

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 21561 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **200220020**

(51) MPK: **C12C 11/02**, **C12C 11/07**,
C12C 11/09

(22) Datum prijave: **20.06.2002**

(45) Datum objave: **28.02.2005**

(86) Mednarodna patentna prijava:
20.06.2002 WO PCT/CA02/00970

(30) Prednostna pravica:
20.06.2001 US 299153;
20.06.2001 US 299186

(87) Objava mednarodne patentne prijave:
WO 02/102961, 27.12.2002

(72) Izumitelja: **PILKINGTON Phyllis Heather, Ontario N6B 2H8, CA;**
MENSOUR Normand Anthony, Ontario N6B 2H8, CA

(73) Imetnik: **LABATT BREWING COMPANY LIMITED,**
303 Richmond Street, London, Ontario N6B 2H8, CA

(74) Zastopnik: **ITEM d.o.o. Zastopniška pisarna za patente in blagovne znamke, Resljeva 16, 1000 Ljubljana, SI**

(54) KOMBINACIJA KONTINUIRNIH/SARŽNIH FERMENTACIJSKIH PROCESOV

(57) V proizvodnji namiznih alkoholov je kontinuirana fermentacijska stopnja uporabljena za cepljenje in/ali začetno fermentacijo ječmenovke, ki vsebuje fermentabilne sladkorje. Primer kontinuirne faze vključuje uporabo bioreaktorja s plinskim vlekom s super-

kosmičastim kvasom in natančno kontrolo kisika. Kontinuirni fazi lahko nato sledi vodenje najmanj delno fermentiranega iztoka iz kontinuirnega procesa v šaržno procesno fazo za dokončno obdelavo.

SI 21561 A

KOMBINACIJA KONTINUIRNIH/ŠARŽNIH FERMENTACIJSKIH PROCESOV

Področje izuma

Pričujoči izum se nanaša na proizvodnjo namiznih alkoholnih produktov, zlasti piva, in še posebno z uporabo hibridnega procesa, ki obsega kontinuirne in šaržne fermentacijske procesne faze.

Znano stanje

Znatno število nedavnih publikacij na tem področju nakazuje velik interes pivovarske industrije na področju imobilizacije. V številnih preglednih člankih (Enari, 1995; Iserentant, 1995; Masschelein, 1997; Mensour s sodelavci, 1997; Stewart, 1996; Virkajarvi & Linko, 1999) o splošnem stanju pivovarske industrije je bila poudarjena mogoča revolucionarna vloga imobilizacije v proizvodnji piva. Poleg skupin, omenjenih v poglavjih od 3.1 do 3.5, so bile v R&D imobiliziranih celic za aplikacije varjenja piva vključene tudi številne druge institucije. Miller Brewing Company (Duncombe s sodelavci, 1996; Tata s sodelavci, 1999) iz Združenih držav je izvedla nekatere preliminarne ocene na Meura Delta testni enoti, kot tudi na bioreaktorju s fluidiziranim slojem, ki ga je prodal Schott Engineering. Coors Brewing je prav tako izvedel preliminarno eksperimentiranje z Meura Delta sistemom.

Slovaška tehniška univerza (angl. 'Slovak Technical University') je v sodelovanju s Heinekenom proučevala uporabo kalcijevega pektatnega gela v sistemu s plinskim vlekrom za proizvodnjo piva (Domeny, 1996). Nekoliko kasneje je skupina iz Slovaške tehniške univerze objavila številne članke o njihovem raziskovanju, ki je v teku (Smogrovicova s sodelavci, 1997; Smogrovicova & Domeny, 1999). Guinness je najprej raziskoval uporabo številnih adsorpcijskih nosilcev za imobilizacijo in kasnejšo fermentacijo v bioreaktorju s fluidiziranim slojem (Donnelly, 1998). Leta 1999 je Donnelly s kolegi objavil članek, ki opisuje kinetiko presnove sladkorja znotraj njihovega bioreaktorja s fluidiziranim slojem (Donnelly s sodelavci, 1999). Njegova eksperimentalna naprava je uporabljala Siranove porozne steklene kroglice kot imobilizacijski nosilec za zgoraj omenjen fermentirajoč kvas. Guinness je postal del konzorcija Immocon Consortium, ki je bil opisan v poglavju 2.2.5.

Holsten Brauerei AG in Lurgi AG, oba iz Nemčije, sta skupaj razvila in upravljala pilotno napravo za kontinuirno proizvodnjo brezalkoholnega piva (Dziondziak, 1995). Kalcijeve alginatne kroglice v enostopenjskem fermentorju s fluidiziranim slojem in zunanjo zanko (130 l) so bile uporabljene za fermentacijo, medtem ko je bilo uporabljeno rešetasto dno kolone (7 rešetak) za dealkoholiziranje piva. Celotni produkcijski čas za ta proces je bil 8.5 ur.

Skupina iz laboratorijev Sapporo Breweries Ltd. Brewing Research Laboratories iz Japonske je proučevala uporabo imobiliziranih celic v reaktorju s fluidiziranim slojem za glavno fermentacijo piva. Njihove študije obsegajo uporabo polivinilalkoholnih gelnih kroglic (Shindo & Kamimur, 1990), Ca-alginatnih gelnih kroglic (Shindo s sodelavci, 1994a), dvoslojnih gelnih vlaken (Shindo s sodelavci, 1994b) in citosanskih (angl. 'chitosan') gelnih kroglic (Shindo s sodelavci 1994c) kot imobilizacijskih matrikov. V zadnji študiji je bioreaktor z enolitrskim delovnim volumnom, ki je v 25% volumna vseboval kroglice Chitopearl[®] tip II (citosanske kroglice), obratoval v kontinuirnem načinu z ječmenovko obdelano z glukoamilazo. Ta encimska obdelava je omogočala, da je bila tvorba acetatnega estra v imobiliziranem celičnem sistemu podobna tvorbi v konvencionalni šaržni fermentaciji, to pomeni korak bližje k podobnosti produkta.

Raziskovalna skupina iz Sappora je sedaj usmerila pozornost na razvoj fluidiziranega krogličnega fermentorja s citosanskimi kroglicami, ki obratuje v ponavljajočem šaržnem načinu. Sistem je obratoval 75 dni brez kakršnihkoli večjih problemov in nastalo pivo je bilo po kvaliteti podobno komercialnemu produktu. Nekosmičasta vrsta se je izkazala bolj učinkovita kot kosmičasta vrsta (Maeba s sodelavci, 2000; Umemoto s sodelavci, 1998).

Dva druga pristopa k diacetilni redukciji sta bila predstavljena na EBC kongresu, ki je potekal v Maastrichtu 1997. Raziskovalci v Franciji (Dulieu s sodelavci, 1997) so predlagali uporabo kapsuliranega α -acetolaktata dekarboksilaze za hitro pretvorbo α -acetolaktata v acetoin. Meura Delta je poudaril preliminarne rezultate uporabe aluminosilikatnega zeolita kot katalizatorja za hladno in direktno pretvorbo acetolaktata v acetoin (Andries s sodelavci, 1997). Če se takšne obdelave potrdijo kot učinkovite in potrošniku sprejemljive, potem lahko postanejo nižje stroškovne alternative sistemov zorenja (angl. 'maturation'), ki sta jih predlagala Cultor in Alfa Laval, realnost.

Druga neindustrijska raziskava na področju imobilizacije pri proizvodnji piva je raziskava Singapore Institute of Standards and Industrial Research, v kateri je bila

študirana uporaba vlaknastega tipa alginatnega gelnega delca za uporabo v reaktorju s strnjenim slojem in ugotovljena kot ugodnejša v primerjavi z alginatnimi kroglicami (Que, 1993). Mafra in kolegi iz Universidade do Minho na Portugalskem so razpravljali o uporabi superkosmičaste vrste kvasa za kontinuirno zorenje piva (Mafra s sodelavci, 1997). Ista raziskovalna skupina je prav tako publicirala delo o uporabi kosmičastega kvasa v bioreaktorju s plinskim vlekom za proizvodnjo etanola (Vicente s sodelavci, 1999; Domingues s sodelavci, 2000).

Raziskovalci različnih akademskih institucij so prav tako nedavno proučevali uporabo imobilizacije pri proizvodnji piva (Argiriou s sodelavci, 1996; Bardi s sodelavci, 1996; Cashin, 1996; Moll & Duteurtre, 1996; Nedovic s sodelavci, 1996a; Nedovic s sodelavci, 1996b, Norton s sodelavci, 1995; Scott s sodelavci, 1995, Wackerbauer s sodelavci, 1996a; Wackerbauer s sodelavci, 1996b). Raziskovalne skupine iz Kitajske (Chao s sodelavci, 1990; Yuan, 1987; Zhang s sodelavci, 1988), Rusije (Kolpachki s sodelavci, 1980; Sinitsyn s sodelavci, 1986) in Čehoslovaške (Chladek s sodelavci, 1989; Curin s sodelavci, 1987; Polednikova s sodelavci, 1981) so bile prav tako vključene v tehnologijo imobiliziranja celic in objavile rezultate v 1980-ih.

