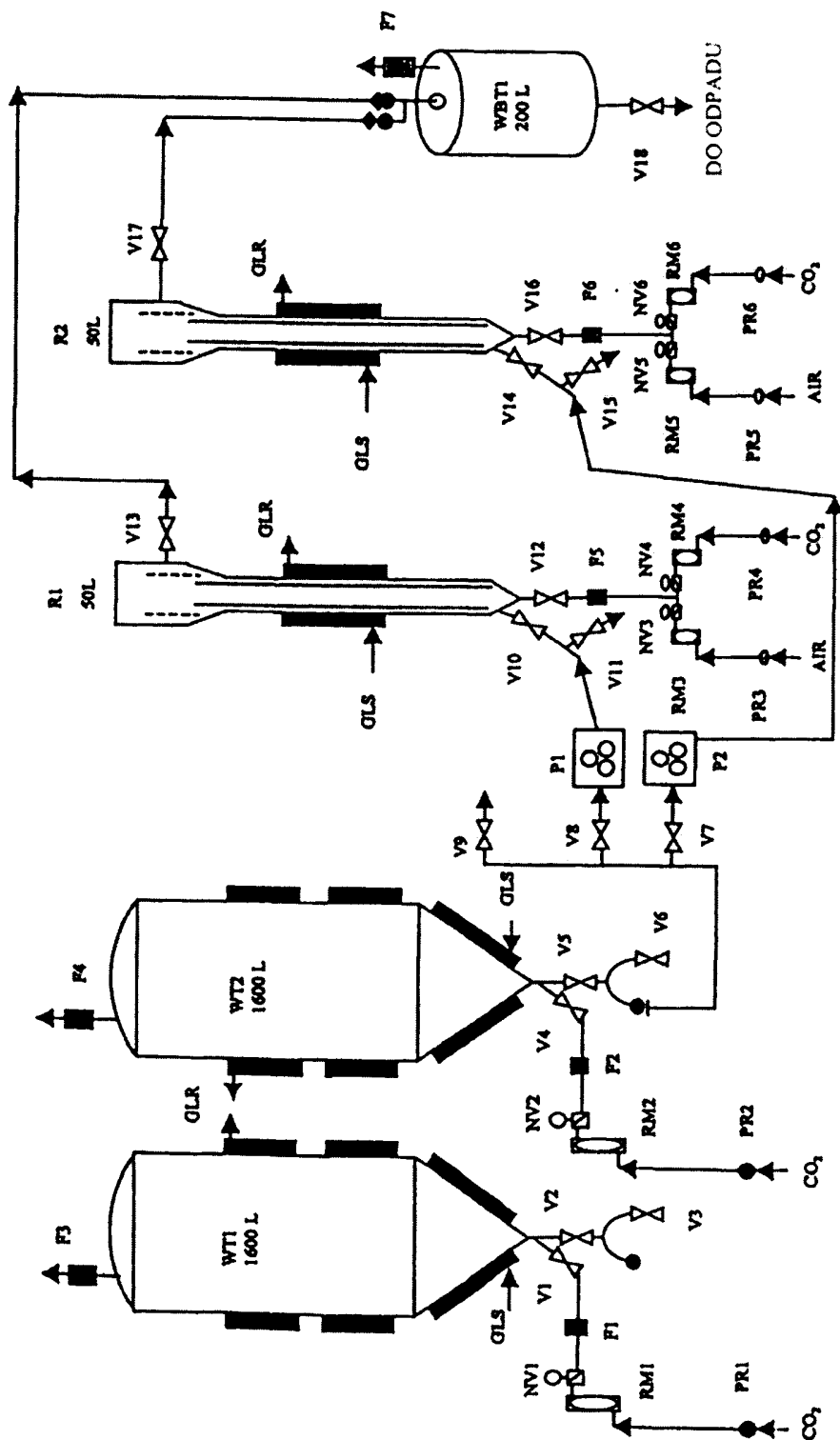


FIG. 1

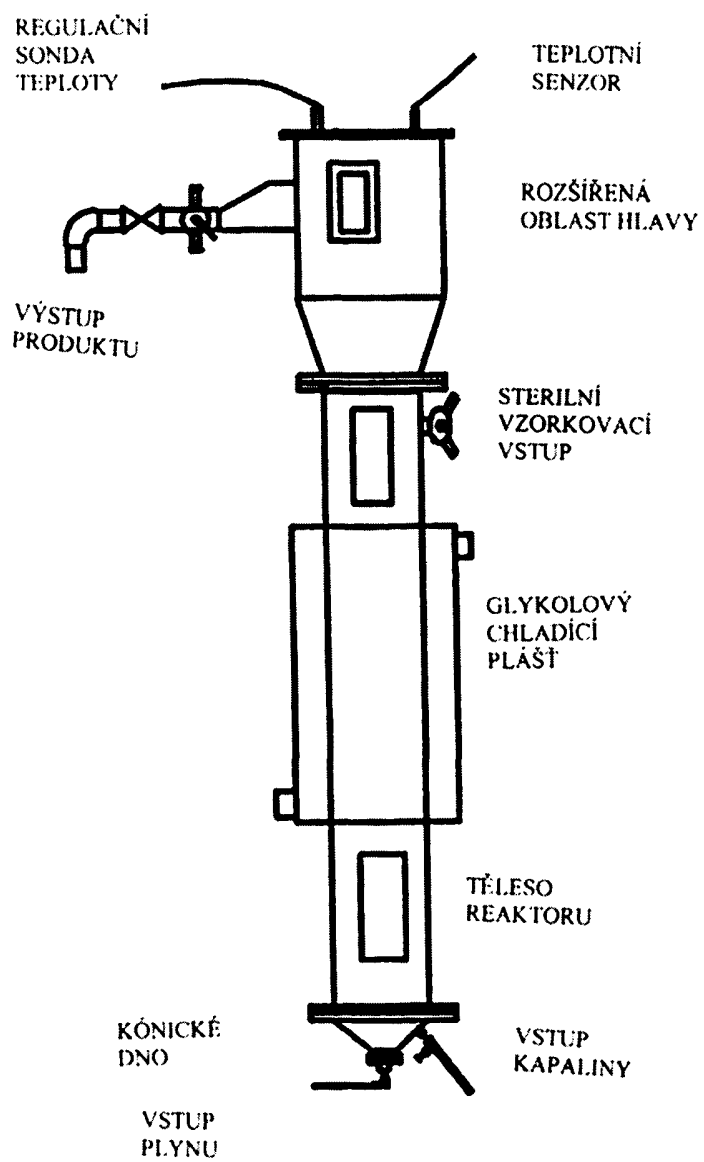


FIG. 2

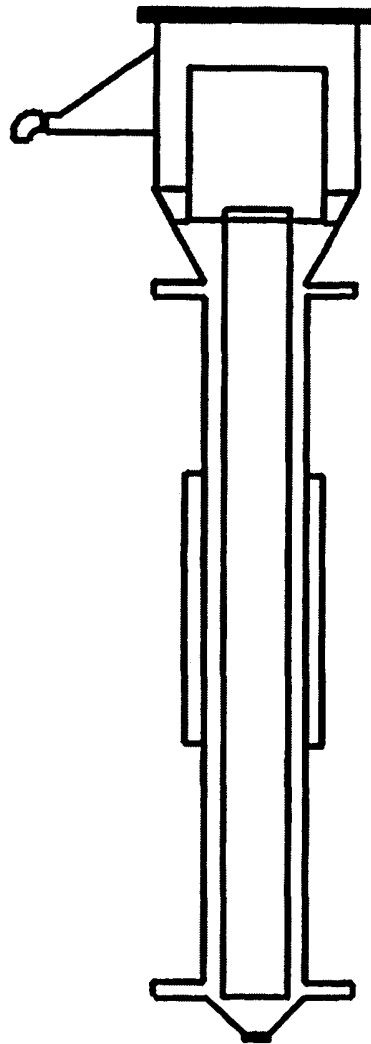


FIG. 3

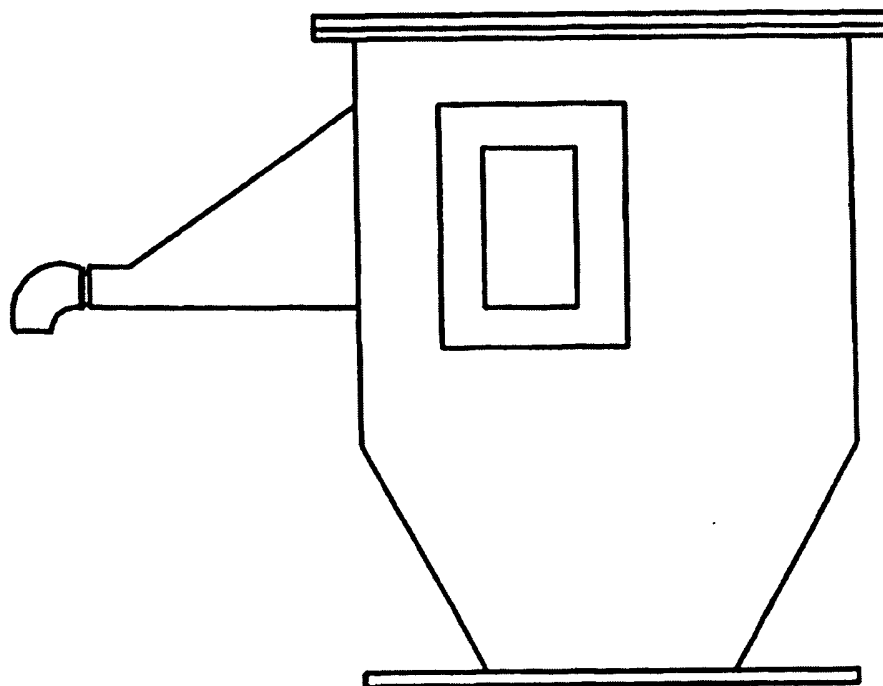


FIG. 4