V poglavju o znanem stanju so bile upoštevane številne reference na osnovi katerih temelji pričujoč izum. Le te so:

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

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

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

Anon. 1997. Alfa Laval Brewery Systems. *Brewer's 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 (Avstralija in Nova Zelandija)*, Melbourne 80.

- Atkinson, B. 1986. Immobilised cells, their application and potential. V: *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'Amore, T. 1994. An on-line capacitance biomass monitor and its correlation with viable biomass. *MBAA Technical Quarterly* 31: 85.
- Axcell, B.C., O'Connor-Cox, E.S.C., 1996. The concept of yeast vitality – an alternative approach. *Proceedings of Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Sect.)*. Singapore 24:64.
- Axelsson, A., Sisak, C., Westrin, B.A., Szajani, B. 1994. Diffusion characteristics of a swelling gel and its consequences for bioreactor performance. *The Chemical Engineering Journal* 55: B35.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Bancel, S., Hu W. 1996. Confocal laser scanning microscopy examination of cell distribution in macroporous microcarriers. *Biotechnology Progress* 12: 398.
- Barker, M.G., Smart, K.A. 1996. Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 54(2): 121.
- Bejar, P., Casas, C., Godia, F., Sola, C. 1992. The influence of physical properties on the operation of a three-phase fluidized-bed fermenter with yeast cells immobilized in calcium alginate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34:467.
- Bickerstaff, G.F. 1997. Immobilization of enzymes and cells. V: *Immobilization of Enzymes and Cells*, Ed.
- Bickerstaff, G.F., New Jersey, U.S.A.: Humana Press, Inc. 1.
- Birnbaum, S., Pendleton, R., Larson, P., Mosbach, K. 1981. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of living whole cells. *Biotechnology Letters* 3:393.
- Budac, D., Margartis, A. 1999, *Personal communication*.
- Büyükgüngör, H. 1992. Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in kappa-carrageenan gels. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53:173.

- Chahal, P.S. 1992. *Fluorosensor controlled fed-batch production of Cyclosporin-A from Beauveria nivea*. Ph. D. Thesis. University of Western Ontario.
- Chisti, M.Y. 1989. *Airlift bioreactors*. London: Elsevier Applied Science.
- Chisti, Y., Moo-Young, M. 1993. Improve the performance of airlift reactors. *Chemical Engineering Progress* 6: 38.
- Cho, G.H., Choi, C.Y., Choi, Y.D., Han, M.H. 1982. Ethanol production by immobilised yeast and its carbon dioxide gas effects in a packed bed reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32: 959.
- Coutts, M.W. 1956. *Britain Patent No. 872, 391*.
- Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H., Kahler, M. 1987. Beer production with immobilized yeast. *European Brewing Convention Congress*, Madrid 433.
- Dale, C.J., Hough, J.S., Young, T.W. 1986. Freactionation of high and low molecular weight components from wort and beer by adsorption chromatography using the gel Sephadex LH20. *Journal of the Institute of Brewing* 92(5): 457.
- Daoud, I.S., Searle, B.A. 1986. Yeast vitality and fermentation performance. *Monograph - XII European Brewery Convention - Symposium on Brewers' Yeast*, Helsinki 108.
- de Backer, L., Willaert, R.G., Baron, G.V. 1996. Modeling of immobilized bioprocesses. V: *Immobilized Living Cell Systems Modelling and Experimental Methods*, Ed. Willaert, R.G., Baron, G.V., in de Backer, L., Toronto; JohnWiley and Sons. 47.
- 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 system. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 52: 100.
- Dillenhofer, W., Ronn, D. 1996. Secondary fermentation of beer with immobilized yeast. *Brauwelt International* 14: 344.
- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986a. Effects of hydroxyurea on immobilized and suspended yeast fermentation rates and cell cycle operation. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1814.

- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986b. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 73.
- Dos Santos, V.A.P.M., Bruijnse, M., Tramper, J., Wijffels, R.H. 1996. The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 447.
- Driessen, W., Habets, L., Vereijken, T. 1997. Novel anaerobic and aerobic process to meet strict effluent plant design requirements. *Proceedings of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Auckland 148.
- Dulieu, C., Boivin, P., Dautzenberg, H., Poncelet, D. 1996. Immobilized enzyme system to avoid diacetyl formation: a new tool to accelerate beer maturation. *International Workshop on Bioencapsulation*, Postdam 22.
- Dunbar, J., Campbell, S.L., Banks, D.J., Warren, D.R. 1988. Metabolic aspects of a commercial continuous fermentation system. *Proceedings of the Convention of the Institute of Brewing*, Brisbane 151.
- Etapé, D., Gòdia, F., Solà, C. 1992. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 396.
- Evans, H.A.V., Cleary, P. 1985. Direct Measurement of Yeast and Bacterial Viability. *Journal of the Insitute of Brewing* 91: 73.
- Fan, L.-S. 1989. *Gas-Liquid-Solid Fluidization Engineering*. Boston: Butterworths.
- Fernandez, E. 1996. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging. V: *Immobilized Living Cell System: Modeling and Experimental Methods*. Toronto: John Wiley and Sons, Poglavje 6.
- Garcia, A.I., Garcia, L.A., Diaz, M. 1994. Prediction of ester production in industrial beer fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 16(1): 66.
- Geankoplis, C.J. 1993. *Transport Processes and Unit operations*. New Jersey: Prentice Hall P.T.R.
- Gee, D.A., Ramirez, W.F. 1994. A flavour model for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 100: 321.
- Geiger, K.H., Compton, J. 1957. *Canada Patent No. 545, 867*.
- Gekas, V.C. 1986. Artificial membranes as carriers for the immobilization of biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 450.

- Gift, E.A., Park, H.J., Paradis, G.A., Demain, A.L., Weaver, J.C. 1996. FACS-based isolation of slowly growing cells: double encapsulation of yeast in gel microdrops. *Nature Biotechnology* 14: 884.
- Gikas, P., Livingston, A.G. 1993. Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 1337.
- Gikas, P., Livingston, A.G. 1996. Viability of immobilised cells: use of specific ATP levels and oxygen uptake rates. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 11:264.
- Gilson, C.D., Thomas, A. 1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 62: 38.
- Gòdia, F., Casa, C., Castellano, B., Solà, C. 1987. Immobilized cells: behavior of carrageenan entrapped yeast during countinuous ethanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 342.
- Gopal, C.V., Hammond, J.R.M. 1993. Application of immobilized yeast for fermenting beer. *Brewing and Distilling International* 24: 72.
- Hannoun, B.J.M., Stephanopoulos, G. 1986. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 829.
- Hardwick, W.A. 1995. *Handbook of Brewing*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hayat, M.A. 1972. *Basic Electron Microscopy Techniques*. Toronto: van Nostrand Reinhold Co. 96.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R., Weltevrede, R., Mulder, A. 1993. Development and scale-up of an aerobic biofil 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.: Prentise-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. V: *Malting and Brewing Science Volume 2 Hopped Wort and Beer*, Ed. Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., in 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. V: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Application* Ed. Wijffels, R.H., Buitellar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 336.
- Hutter, K.J. 1996. Flow-cytometric analyses for assessment of fermentative ability of various yeast. *Brauwelt International* 1: 52.
- Hwang, S.-J., Fan, L.-S. 1986. Some design consideration of a draft tube gas-liquid-solid spouted bed. *The Chemical Engineering Journal* 33: 49.
- Imai, T. 1996. Recent advances in the determination of yeast vitality. *Proceedings of the Congress of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Singapore 24: 60.
- Inloes, D.S., Taylor, D.P., Cohen, S.N., Michaels, A.S., Robertson, C.R. 1983. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 264.
- Inoue, T. 1987. Possibilities opened by "new biotechnology" and application of immobilized yeast to beer brewing. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewery Co., Ltd.* 7.
- Inoue, T., 1992. A review of diacetyl control technology. *Proceedings of 22nd Convention of the Institute of Brewing (avstralska in novozelandska sekcija)*, 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 yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 70: 307.
- Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1984. A review of yeast ionic nutrition - Part I: growth and fermentation requirements. *Process Biochemistry* 19(2): 48.

- Jones, R.P., Pamment, N., Greenfield, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeast - the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry* 16(3): 42.
- Kara, B.V., David, I., Searle, B.A. 1987. Assessment of yeast quality. *Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention*, Madrid, 21: 409.
- Karamanev, D.G. 1991. Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 10: 51.
- Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. 1985. The Immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science* 40: 1321.
- Kasten, F.H. 1993. Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications. V: *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 I. 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.
- Kregel-Van Rij, N. 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, B.V.
- Kronlöf, J., Virkajärvi, I. 1996. Main Fermentation with immobilized yeast - pilot scale. *Proceedings of the European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 94.
- Kunze, W. 1996. *Technology Brewing and Malting*. Berlin: VLB.
- Kuriyama, H., Ishibashi, H., Umeda, I.M.T., Kobayashi, H. 1993. Control of yeast flocculation activity in continuous ethanol fermentation. *Journal of Chemical Engineering Japan* 26(4): 429.
- Kurosawa, H., Matsamura, M., Tanaka, H. 1989. Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 926.
- Kurosawa, H., Tanaka, H. 1990. Advances in immobilized cell culture: development of a co-immobilized mixed culture system of aerobic and anaerobic micro-organisms. *Process Biochemistry International* 25: 189.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. *The yeast, A Taxonomic Study*, četrta izdaja. Amsterdam: Elsevier 361.

- Kyung, K.H., Gerhardt, P. 1984. Continuous production of ethanol by yeast 'immobilized' in a membrane-contained fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 252.
- Lee, S.S., Robinson, F.M., Wang, H.Y. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium št. 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.
- 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. V: *Biochemical and Biological Engineering*, urednik Blakebrough, N., London: Academic Press, Inc. 203.
- Leudeking, R., Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *Journal of Biochemical and Microbial Technology and Engineering* 1: 393.
- Lewandowski, Z., Altobelli, A., Fukushima, E. 1993. NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnology Process* 9: 40.
- Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S. 1995. Experimental and conceptual studies on mass transport in biofilms. *Water Science Technology* 31: 153.
- Lewis, M., Young, T. 1995. *Brewing*. London: Chapman and Hall.
- Li, J., Humphrey, A.E., 1991. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 1043.
- Lim, H.-S., Han, B.-K., Kim, J.-H., Peshwa, M.V., Hu, W.-S. 1992. Spatial distribution of mammalian cells grown on macroporous microcarriers with improved attachment kinetics. *Biotechnology Progress* 8: 486.
- Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N. 1996. Effect of flocculation characteristics on immobilized yeast performance. *European Brewery Convention Brewing Science Group*, Berlin 102.
- Lloyd, D., Moran, C.A., Suller, M.T.E., Dinsdale, M.G. 1996. Flow cytometric monitoring of rhodamine 123 and a cyanine dye uptake by yeast during cider fermentation. *Journal of Institute of Brewing* 102: 251.
- Lundberg, P., Kuchel, P.W. 1997. Diffusion of solutes in agarose and alginate gels: ^1H and ^{23}Na PFGSE and ^{23}Na TQF NMR studies. *Magnetic Resonance in Medicine* 37: 44.

- Margaritis, A., te Bokkel, D.W., El Kashab, M. 1987. Repeated batch fermentation of ethanol using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a fluidized bioreactor system. V: *Biological Research on Industrial Yeast*, Urednik Stewart, G.G., Russell, I., Klein, R.D., Boca Raton: CRC Press 121.
- Margaritis, A., Wallase, J.B. 1982. The use of immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in a novel fluidized bioreactor to produce ethanol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 147.
- Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978a. The rotorfermentor. Part I: description of the apparatus, power requirements, and mass transfer characteristics. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 709.
- Margaritis, A., Wilke, C.R. 1978b. The rotorfermentor. Part II: application to ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 727.
- Marrs, W.M. 1998. The stability of carrageenans to processing. V: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 9*, Cambridge; Royal Society of Chemistry, 218: 345.
- Martens, F.B., Egberts, G.T.C., Kempers, J., Robles de Medina, M.H.L., Welton, H.G. 1986. *European Brewing Convention Monograph XII, Symposium on Brewing Yeast*, Helsinki 339.
- Masschelein, C.A. 1990. Yeast metabolism and beer flavour. Proceedings of the Third Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling 103.
- Masschelein, C.A., Carlier, A., Ramos-Jeunehomme, C., Abe, I. 1985. The effect of immobilization on yeast physiology and beer quality in continuous and discontinuous systems. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress*, Helsinki 339.
- Masschelein, C.A., Ramos-Jeunehomme, C. 1985. The potential of alginate immobilized yeast in brewery fermentations. *Institute of Brewing Central and Southern African Section Proceedings of the 1st Scientific and Technical Convention*, Johannesburg 392.
- Masschelein, C.A., Vandenbussche, J. 1999. Current outlook and future perspectives for immobilized yeast technology in the brewing industry. *Brewers' Guardian* 28(4): 35.
- Masters, B.R., Thaer, A.A. 1994. Real-time scanning slit confocal microscopy of the *in vivo* human cornea. *Applied Optics* 33: 695.
- Meilgaard, M. 1982. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition, *Brygmesteren* 5.

- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1996. Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. V: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications* izdaja.
- Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 661.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russell, I. 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 363.
- Merchant, F.J.A. 1986. *Diffusivity Characteristics of Glucose in Alginate Immobilization Matrices*. Doktorsko delo. University of Western Ontario.
- Merchant, F.J.A., Margaritis, A., Wallace, J.B. 1987. A novel technique for measuring solute diffusivities in entrapment matrices used in immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 30: 936.
- Mochaba, F.M. 1997. A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. *Journal of the Institute of Brewing* 103: 99.
- Mochaba, F., O'Connor-Cox, E.S.C., Axcell, B.C. 1998. Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(1):1.
- Muhr, A.H., Blanshard, J.M.V. 1982. Diffusion in gels. *Polymer* 23: 1012.
- Mulder, M.H.V., Smolders, C.A. 1986. Continuous ethanol production controlled by membrane processes. *Process Biochemistry* 21: 35.
- Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A., Mitsui, S. 1993. Beer brewing using an immobilized yeast bioreactor system. *Bioprocess Technology* 16: 275.
- Nakanishi, K., Onaka, T., Inoue, T. 1986. A new immobilized yeast reactor system for rapid production of beer. *Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewing Company* 13.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984a. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (I) formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(2): 73.
- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K., Kumada, J. 1984b. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (II) theoretical aspect for the formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(4): 175.

- Nakatani, K., Fukui, N., Nagami, K., Nishigaki, M. 1991. Kinetic analysis of ester formation during beer fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49(4): 152.
- Narziß, L., Miedaner, H., Graf, P., Eichhorn, P., Lustig, S. 1993. Technological approach to improve flavour stability. *MBAA Technical Quarterly* 30: 48.
- Nava Saucedo, J.E., Roisin, C., Barbotin, J.-N. 1996. Complexity and heterogeneity of microenvironments in immobilized systems. *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, Noordwijkerhout 39.
- Nedovic, A.N., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I., Cutkovic, M. 1996. A study on considerably accelerated fermentation of beer using an airlift bioreactor with calcium alginate entrapped yeast cells. *Fifth World Congress of Chemical Engineering* 2: 474.
- Neufeld, R.J., Poncelet, D.J., Norton, S.D. 1996. *Application for Canadian Patent št. 2133789*.
- Norton, S., D'Amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 365.
- Norton, S., Watson, K., D'Amore, T. 1995. Ethanol tolerance of immobilized brewer's yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 18.
- O'Connor-Cox, E., Mochaba, F.M., Lodolo, E.J., Majara, M., Axcell, B. 1997. Methylene blue staining: use at your own risk. *MBAA Technical Quarterly* 34(1): 306.
- O'Reilly, A.M., Scott, J.A. 1995. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 636.
- Okazaki, M., Hamada, T., Fujii, H., Mizobe, A., Matsuzawa, S. 1995. Development of poly(vinyl alcohol)hydrogel for waste water cleaning. I., Study of poly(vinyl alcohol)gel as a carrier for immobilizing organisms. *Journal of Applied Polymer Science* 58: 2235.
- Oldshue, J.Y., Herbst, N.R. 1992. *A Guide to Fluid Mixing*. New York: Lightnin.
- Opekarova, M., Sigler, K. 1982. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast). *Folia Microbiologica*. 27: 395.
- Øyaas, J., Storro, L., Svedsen, H., Levine, D.W. 1995. The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 47: 492.

- Paiva, T.C.B., Sato, S., Visconti, A.E.S., Castro, L.A.B. 1996. Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58(0): 55.
- Pajunen, E., Makinen, V., Gisler R., 1987. *Secondary fermentation with immobilized yeast. European Brewery Convention Congress*, Madrid 441.
- Parascandola, P., de Alteriis, E. 1996. Pattern of growth and respiratory activity of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) cells growing entrapped in an insolubilized gelatin gel. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23: 7.
- Perry, R.H., Green, D.W. 1984. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. 1998a. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Critical Review 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., Maragaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I., Russel, 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 practice. *Journal of Physical and Colloidal Chemistry* 54: 649.
- Power, D.A., McCuen, P.J. 1988. *Manual of BBL® Products and Laboratory Procedures*, šesta izdaja, Maryland: Becton Dickinson Microbiology Systems 249.
- Priest, F.G., Cambell, I. 1996. *Brewing Microbiology* 2. izdaja, 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. 8. izdaja. Minnesota: ASBC.

Uttamlal, M., Walt, D.R. 1995. A fiber-optic carbon dioxide sensor for fermentation monitoring. *Biotechnology* 13:597.

Venâncio, A., Teixeira, JA. 1997. Characterization of sugar diffusion coefficients in alginate membranes. *Biotechnology Techniques* 11: 183.

Vilachá, C., Uhlig, K. 1985. The measurement of low levels of oxygen in bottled beer. *Brauwelt International* 70.