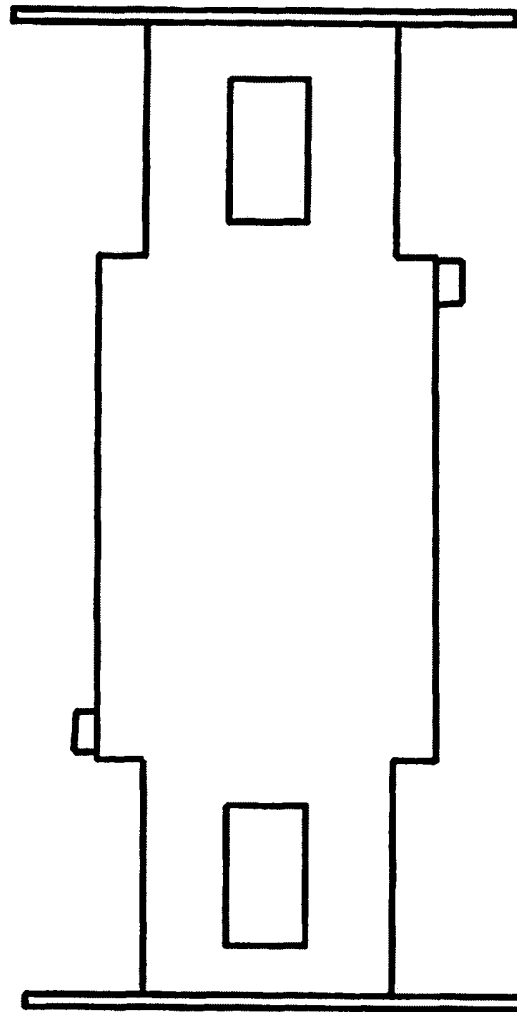


FIG. 5

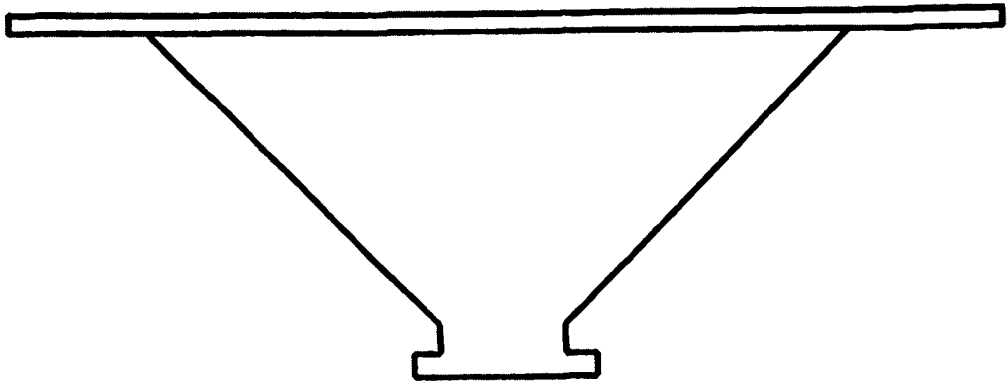


FIG. 6

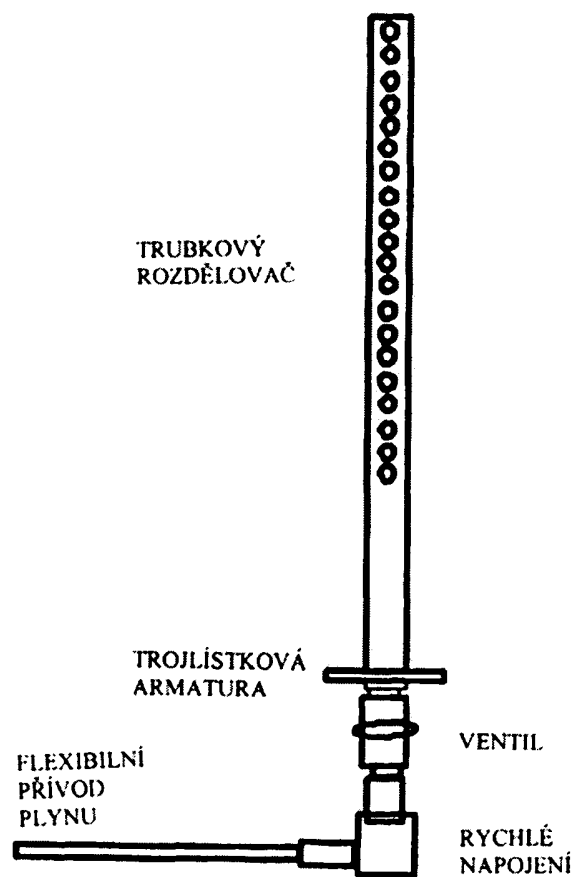


FIG. 7

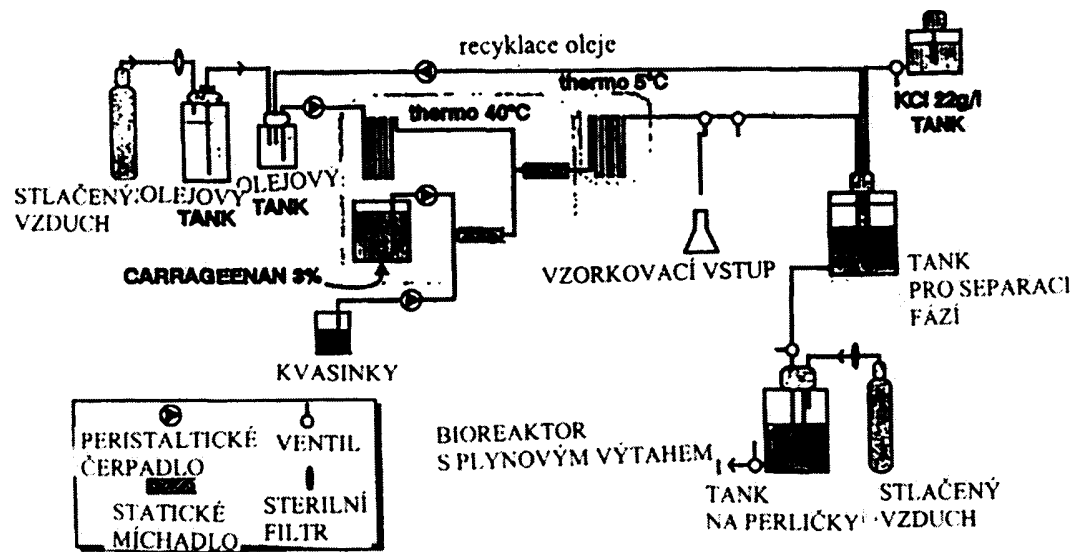


FIG. 8

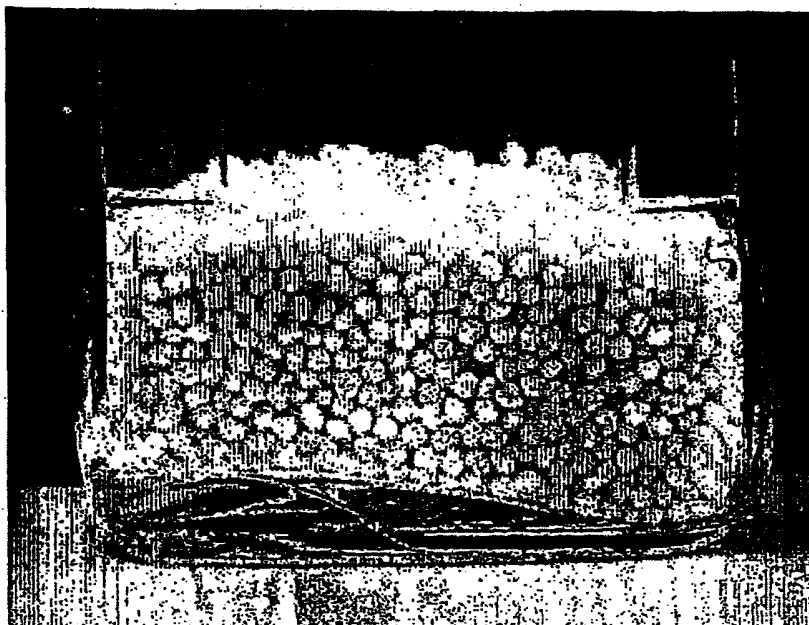


FIG. 9

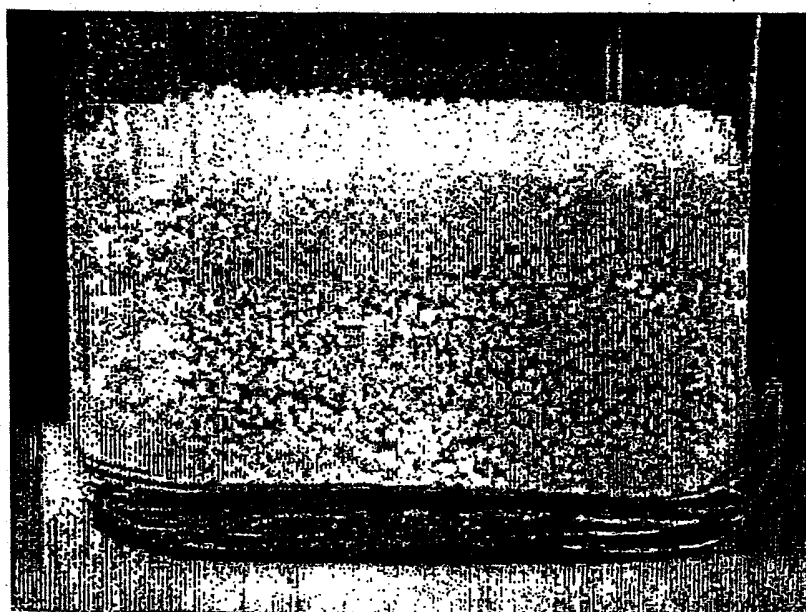


FIG. 10

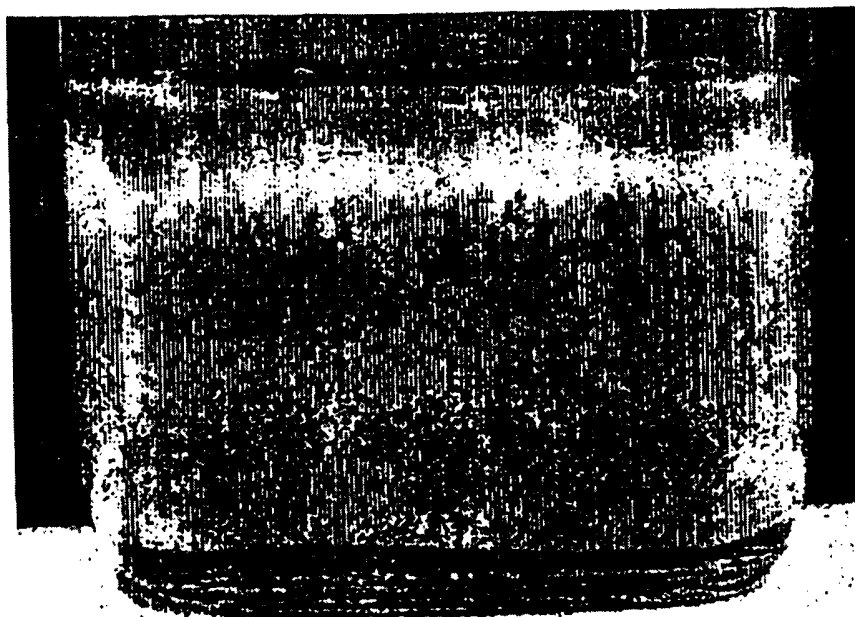


FIG. 11

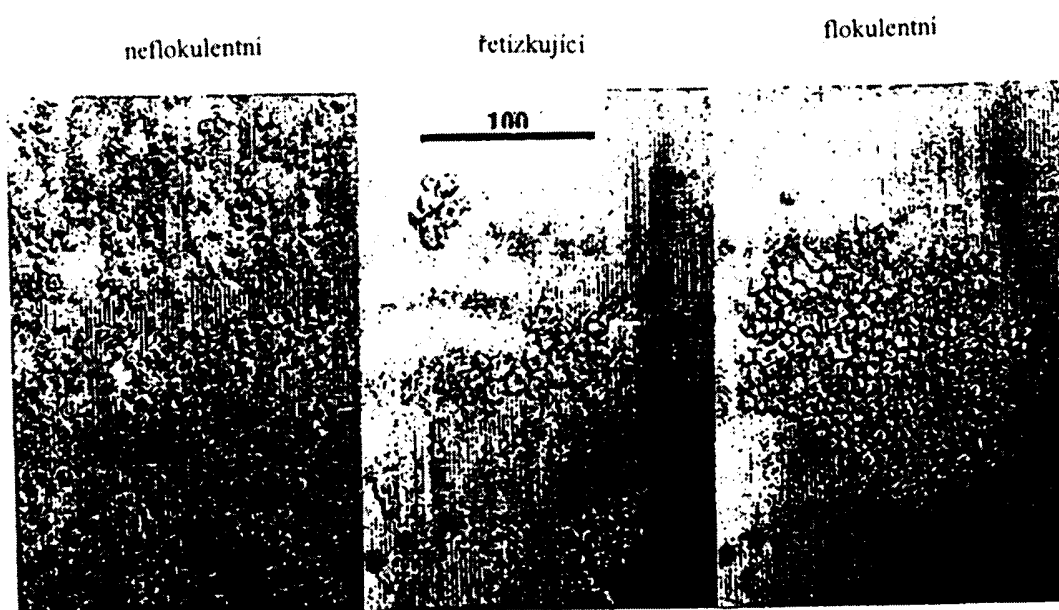


FIG. 12

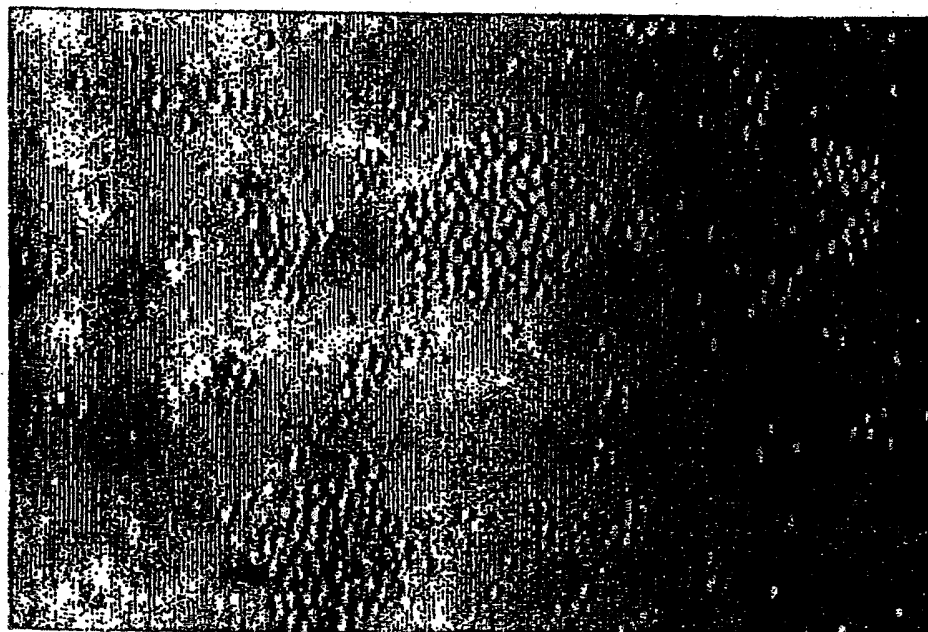