Virkajärvi, I., Kronlöf, J. 1998. Long-term stability of immobilized yeast columns in primary fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(2): 70.

Vives, C., Casas, C., Godia, P., Sola, C. 1993. Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in calcium alginate beads and observation on their growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38:467.

Wada, M., Kato, J., Chibata, I. 1979. A new immobilization of microbial cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 8:241.

Wang, H.Y., Lee, S.S., Takach, Y., Cawthon, L. 1982. Maximizing microbial cell loading in immobilized-cell systems. *Biotechnology and Bioengineering Symp. št. 12* 139.

Westrin, B.A., Axelsson, A. 1991. Diffusion in gels containing immobilized cells: a critical review. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 439.

Wheatcroft, R., Lim, Y.M., Hawthorne, D.B., Clarke, B.J., Kavanagh, T.E. 1988. An assessment of the use of specific oxygen uptake measurements to predict the fermentation performance of brewing yeasts. *The Institute of Brewing (avstralska in novozelandska sekcija), Proceedings of the Twentieth Convention*, Brinsbane 193.

White, F.H., Portno, A.D. 1978. Continuous fermentation by immobilized brewers yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 84: 228.

Wijffels, R.H., de Gooijer, C.D., Schepers, A.W., Tramper, J. 1996. Immobilized-cell growth: diffusion limitation in expanding micro-colonies. In: *Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications*, uredniki Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C., Tramper, J., Amsterdam: Elsevier Science 249.

- Wijffels, R.H., Englund, G., Hunik, J.H., Leenen, J.T.M., Bakketun, A. Sodelavci 1995. Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying microorganisms at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* 45:1.
- Aivasidis, A., 1996. Another Look at Immobilized Yeast Systems. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **21**, 27.
- Aivasidis, A., Wandrey, C., Eils, H.-G. & Katzke, M., 1991. Continuous Fermentation of Alcohol-Free Beer with Immobilized Yeast in Fluidized Bed Reactors. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Lisbon*, 1991, 569.
- Akiyama-Jibiki, M., Ishibiki, T., Yamashita, H. & Eto, M., 1997. A Rapid and Simple Assay to Measure Flocculation in Brewer's Yeast *Master Brewers of the Americas Technical Quarterly*, **34**, 278.
- Alfa Laval Brewery Systems, 1997. Immobilized Yeast System Reduces Maturation Time. *Brewers' Guardian*, **126**, 26.
- Alfa Laval Brewery Systems, 1996. *Continuous Maturation of Beer with Immobilized Yeast*, Company Report.
- Al Taweel, A.M. & Walker, L.D., 1983. Liquid Dispersion in Static In-line Mixers. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, **61**, 527.
- Andries, M., Derdelinckx, G., Ione, K.G., Delvaux, F., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1997a. Zeolites as Catalysts for the Cold and Direct Conversion of Acetolactate into Acetoin. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 48.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1995. Design of a Multi-Purpose Immobilized Yeast Bioreactor System for Application in the Brewing Process. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 134.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O. & Masschelein, C.A., 1996a. Design and Application of an Immobilized Loop Bioreactor for Continuous Beer Fermentation, V *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.T. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, uredniki) Amsterdam: Elsevier Science, 672.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschlein, C.A., 1996b. Design and Applications of an Immobilized Loop Bioreactor to the Continuous

- Fermentation of Beer. *Proceedings of the 6th International-Brewing Technology Conference*, Harrogate, 380.
- Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschlein, 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. & Masschlein, C.A., 1997c. First Results on Semi-Industrial Continuous Fermentation with the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **34**,119.
- Argiriou, T., Kanellaki, M., Voliotis, S. & Koutinas, A.A., 1996. Kissiris-Supported Yeast Cells: High Biocatalytic Stability and Productivity Improvement by Successive Preservatives at 0 °C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 4028.
- Audet, P. & Lacroix, C., 1989. Two Phase Dispersion Process for the Production of Biopolymer Gel Beads: Effects of Barious Parameters on Bead Size and their Distribution. *Process Biochemistry*, **24**, 217.
- Axelsson. A. & Persson, B., 1988. Determination of Effective Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Plates with Varying Yeast Cell Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **18**, 231.
- Bardi, E.P., Koutinas, A.A., Soupioni, M.J. & Kanellaki, M.E., 1996. Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperature Brewing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 463.
- Berkman, P, D. & Calabrese, R, V., 1988. Dispersion of Viscous Liquids by Turbulent Flow in a Static Mixer. *American Institute of Chemical Engineering Journal*. **34**, 602.
- Borremans, E., 1997. Secondary Fermentation of Beer with Immobilized Yeast. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **22**, 33.
- Bower, J.L. & Christensen, C.M., 1995. Disruptive Technologies; Catching the Wave. *Harvard Business Review*, **73**, 43.
- Breitenbücher, K. & Mistler, M., 1995. Fluidized Bed Fermenters for the Continuous Production of Non-Alcoholic Beer with Open-Pore Sintered Glass Carriers. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 77,

- Brewers Association of Canada, 1988. *About Beer And The Brewing Industry*, Ottawa, Ontario.
- Broderick, Harold M., 1979. *The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry*, 2. izdaja. Impressions Inc., Wisconsin.
- Burns, J.A., 1937. *Journal of the Institute of Brewing*, **43**, 31.
- Calleja, G.B. & Johnson, B.F., 1977. A Comparison of Quantitative Methods for Measuring Yeast Flocculation. *Canadian Journal of Microbiology*, **23**, 68.
- Carberry, J.J., 1976. *Chemical and Catalytic Reaction Engineering*, McGraw-Hill.
- Carberry, J.J. & Varma, A., 1987. *Chemical Reaction and Reactor Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Cashin, M.-M., 1996. Comparative Studies of Five Porous Supports for Yeast Immobilization by Adsorption/Attachment. *Journal of the Institute of Brewing*, **102**, 5.
- Champagne, C.P., 1994. Overview: Immobilized Cell Technology in Food Processing. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group TV, Quebec. Canada*, 33.
- Chang, C.M., Lu, W.J., Own, K.S. & Hwang, S.J., 1994. Comparison of Airlift and Stirred Tank Reactors for Immobilized Enzyme Reactions. *Process Biochemistry*, **29**, 133.
- Chao, X., Ye, G. & Shi, S., 1990. Kinetic Study of the Continuous Fermentative Process of Green Beer Production with Immobilized Yeast. *Huagong Jixie*, **17**, 18.
- Chibata, I., 1979. Immobilized Microbial cells with Polyacrylamide Gel and Carrageenan and their Industrial Applications. American Chemical Society Series, **106**, 187.
- Chisti, M.Y., 1991. *Airlift Bioreactors*, Elsevier Applied Science, New York.
- Chisti, Y. & Moo-Young, M., 1993. Improve the Performance of Airlift Reactors. *Chemical Engineering Progress*, **6**, 38.
- Chladek, L., Voborsky, J., Sima, J. & Hosek, Z., 1989. *Prumysl Potravin*, **40**, 590.
- Coe, H.S. & Clevenger, G.H., 1916. Methods for Determining the Capacities of Slime Thickening Tanks. *Transcript of the American Institute of Mechanical Engineering*, **55**, 356.
- Curin, J., Pardonova, B., Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1987. Beer Production with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention, Madrid*, 433.
- Decamps, C. & Norton, S., 1994. New Emulsion Process using Static Mixer for the Production of α -Carrageenan Gel Beads. Labatt Breweries of Canada Internal Report.

- Del Pozo, M., Briens, C.L. & Wild, G., 1994. Effect of Liquid Coalescing Properties on Mass Transfer, Heat Transfer and Hydrodynamics in a Three-Phase Fluidized Bed. *The Chemical Engineering Journal*, **55**,1.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996a. Alfa Laval/Schott System of Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *Brewing & Distilling International*, **27**, 35.
- Dillenhofer, W. & Ronn, D., 1996b. Secondary Fermentation of Beer With Immobilized Yeast. *Brauwelt International*, **14**,344.
- Dillenhoffer, W. & Ronn, D., 1996c Continuous Maturation of Beer. *Beverage World International*, 34.
- Domeny, Z., Smogrovicova, D., Gemeiner, P., Malovikova, A. & Sturdik, E., 1996. Calcium Pectate Gel to Immobilize Yeast for Continuous Beer Production. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group V, Potsdam, Germany*, Poster 12.
- Domingues, L., Lima, N. & Teixeira, J.A., 2000. Contamination of a High-Cell-Density Continuous Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 584.
- Donnelly, D., 1998. Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Annual Convention*, Minneapolis, Poster 8.
- Donnelly, D., Bergin, J., Gardiner, S. & Cahill, G., 1998. Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **36**,183.
- Dulieu, C., Boivin, P., Malanda, M., Dautzenberg, H. & Poncelet, D., 1997. Encapsulation of α -Acetolactate Decarboxylase to Avoid Diacetyl Formation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Maastricht*, Poster 44.
- Duncombe, D., Bower, P., Bromberg, S., Fehring, J., Lau, V. & Tata, M., 1996. The Contribution of Free Cells in an Immobilized Yeast System. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Poster Presentation.
- Dziondziak, K. & Seiffert, T., 1995. Process for the Continuous Production of Alcohol-Free Beer, *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 301.
- Enari, T.-M., 1995. State of the Art of Brewing Research. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 1.
- Fix, G., 1989. Principles of Brewing Science. Brewers Publications, USA.