FIG. 13

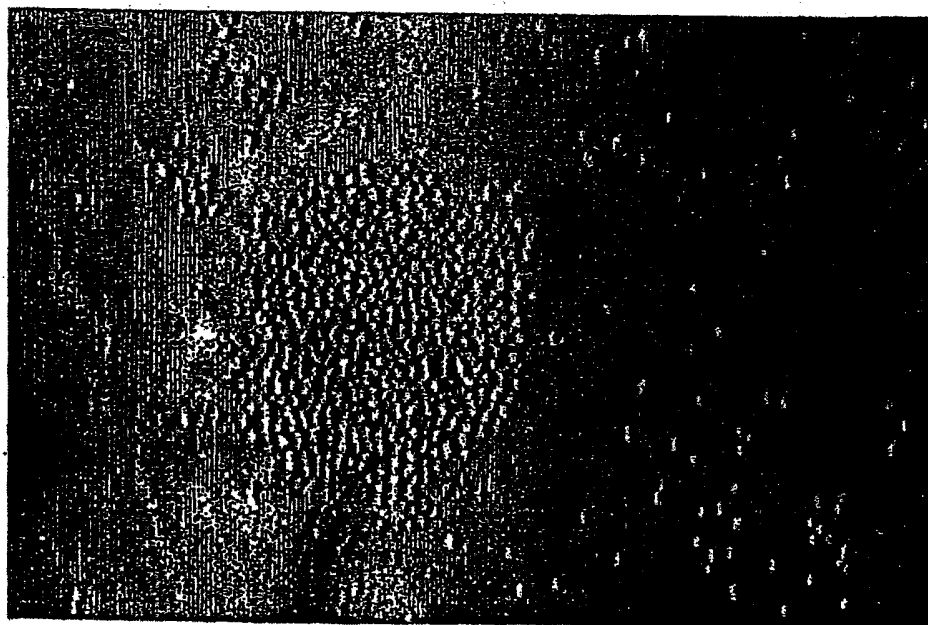


FIG. 14

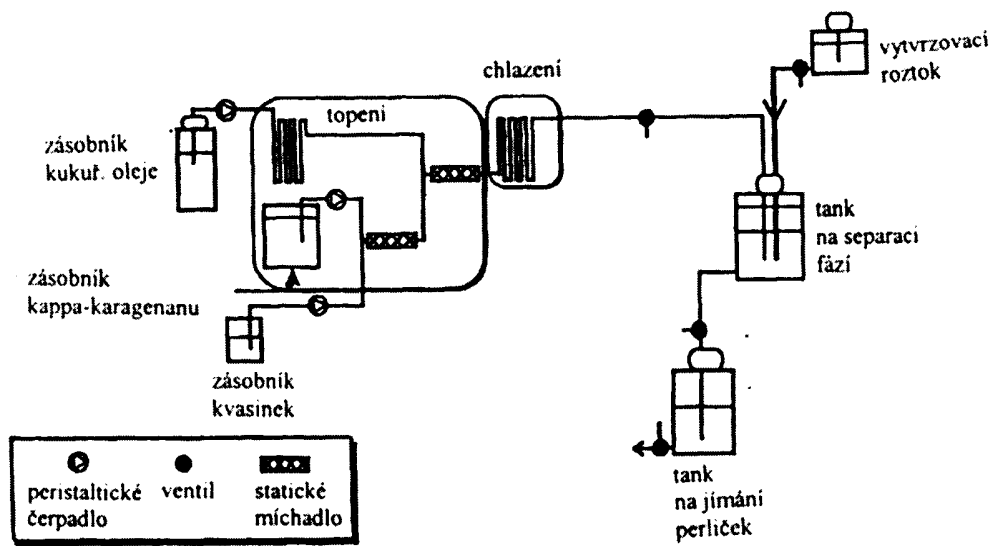


FIG. 15

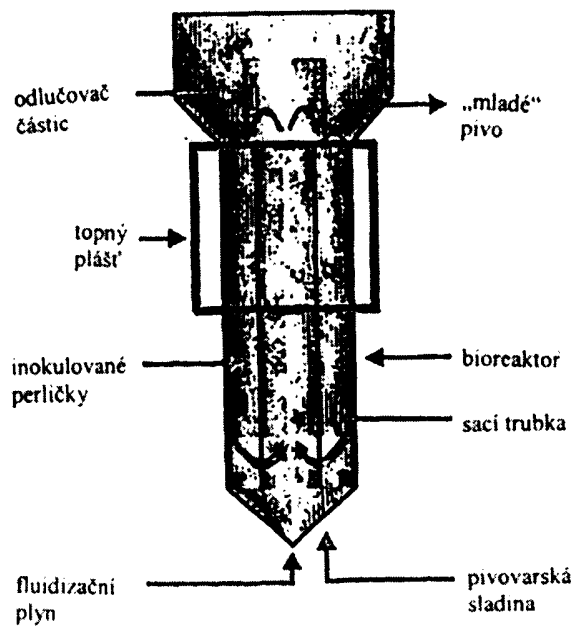
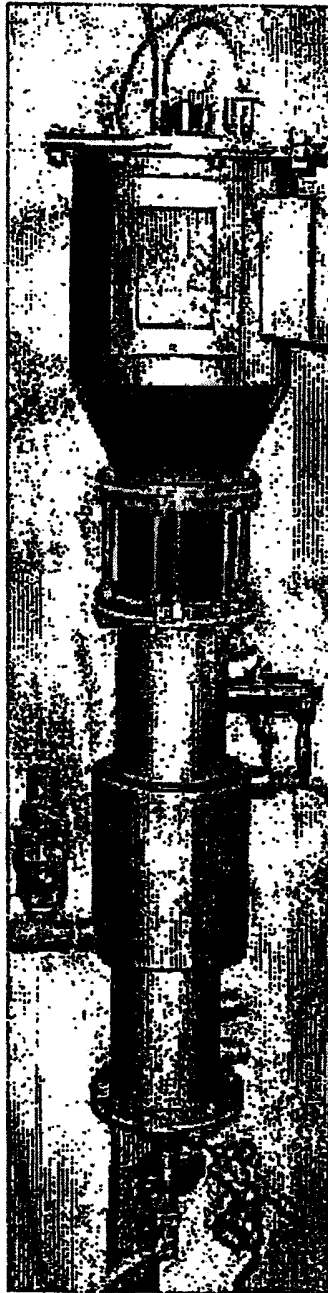


FIG. 16



5 cm

FIG. 17

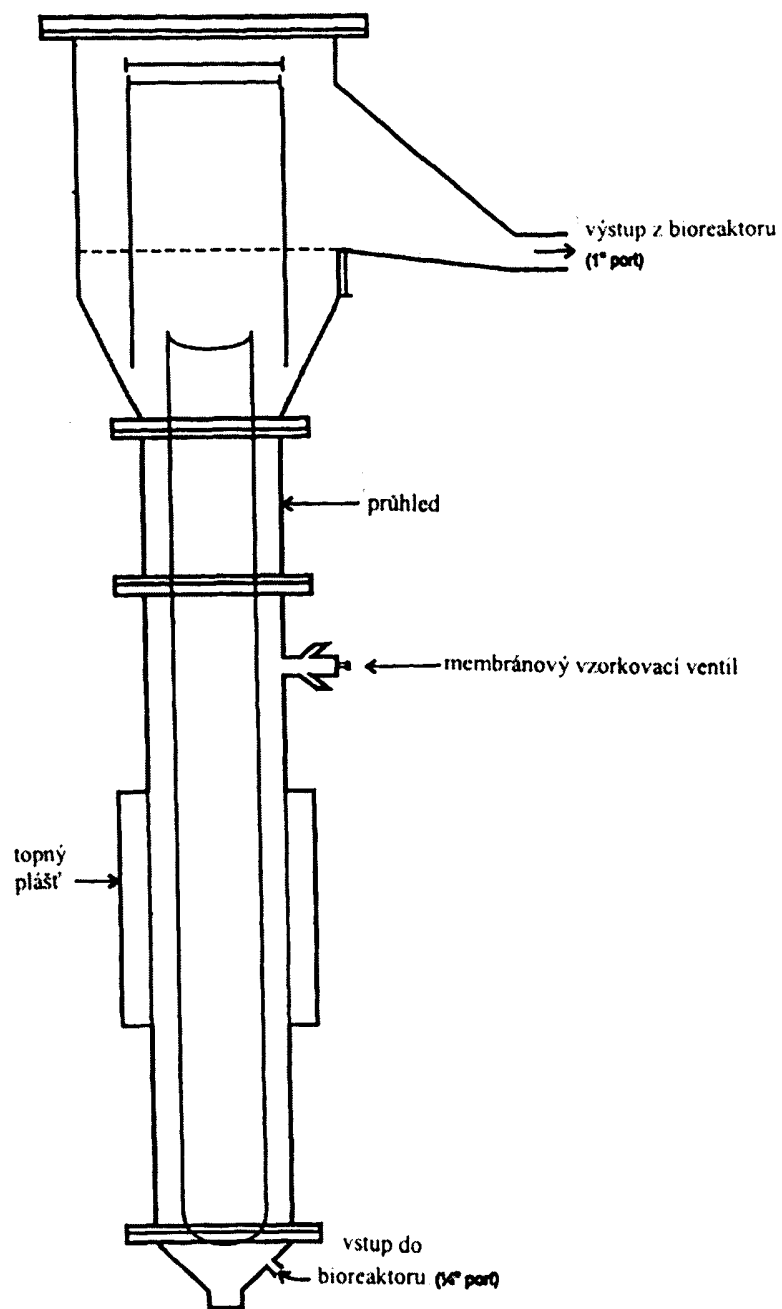


FIG. 18

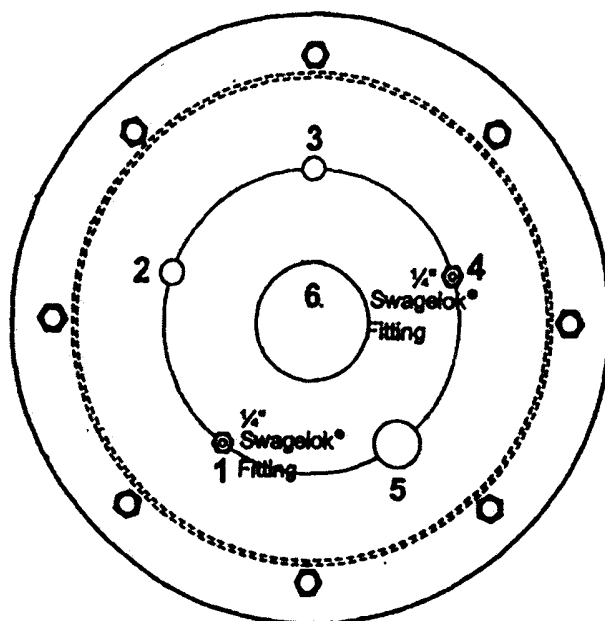


FIG. 19