- Fouhy, K. & Parkinson, G., 1996. Brewers Break with Tradition. *Chemical Engineering*, **103**, 45.
- Gil, G.H., 1991. Continuous Ethanol Production in a Two-Stage, Immobilized and Suspended Cell Bioreactor (Alcohol Dehydrogenase). *Ph.D. Thesis*, Georgia Institute of Technology.
- Gilliland, R.B., 1951. The Flocculation Characteristics of Brewing Yeasts During Fermentation. *Proceedings of the European Brewing Convention*, **8**, 35.
- Groboillot, A., D.K. Boadi, D. Poncelet & Neufeld, R.J., 1994. Immobilization of Cells for Application in the Food Industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 75.
- Haikara, A., Virkajarvi, I., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Microbial Contaminations in Immobilized Yeast Bioreactors for Primary Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 439.
- Heggart, H.M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R.J., Dowhanick, T.M. & Russell, I., 1999. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **36**, 383.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Enger, W. & Hoeks, F., 1989. Review on the Application of Anaerobic Fluidized Bed Reactors in Waste-Water Treatment. *The Chemical Engineering Journal*, **41**, B 37.
- Heijnen, J.J., Mulder, A., Weltevrede, R., Hols, J. & van Leeuwen, H.L.J.M., 1991. Large Scale Anaerobic-Aerobic Treatment of Complex Industrial Waste-Water Using Biofilm Reactors. *Water Science Technology*, **23**, 1427.
- Heijnen, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R.W.R. & Mulder, A., 1993. Development and Scale-Up of an Aerobic Biofilm Air-Lift Suspension-Reactor. *Water Science Technology*, **27**, 253.
- Helm, E., Nohr, B. & Thorne, R.S.W., 1953. The Measurement of Yeast Flocculence and its Significance in Brewing. *Wallerstein Laboratories Communications*, **16**, 315.
- Horitsu, H., Wang, M.Y. & Kawai, K., 1991. A Modified Process for Soy Sauce Fermentation by Immobilized Yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55** 269.
- Hryclik, Kevin, Gerry Ginter, Jim Helmke, & Jim Spiers, 1987. *The How's And Why's of Brewing*, Revision #2, LBOC.

- Hunik, J.H., Tramper, J. & Wijffels, R.H., 1994. A Strategy to Scale Up Nitrification Processes with Immobilized Cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering*, **11**, 73.
- Hwang, S.-J. & Fan, L.-S., 1986. Some Design Considerations of a Draft Tube Gas-Liquid-Solid Spouted Bed. *The Chemical Engineering Journal*, **33**, 49.
- Hytinen, L, Kronlof, J. & Hartwall, P., 1995. Use of Porous Glass at Hartwall Brewery in the Maturation of Beer with Immobilized Yeast. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 55.
- Ibrahim, Y.A.A., Briens, C.L., Margaritis, A. & Bergougnou, M.A., 1996. Hydrodynamic Characteristics of a Three-Phase Inverse Fluidized Bed Column. *Journal of the American Institute of Chemical Engineering*, **42**, 1889.
- Inoue, T., 1995. Development of a Two-Stage Immobilized Yeast Fermentation System for Continuous Beer Brewing. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 25.
- Iserentant, D., 1995. Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. *Fermented Beverage Production*. (A.G.H. Lea & J.R. Piggott, editorji.) London: Chapman & Hall, 45.
- Kaplan, R.S. & Norton, D.P., 1996. The Balanced Scorecard. *President and Fellows of Harvard College, Harvard Business School Press*, Massachusetts, USA.
- Karamanev, D.G., Nagamune, T. & Endo, I., 1992. Hydrodynamic and Mass Transfer Study of a Gas-Liquid-Solid Draft Tube Spouted Bed Bioreactor. *Chemical Engineering Science*, **47**, 3581.
- Karel, S.F., Libicki, S.B. & Robertson, C.R., 1985. The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. *Chemical Engineering Science*, **40**, 1321.
- Katzbauer, B., Narodoslawsky, M. & Moser, A., 1995. Classification System for Immobilization Techniques. *Bioprocess Engineering*, **12**, 173.
- Kennard, M. & Janekeh, M., 1991. Two- and Three-Phase Mixing in a Concentric Draft Tube Gas-Lift Fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1261.
- Kolot, F.B., 1988. *Immobilized Microbial Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications*. Robert E. Krieger Publishing Company, Florida.
- Kolpachki, A.P., Isaeva, V.S., Kazantsev, E.N. & Fertman, G.I., 1980. Intensification of Wort Fermentation with Immobilized Yeasts. *Fermentnaya I Spirtovaya Promyshlennost*, **9**.

- Krikilion, Ph., Andries, M., Goffin, O., van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Optimal Matrix and Reactor Design for High Gravity Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 419.
- Kronlof, J., 1994. Immobilized Yeast in Continuous Fermentation of Beer. *Doktorsko delo*, VTT Publications, 167.
- Kronlof, J., Linko, M. & Pajunen, E., 1995. Primary Fermentation with a Two-Stage Packed Bed System Pilot Scale Experiences. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 118.
- Kronlof, J. & Virkajarvi, I., 1996. Main Fermentation with Immobilized Yeast-Pilot Scale *European Brewery Convention Brewing Science Group Bulletin, Zoeterwoude*, 94.
- Kronlof, J., Virkajarvi, I., Storgards, E.L., Londesborough, J. & Dymond, G., 2000. Combined Primary and Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *World Brewing Congress, Poster #56*.
- Ku, W.Y., 1982. Fermentation Kinetics for the Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells (Biomass). *Doktorsko delo*, The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Kunze, W., 1999. Technology Brewing and Matting. VLB Berlin, Germany.
- Kynch, G.J., 1952. *Transcripts of the Faraday Society*, **48**, 166.
- Lacroix, C., Paquin, C. & Amaud, J.P., 1990. Batch Fermentation with Entrapped Growing Cells of *Lactobacillus casei*; Optimization of the Rheological Properties of the Entrapment Gel Matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, 403.
- Levenspiel, O., 1972. Chemical Reaction Engineering. *John Wiley & Sons*, New York.
- Linko, M., Virkajarvi, I., Pohjala, N., Lindborg, K., Kronlof, J. & Pajunen, E., 1997. Main Fermentation with Immobilized Yeast-A Breakthrough?. *Proceedings of the European Brewery Convention, Maastricht*, 385.
- Livingston, A.G. & Chase, H.A., 1990. Liquid-Solid Mass Transfer in a Three Phase Draft Tube Fluidized Bed Reactor. *Chemical Engineering Communications*, **92**, 225.
- Livingston, A.G. & Zhang, S.F., 1993. Hydrodynamic Behaviour of Three-Phase (Gas-Liquid-Solid) Airlift Reactors. *Chemical Engineering Science*, **48**, 1641.

- Lommi, H., 1990. Immobilized Yeast for Maturation and Alcohol-Free Beer. *Brewing and Distilling International*, **21**, 23.
- Lommi, H., Gronqvist, A., & Pajunen, E., 1990. Immobilized Yeast Reactor Speeds Beer Production. *Food Technology*, **5**, 128.
- Lorenzen, K., 1996. Immobilized Yeast Plants for Alcohol-Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.
- Maeba, H., Umemoto, S., Sato, M. & Shinotsuka, K., 2000. Primary Fermentation-with Yeast Immobilized in Porous Chitosan Beads - Pilot Scale Trial. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing - Asia Pacific Section*, 82.
- Mafra, I., Machado Cruz, J.M. & Teixeira, J.A., 1997. Beer Maturation in a Continuously Operating Bioreactor using a Flocculating Brewer's Yeast Strain. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 509.
- Maiorella, B.L., 1983. *Fermentative Ethanol Production (Alcohol, Distillation, Economics)*. Doktorsko delo, University of California, Berkeley.
- Margaritis, A., 1975. *A Study of the Rotorfermentor and the Kinetics of Ethanol Fermentation*. Doktorsko delo, University of California, Berkeley.
- Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982a. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part I. Use of Free Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 1473.
- Margaritis, A., & Bajpai, P., 1982b. Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part II. Use of Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 1483.
- Margaritis, A. & Merchant, F., 1984. Advances in Ethanol Production Using Immobilized Cell Systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, **1**, 339.
- Margaritis, A. & Rowe, G.E., 1983. Ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* Immobilized in Different Carrageenan Gels. *Developments in Industrial Microbiology*, **24**, 329.
- 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, L Russell, R.D. Klein & R.R- Hiebsch, uredniki) Boca Raton: CRC Press, 121.

- Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1982. The Use of Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* in a Novel Fluidized Bioreactor to Produce Ethanol. *Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation*, Gatlinburg, Tennessee, **12**, 147.
- Margaritis, A. & Wallace, J.B., 1984. Novel Bioreactor Systems and their Applications. *Bio/Technology*, **2**, 447.
- Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978a. The Rotorfermentor. Part I: Description of the Apparatus, Power Requirements, and Mass Transfer Characteristics. *Biotechnology & Bioengineering*, **20**, 709.
- Margaritis, A. & Wilke, C.R., 1978b. The Rotorfermentor: Part II: Application to Ethanol Fermentation. *Biotechnology & Bioengineering*, **20**, 727.
- Masschelein, C.A., 1997. A Realistic View on the Role of Research in the Brewing Industry Today. *Journal of the Institute of Brewing*, **103**, 103.
- Masschelein, C.A., 1994. *State-of-the-Art and Future Developments in Fermentation*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **52**, 1.
- Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996a. The Meura-Delta Immobilised Yeast Fermenter for the Continuous Production of Beer. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **21**, 28.
- Masschelein, C.A. & Andries, M., 1996b. Meura-Delta's Immobilized Yeast Fermenter for Continuous Beer Production. *Brewing & Distilling International*, **27**, 16.
- Masschelein, C.A., Andries, M., Franken, F., Van de Winkel, L. & Van Beveren, P.C., 1995. The Membrane Loop Concept: A New Approach for Optimal Oxygen Transfer into High Cell Density Pitching Yeast Suspensions. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, 377.
- Masschelein, C.A., Ryder, D.S. & Simon, J-P., 1994. Immobilized Cell Technology in Beer Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 155.
- Matsuura, K., Hirotsune, M., Nakada, F. & Hamachi, M., 1991. A Kinetic Study on Continuous Sake Fermentation. *Hakkokogaku Kaishi*, **69**, 345.
- McCabe, J.T., 1999. *The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry*. Master Brewers Association of the Americas, USA.
- Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems, *Journal of the Institute of Brewing*, **103**, 363.

- Mensour, N.A., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1996. Application of Immobilized Yeast Cells in the Brewing Industry. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke & J. Tramper, uredniki) Amsterdam: Elsevier Science, 661.
- Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H. & Russell, I., 1995. Gas Lift Systems for Immobilized Cell Fermentation. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 125.
- Mensour, N., Margaritis, A., Russell, I., Briens, C.L., Decamps, C. & Norton, S., 1994. Beer Production with Immobilized Yeast Cells in a Pilot Plant Scale Airlift Reactor. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Quebec, Canada*, 49.
- Middleman, S., 1974, Drop Size Distributions Produced by Turbulent Pipe Flow of Immiscible Fluids Through a Static Mixer. *Industrial Engineering and Chemical Process Design and Development*, **13**, 78.
- Mieth, H.O., 1995. Immobilized Yeast Plants for Alcohol Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 166.
- Mistler, M., Breitenbücher, K. & Jaeger, R., 1995. Continuous Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Porous Glass Carriers. *Brewers Digest*, **70**, 48.
- Moll, M. & Duteurtre, B., 1996. Fermentation and Maturation of Beer with Immobilized Microorganisms. *Brauwelt International*, **3**, 248.
- 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, uredniki) New York: Marcel Dekker, 315.
- Muhr, A.H. & Blanchard, M.V., 1982. Diffusion in Gels. *Polymer*, **23**, 1012.
- Mwesigye, P.K & Barford, J.P., 1994. Transport of Sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77**, 687.
- Nakanishi, K., Murayama, H., Nagara, A. & Mitsui, S., 1993. Beer Brewing Using an Immobilized Yeast Bioreactor System, in *Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, uredniki) New York: Marcel Dekker, 275.
- Nakanishi, K., T. Onaka, T. Inoue & Kubo, S., 1985. A New Immobilized Yeast Reactor System for Rapid Production of Beer. *Proceedings of the 20th European Brewing Convention Congress, Helsinki*, 331.

- Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K. & Kumada, J., 1984. Kinetic Study of Vicinal Diketones in Brewing (I) Formation of Total Vicinal Diketones. *Master Brewers Association of the Americas Technical Committee*, **21**, 73.
- Nedovic, V.A., Leskosek-Cukalovic, I. & Vunjak-Novaki, G., 1996a. Short-Time Fermentation of Beer in an Immobilization Yeast Air-Lift Bioreactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 244.
- Nedovic, V.A., Vunjak-Novakovic, G., Leskosek-Cukalovic, I. & Cutkovic, M., 1996b. A Study on Considerably Accelerated Fermentation of Beer Using an Airlift Bioreactor with Calcium Alginate Entrapped Yeast Cells. *Proceedings of the 5th World Congress of Chemical Engineering, San Diego*, 474.
- Neufeld, R.J., Norton, S. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. *Canadian Patent Application* 2,133,789.
- Nguyen, A.L. & Luong, J.H.T., 1986. Diffusion in k-Carrageenan Gel Beads. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**,1261.
- Nielsen, J. & Villadsen, J., 1994. Bioreactor Modeling. *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York 9.
- Norton, S. & D'Amore, T., 1994. Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**, 365.
- Norton, S., Neufeld, R.J. & Poncelet, D.J.C.M., 1994. Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. *Canadian Patent Application* 2,133,789.
- Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A., Briens, C.L., Decamps, C. & Russell, L, 1994. Pilot Scale Primary Fermentation of Beer with a Gaslift Immobilized Yeast Reactor. *Proceedings of the European Brewing Convention, Sub-Committee*, Dublin.
- Norton, S., Watson, K. & D'Amore, T., 1995. Ethanol Tolerance of Immobilized Brewers' Yeast Cells. *Applied Microbiology & Biotechnology*. **43**,18.
- Nothaft, A., 1995. The Start-Up of an Immobilized Yeast System for Secondary Fermentation at Brahma. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 41.

- 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, uredniki) New York: Marcel Dekker, 235.
- Pajunen, E., 1996a. The Behaviour of Immobilized Yeast Cells. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **21**, 33.
- Pajunen, E., 1996b. Immobilized System in the Brewing Industry. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore*, 38.
- Pajunen, E., 1995. Immobilized Yeast Lager Beer Maturation: DEAE-Cellulose at Sinebrychoff. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 24.
- Pajunen E. & Gronqvist A., 1994. Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. *Proceedings for the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 101.
- Pajunen, E., A. Gronqvist & Lommi, H., 1989. Continuous Secondary Fermentation and Maturation of Beer in an Immobilized Yeast Reactor. *MBAA Technical Quarterly*, **26**, 147.
- Pajunen, E., Gronqvist, A., Simonsen, B. & Lommi, H., 1994. Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. *ALAFACE Annual Meeting, Quito*, 13.
- Pajunen, E., Ranta, B., Andersen, K., Lommi, H., Viljava, T., Bergin, J. & Guercia, H., 2000a. Novel Process for Beer Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing, Asia-Pacific Section*, 91.
- Pajunen, E., Viljava, T. & Lommi, H., 2000b. Novel Primary Fermentation with Immobilized Yeast System. *World Brewing Congress*, Oral presentation.
- Paul, F. & Vignais, P.M., 1980. Photophosphorylation in Bacterial Chromatophores Entrapped in Alginate Gel: Improvement of the Physical and Biochemical Properties of Gel Beads with Barium as Gel-Inducing Agent. *Enzyme and Microbial Technology*, **2**, 281.
- Peach, M., 1996. Fermenting Faster Pints. *New Scientist*, **2058**, 23.
- Pilkington, P.H, Margaritis, A. & Mensour, N.A., 1998a. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, **18**, 237.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, NA. & Russell, I., 1998b. Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, **104**, 19.

- Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I. & Russell, I., 1999. Kappa-Carrageenan Gel Immobilization of Lager Brewing Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, **105**, 398.
- Pirt, S.J., 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific, Oxford.
- Pittner, H. & Back, W., 1995. Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **32**, 163.
- Pittner, H., W. Back, W. Swinkels, E. Meersman, B. van Dieren & Lommi, H., 1993. Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol-Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress*, Oslo, 323.
- Polednikova, M., Sedova, H. & Kahler, M., 1981. Immobilized Brewing Yeast. *Kvasny Prumysl*, **27**, 193.
- Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J. & Fournier, A., 1992. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **38**, 39.
- 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., urednik, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Prakash, A., Briens, C.L. & Bergougnou, M.A., 1987. Mass Transfer Between Solid Particles and Liquid in a Three Phase Fluidized Bed. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **65**, 228.
- Prasad, K.Y. & Ramanujam, T.K., 1995. Overall Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Modified Reversed Flow Jet Loop Bioreactor with Low Density Particles. *Bioprocess Engineering*, **12**, 214.
- Pritchett, Price. 1993. *Culture Shift*. Texas: Pritchett & Associates, Inc.
- Que, F., 1993. Using a Thread Type of Alginate Gel Particles as Cell-Immobilised Support and Some Concept of Packed Bed Fermenter Design. *Biotechnology Techniques*, **7**, 755.
- Rajotte, P., 1998. Continuous Fermentation with Immobilized Yeast Cells. *American Brewer*, **76**, 42.