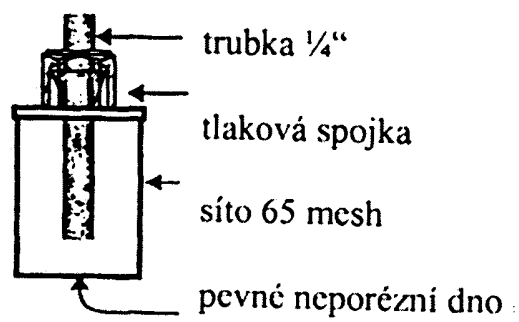


FIG. 20

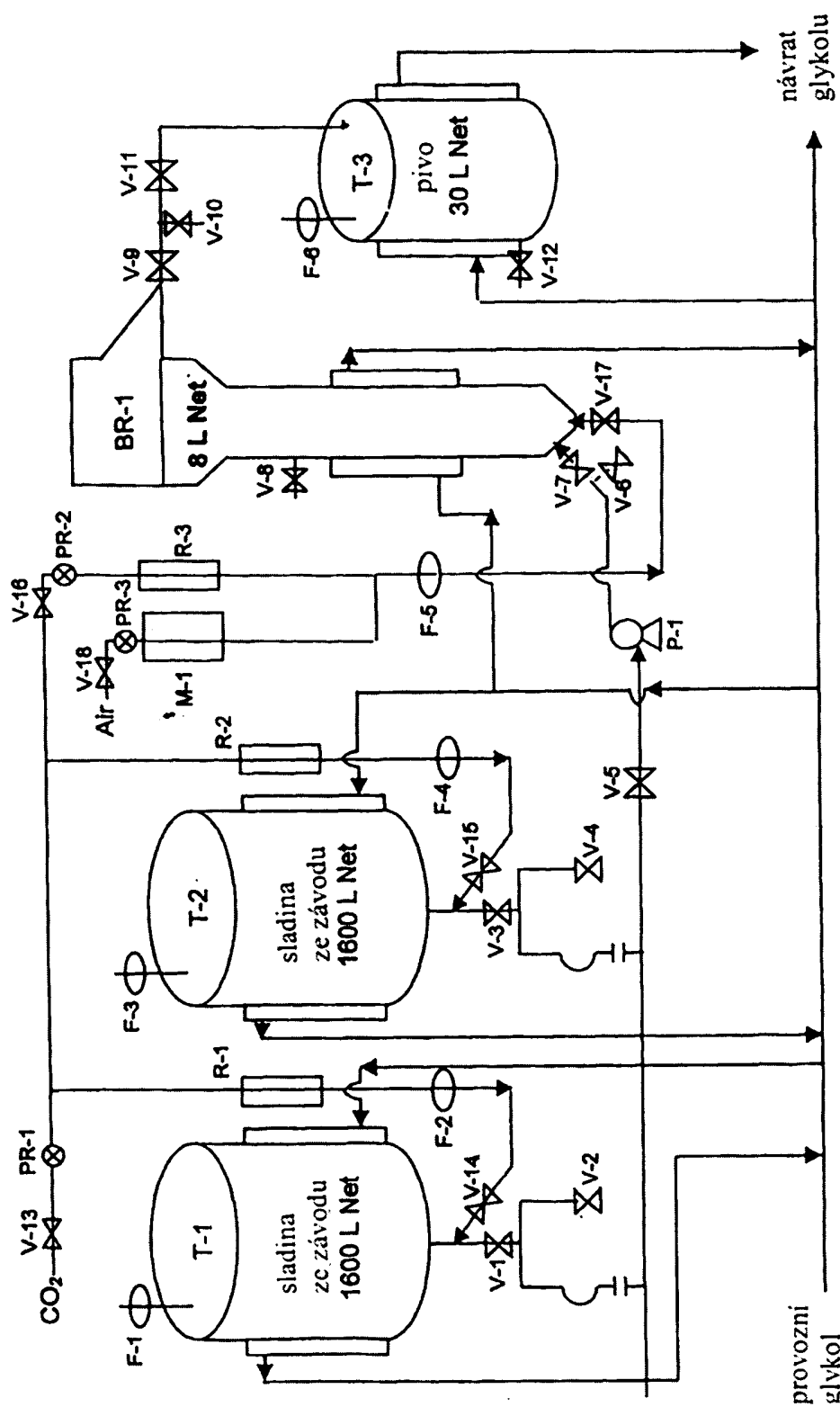
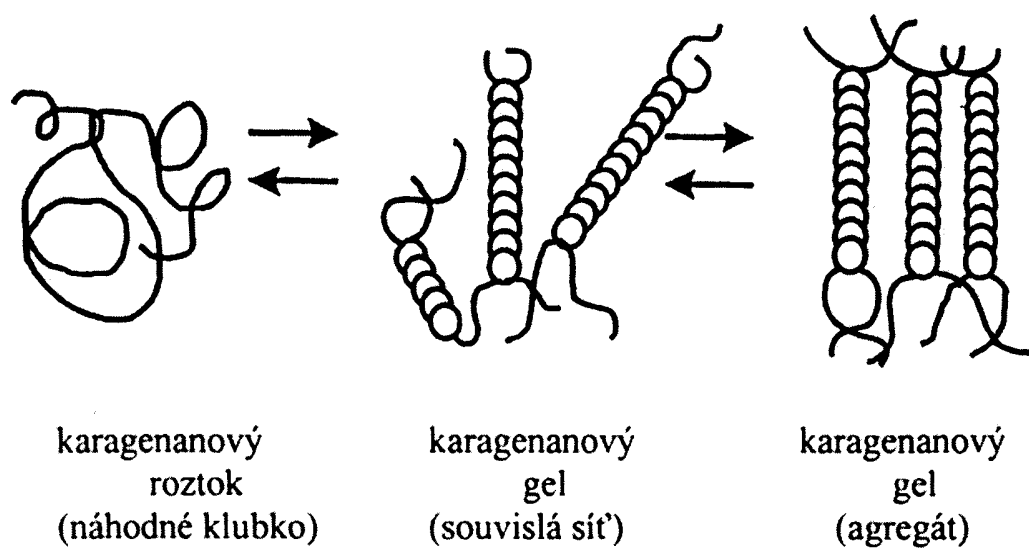


FIG. 21

**FIG. 22**

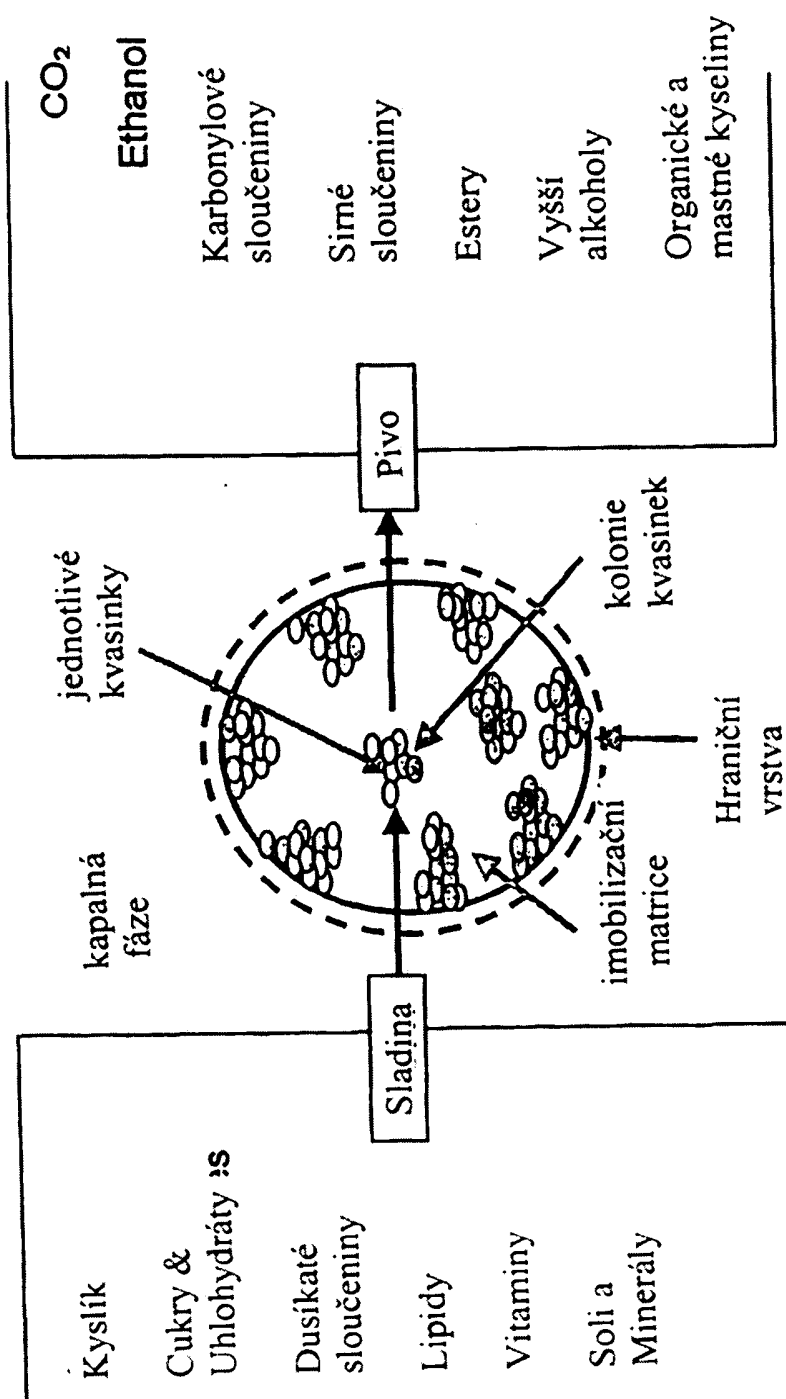


FIG. 23

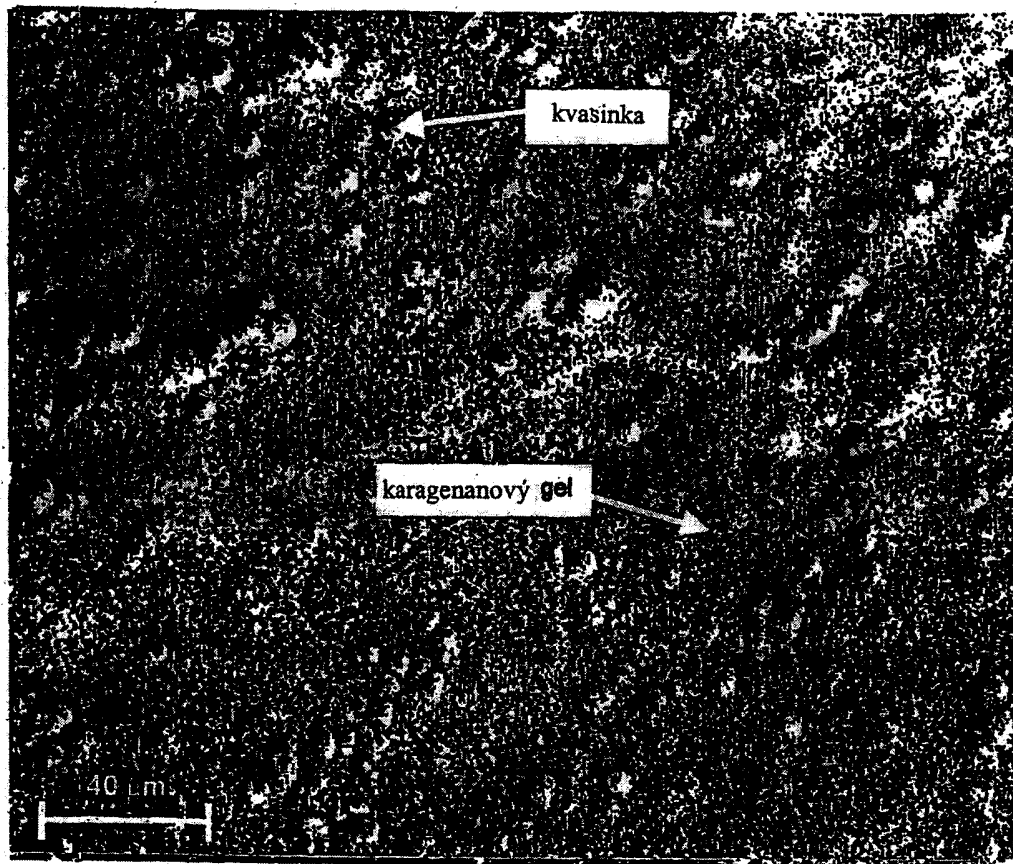


FIG. 24

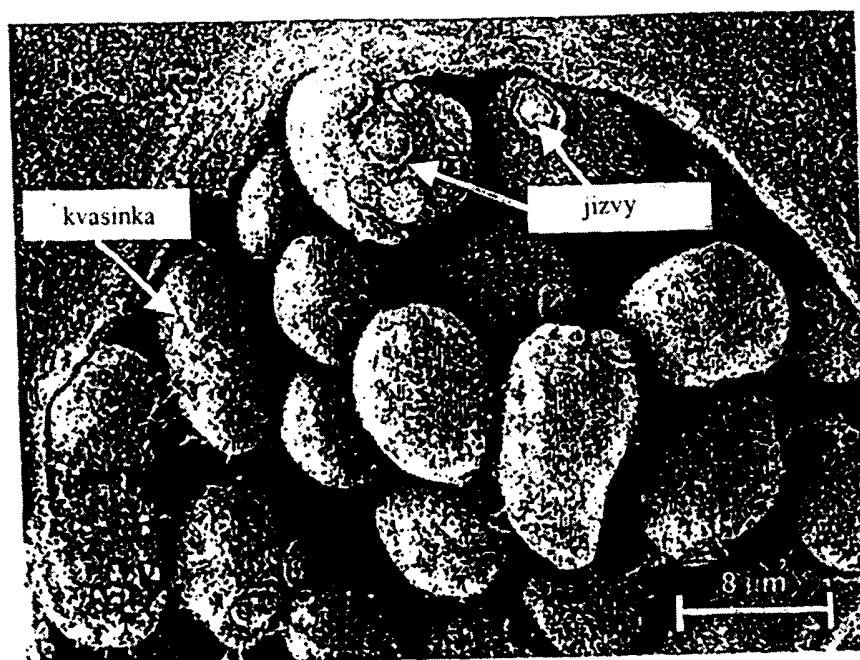


FIG. 25

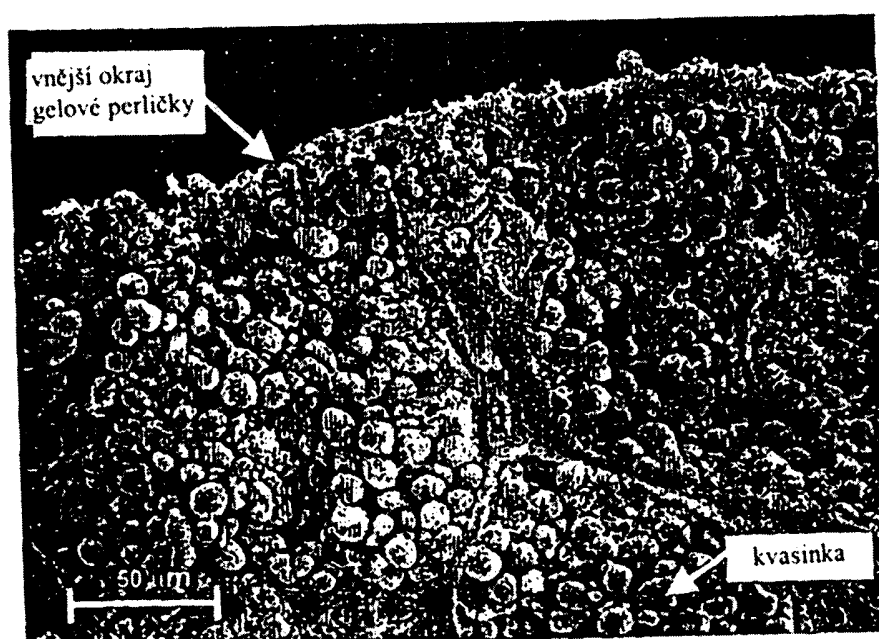