- Rajotte, P., 1997. Jumping into the Next Millenium Canadian Style. *American Brewer*, **75**, 42.
- Russell, I., Norton, S., Mensour, N., Margaritis, A. & Briens, C., 1995. Immobilized Yeast Cells: Applications for Brewing. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Victoria Falls*, 159.
- Ryder, D.S. & Masschelein, C.A., 1985. The Growth Process of Brewing Yeast and the Biotechnological Challenge. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **43**, 66.
- Satterfield, C.N., 1970. *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysts*, MIT Press, Cambridge.
- Scott, J.A., O'Reilly, A.M. & Kirkhope, S., 1995. A Fibrous Sponge Matrix to Immobilized Yeast for Beverage Fermentations. *Biotechnology Techniques*, **9**, 305.
- Shindo, S. & Kamimur, M., 1990. Immobilization of Yeast with Hollow PVA Gel Beads. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 232.
- Shindo, S., Sahara, H. & Koshino, S., 1994a. Suppression of α -Acetolactate Formation in Brewing with Immobilized Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, **100**, 69.
- Shindo, S., Sahara, H., Koshino, S. & Tanaka, H., 1993. Control of Diacetyl Precursor [α -acetolactate] Formation During Alcohol Fermentation with Yeast Cells Immobilized in Alginate Fibers with Double Gel Layers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **76**, 199.
- Shindo, S., Sahara, S., Watanabe, N. & Koshino, S., 1994b. Main Fermentation with Immobilized Yeast Using Fluidized-Bed Reactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Sydney*, 109.
- Sinitsyn, A.P., Rajnina, E.L., Efremov, A.B., Gracheva, I.M. & Gemet, M.V., 1986. Fermentation of Hydrolysed Mash by Yeasts Immobilized on Borosilicate Carriers. *Fermentnaya I Spirtovaya Promyshlennost*, 31.
- Smogrovicova, D. & Domeny, Z., 1999. Beer Volatile By-Product Formation at Different Fermentation Temperature using Immobilized Yeasts. *Process Biochemistry*, **34**, 785.
- Smogrovicova, D., Domeny, Z., Gemeiner, P., Malovikova, A. & Sturdik, E., 1997. Reactors for Continuous Primary Beer Fermentation using Immobilized Yeast, *Biotechnology Techniques*, **11**, 261.
- Sodini, I., Boquien, C.Y., Corrieu, G. & Lacroix, C., 1997. Use of an Immobilized Cell Bioreactor for the Continuous Inoculation of Milk in Fresh Cheese Manufacturing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **18**, 56.

- Speers, R.A. & Ritcey, L.L., 1995. Towards an Ideal Flocculation Assay. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 174.
- Stewart, G.G., 1996. Brewing Technology for the Future. *The Brewer*, **82**, 348.
- Stewart, G.G. & Russell, I., 2000. *Brewer's Yeast*. The Institute of Brewing, England.
- Stewart, G.G. & Russell, I., 1981. Yeast Flocculation, v *Brewing Science*, urednik 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, v *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (A. Tanaka, T. Tosa & T. Kobayashi, uredniki) 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*. 8. izdaja, Minnesota, ASBC.
- Teixera, J.M., Teixeira, J.A., Mota, M., Manuela, M., Guerra, B., Machado Cruz, J.M. & Sa Almeida, AM., 1991. The Influence of Cell Wall Composition of a Brewer's Flocculent Lager Yeast on Sedimentation During Successive Industrial Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Congress*, 241.
- Umemoto, S., Mitani, Y. & Shinotsuka, K., 1998. Primary Fermentation with Immobilized Yeast in a Fluidized Bed Reactor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **35**, 58.
- Van de Winkel, L., 1995. Design and Optimization of a Multipurpose Immobilized Yeast Bioreactor for Brewery Fermentations. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **20**, 77.
- Van de Winkel, L. & De Vuyst, L., 1997. Immobilized Yeast Cell Systems in Today's Breweries and Tomorrow's. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, **22**, 27.
- Van de Winkel, L., McMurrough, I., Evers, G., Van Beveren, P.C. & Masschelein, C.A., 1995. Pilot-Scale Evaluation of Silicon Carbide Immobilized Yeast Systems for

- Continuous Alcohol-Free Beer Production. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 90.
- Van de Winkel, L., P.C. van Beveren & C.A. Masschelein, 1991a. The Application of an Immobilized Yeast Loop Reactor to the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the 23rd European Brewing Convention Congress, Lisbon*, 577.
- Van de Winkel, L., P.C. van Beveren, E. Borremans, E. Goosens & C.A. Masschelein, 1991b. High Performance Immobilized Yeast Reactor Design for Continuous Beer Fermentation. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress, Oslo*, 307.
- Van Dieren, B., 1995. Yeast Metabolism and the Production of Alcohol-Free Beer. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finland*, 66.
- Van Iersel, M.F.M., Meersman, E., Swinkels, W., Abee, T. & Romboute, F.M., 1995.. Continuous Production of Non-Alcohol Beer by Immobilized Yeast at Low Temperature. *Journal of Industrial Microbiology*. **14**, 495.
- Van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J., 1993. Biofilm Bioreactors for Waste-Water Treatment *Trends in Biotechnology*, **11**,117.
- Vicente, A.A., Dluhy, M. & Teixeira, J.A., 1999. Increase of Ethanol Productivity in an Airlift Reactor with a Modified Draught Tube. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **77**, 497.
- Virkajarvi, I. & Linko, M., 1999. Immobilization: A Revolution in Traditional Brewing. *Naturwissenschaften*, **86**, 112.
- Virkajarvi, I. & Kronlof, J., 1998. Long Term Stability of Immobilized Yeast Columns in Main Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **56**,70.
- Virkajarvi, I. & Pohjala, N., 1999. Profiting from Immobilized Fermentation. *Proceedings of the 5th Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*, 290.
- Wackerbauer, K., Fitzner, M. & Gunther, J., 1996a. Technisch-technologische Moglichkeiten mit Immobilisierter Hefe. *Brauwelt*, **136**, 2140.
- Wackerbauer, K., Fitzner, M. & Lopsien, M., 1996b. Untersuchungen mit dem Neuen MPI-Bioreaktor-System. *Brauwelt*, **136**, 2250.
- Webb, C., G.M. Black & B. Atkinson, 1986. *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System*. England: The Institution of Chemical Engineers.

- Westrin, B.A. & A. Axelsson, 1991. Diffusion in Gels Containing Immobilized Cells: A Critical Review. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 439.
- Wu, W.T., Wu, J.Y. & Jong, J.Z., 1992. Mass Transfer in an Airlift Reactor with a Net Draft Tube. *Biotechnology Progress*, **8**, 465.
- Yamane, T., 1981. On Approximate Expressions of Effectiveness Factors for Immobilized Biocatalysts. *Journal of Fermentation Technology*, **59**, 375.
- Yamauchi, Y. & Kashiara, T., 1995a. Kirin Immobilized System. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry*, Espoo, Finland, 99.
- Yamauchi, Y., Kashiara, T., Murayama, H., Nagara, A., Okamoto, T. & Mawatari, M., 1994. Scaleup of Immobilized Yeast Bioreactor for Continuous Fermentation of Beer. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **31**, 90.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Amikura, T., Hiratsu, H., Nagara, A., Kamiya, T. & Inoue, T., 1995b. Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 1. Heat Conversion of α -Acetolactate. *Journal of Biotechnology*, **38**, 101.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Kajino, K., Nagara, A. & Noguchi, K., 1995c. Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 2. Balance of Total Diacetyl Reduction and Regeneration. *Journal of Biotechnology*, **38**, 109.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A. & Kashiara, T., 1995d. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Sulfite Formation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**, 277.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashibara, T., Yoshida, M. & Nakanishi, K., 1995e. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Balance Control of Extract and Amino Acid Uptake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**, 245.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiara, T., Yoshida, M., Yasui, T. & Nakanishi, K., 1995f. Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Minor Products of Carbohydrate Metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **53**, 261.
- Yuan, X., 1987. Application of Immobilization Technique in Brewing Industry. *Shipin Kexue*, **94**, 8.

Zhang, Z., Su, E. & Yu, J., 1998. Studies on Continuous and Rapid Fermentation of Beer by Immobilized Yeast. *Gongye Weishengwu*, **18**, 11.

Povzetek izuma

Pričujoč izum se nanaša na postopek za proizvodnjo namiznih alkoholov, ki obsega kontinuirno fermentacijsko fazo namenjeno cepitvi in/ali vsaj začetnemu kvašenju ječmenovke, ki vsebuje fermentabilne sladkorje.

Zlasti gre tukaj za preferenčen postopek v katerem poteka kontinuirna fermentacija v bioreaktorju s plinskim vlekem ob uporabi kosmičaste (in posebej močno kosmičaste ali superkosmičaste - superflokulanta) vrste kvasa in ob uporabi natančne kontrole kisika.