FIG. 26

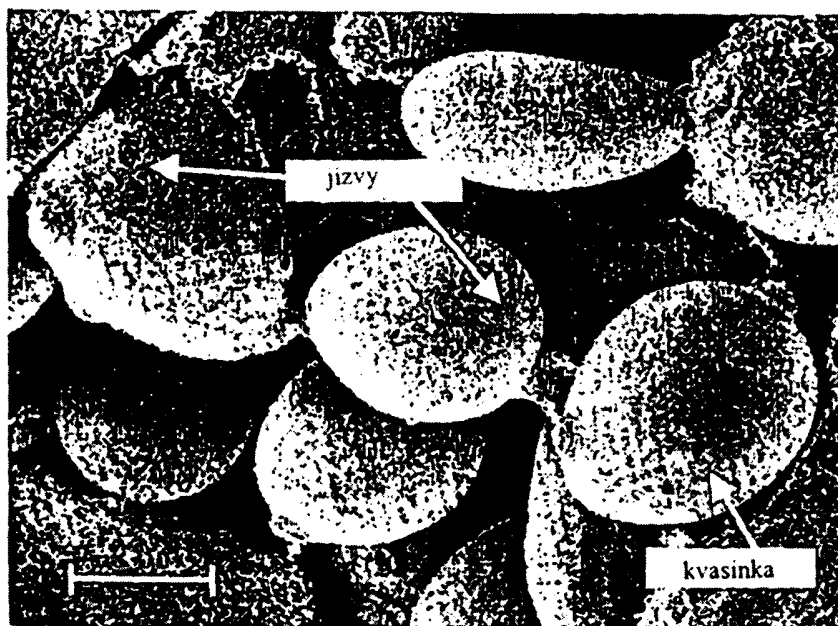


FIG. 27

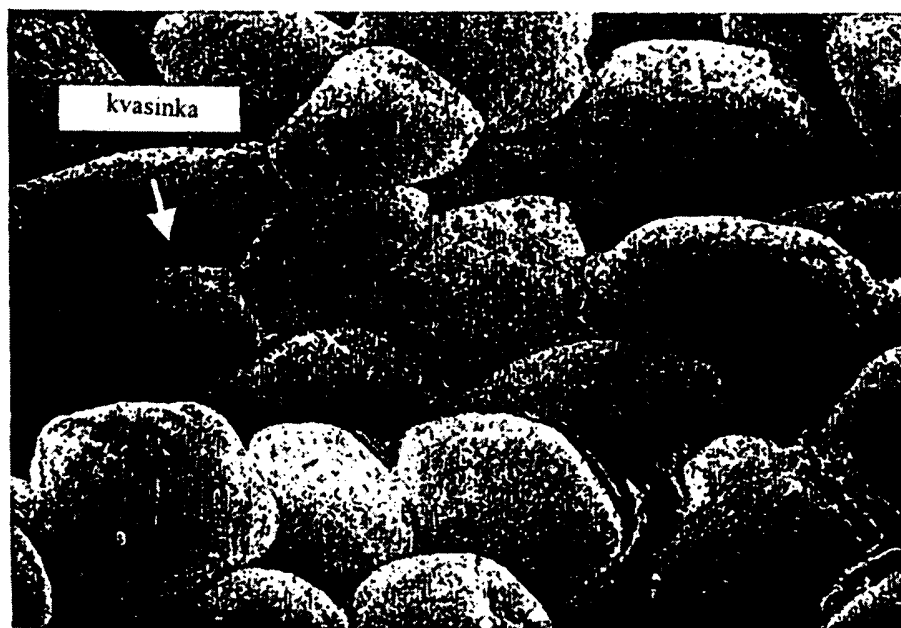


FIG. 28

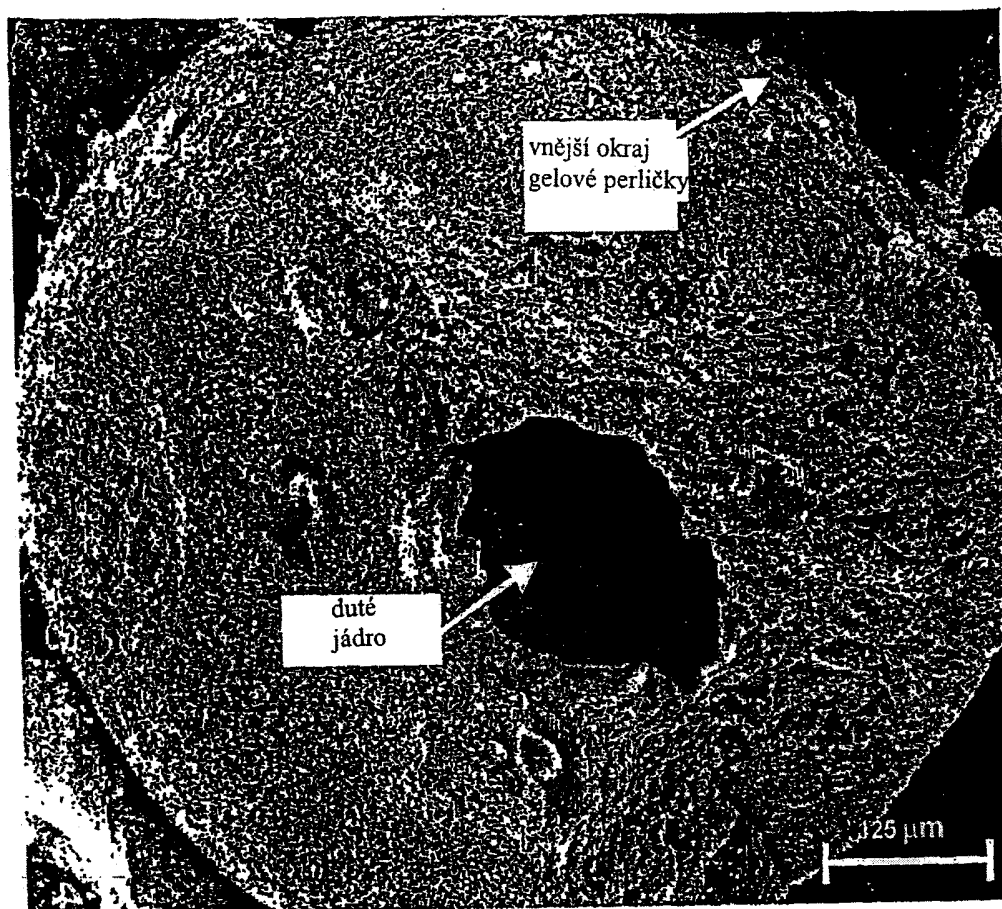


FIG. 29

Konec dokumentu