Posebno preferenčna oblika pričujočega izuma, 'vsaj delno fermentiran' iztok iz kontinuirnega procesa, je voden v šaržno procesno fazo za dodelavo (ki lahko v kontekstu patentnih zahtevkov pričujočega izuma vključuje - ni pa s tem omejen - zaključek fermentacijskega procesa med katerim se ogljikovi hidrati pretvorijo v alkohol).

Pričujoč izum se nanaša na proizvodnjo piva (predvsem svetlih vrst piva, lagerjev in še posebej severnoameriških vrst piva). V tej povezavi glej na primer 'Essentials of Beer Style' - F. Eckhardt.

Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer poteka kontinuirna faza v bioreaktorju s plinskim vlekem

Glede na kontinuirno fazo uporabno v številnih postopkih v okviru tega izuma je preferenčno, da so uporabljene imobilizirane celice (v nasprotju s povsem prostimi celicami) in le ta lahko poteka ob uporabi izbranega z nosilcem imobiliziranega ali kosmičastih kvasov. Navljub prej omenjenemu je preferenčno, da so namesto z nosilcem imobiliziranih celic uporabljeni kosmičasti kvasi, še posebej pa so v ta namen preferirani superkosmičasti kvasi.

Več podrobnosti glede preferenčnih postopkov in prednosti povezanih s kontinuirnimi procesi je predstavljenih v natančnem opisu pričujočega izuma. Te vključujejo uporabo umetnih (npr. kontroliranih) plinskih mešanic in uporabo dušika, ogljikovega dioksida in kisika, kot tudi zraka.

Nadalje, tukaj so predstavljene tudi precejšnje podrobnosti, ki se nanašajo na šaržno zadrževalno procesno fazo. V določenih izvedbenih primerih pričujočega izuma gre smisel šaržno zadrževalnega procesa preko vprašanja končne pretvorbe ogljikovih hidratov, ki so fermentabilni, v alkohole (ki je lahko v vsakem primeru dejansko zaključena v kontinuirni fazi procesa). V takšnih izvedbenih primerih je primarni cilj šaržno zadrževalne procesne faze ujemanje arome (ali remediacija), še posebej v povezavi z diacetilom in acetaldehidom.

Preferenčni izvedbeni primeri pričujočega izuma se nanašajo na po-kontinuirno fazno distribucijo cepljene in/ali vsaj delno fermentirane ječmenovke skozi distribucijsko cev (fiksna cev ali selektivno priključen in izključen vod) med več šaržno zadrževalnimi posodami. V serijskem distribucijskem procesu se najprej napolni ena posoda, nato naslednja in tako dalje. V posebno preferenčnem izvedbenem primeru se kontinuirna reaktorska proizvodna kapaciteta in šaržno zadrževalna kapaciteta ujemata v velikosti in številu reaktorjev/šaržnih posod - tako, da se proizvodna pretočna hitrost časovno ujema v smislu kapacitete. Idealno je končni produkt izpraznjen iz šaržne posode ravno v času njenega čiščenja, ponovne priključitve in nato ponovnega polnjenja iztoka iz obratujoče kontinuirne fermentacijske faze.

V skladu z drugim vidikom pričujočega izuma so določeni izvedbeni primeri vodeni v povezavi z vsebnostjo kisika v ječmenovki/pivu. To se nanaša na obe, kontinuirno in šaržno zadrževalno fazo procesa. Z ozirom na kontinuirno fazo ima koncentracija kisika različne učinke, pomembno pa je, da bi jo bilo verjetno željeno zmanjšati, da bi tako optimirali pretvorbo višjih alkoholov v aktivne estre z aromo. V tej zvezi je znano, da lahko koncentracije višjih alkoholov ostanejo v veliki meri nespremenjene med šaržno zadrževalno procesno fazo, če je uporabljena željena natančna kontrola O_2 za vzpostavljanje esternega aromatskega ravnotežja (angl. 'fusel ester flavour balance'). V tej zvezi je lahko koristno prepihovanje ječmenovke s CO_2 pred kontinuirno fermentacijo.

V enem izvedbenem primeru pričujočega izuma je primarni namen kontinuirne faze procesa skrbeti za cepljenje fermentacije pri šaržnih pogojih, ki se potem dogaja v šaržnem zadrževalnem procesu.

Za večjo zanesljivost so tukaj vključene vsebine prioritetnih dokumentov v celoti in kot take tvorijo del pričujočega opisa kot če bi bile v njem povsem reproducirane.

Podroben opis:

Nadalje sledi dvo-delni natančen opis vidikov pričujočega izuma.

Opis vsebuje in/ali se nanaša na grafe, formule, slike in podobno, od katerih je vsaka v tekstu označena s terminom 'Slika', ki mu sledi specifična identifikacijska številka, in spremljajoče slike, od katerih je vsaka opisana in/ali označena s terminom 'SL.', ki mu sledi specifična identifikacijska številka. Na teh slikah objekti morda niso v točnem razmerju.

V spremljajočih slikah:

- SL. 1 je procesna shema pilotnega kontinuirnega fermentacijskega sistema pri čemer so posamezni deli opreme navedeni v tabeli 5.1.
- SL. 2 je shema 50 l pilotnega bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom (angl. 'gas-lift draft tube (GLDT) bioreactor').
- SL. 3 je prečni prerez reaktorja, ki je prikazan na sliki SL. 2, vključno s pozicijo notranje zanke in notranjega separatorja.
- SL. 4 je podrobna skica glave bioreaktorja prikazanega na sliki SL. 2.
- SL. 5 je podrobna skica telesa bioreaktorja prikazanega na sliki SL. 2.
- SL. 6 je podrobna skica koničnega dna bioreaktorja prikazanega na sliki SL. 2.
- SL. 7 je podrobna skica plinskega cevnega razpršilca bioreaktorja s SL. 2. Skupaj 160 lukenj (premera 0.16 cm) je bilo izluknjanih v cevni razpršilec premera 1.27 cm z 0.8 cm podolžnimi presledki od centra do centra in 0.6 cm prečnimi presledki.
- SL. 8 je diagram kontinuirne proizvodnje kroglic z uporabo statičnih mikserjev (Labatt Patent Application No. 2,133,789).
- SL. 9 je slika steklenih kroglic Siran[®], ki jih proizvaja Schott Engineering.
- SL. 10 je slika diatomejskih zemeljskih kroglic Celite[®], ki jih proizvaja World Minerals.
- SL. 11 je slika κ - karagenanskih gelnih kroglic proizvedenih v laboratorijih Labatt Brewing Company Limited ('Labatt').
- SL. 12 je serija slik, ki predstavljajo nekosmičast kvas, verigotvorni kvas oz. kosmičast kvas. Te slike so bile posnete z uporabo mikroskopsko fokusirane kamere s 100X povečavo.

SL. 13 je mikroskopski posnetek srednje kosmičaste vrste kvasa LCC3021 pri 100X povečavi.

SL. 14 je mikroskopski posnetek superkosmičaste vrste kvasa LCC290 pri 100X povečavi.

SL. 15 je shema statičnega mešalnega postopka za izdelavo kapa-karagenanskih gelnih kroglic. V statičnem mešalu se tekočina pomika skozi mešalo (in ne mešalo skozi tekočino). S tem je zagotovljeno mešanje tekočin kot če bi bile črpane skozi cevovod.

SL. 16 je druga shema bioreaktorskega sistema z notranjo zanko in plinskim vlekem za primarno fermentacijo piva.

→ SL. 17 je fotografija dejanske bioreaktorske posode z notranjo zanko in plinskim vlekem prikazane na SL. 15.

SL. 18 je podrobna skica 13 l (npr. 8 l delovnega volumna) reaktorske posode z notranjo zanko in plinskim vlekem prikazane na SL. 16.

SL. 19 je podrobna risba naglavne plošče bioreaktorske posode: 1 - odprtina za odvzem tekočine za namestitev kisikovega senzorja, 2 - termična odprtina za temperaturni senzor, povezana s termostatskim regulatorjem, 3 - temperaturna sonda, 4 – odprtina za dovod tekočine za namestitev kisikovega senzorja, 5 - inokulacijska odprtina, 6 - membranska vzorčna odprtina z nerjavečim pokrovom.

SL. 20 je profil odprtine za odvzem tekočine za namestitev kisikovega senzorja s polnilno enoto potopljeno v bioreaktorsko tekočo fazo.

SL. 21 je podroben diagram naprave in čelne strani za kontinuirno primarno fermentacijo piva z uporabo bioreaktorskega sistema s plinskim vlekem (glej tabelo 5.1 za podroben opis naprave).

SL. 22 je shematski prikaz mehanizma geliranja karagenana (povzet po Rees, 1972).

SL. 23 je shematski prikaz izrabe sestavin ječmenovke med primarno fermentacijo z imobiliziranim kvasom.

SL. 24 je slika kapa-karagenanske gelne kroglice, ki vsebuje imobiliziran lagerski kvas pri ničnem času fermentacije.

SL. 25 je slika luske lagerskega kvasa omreženega v kapa-karagenansko gelno kroglico po dveh dneh šaržne fermentacije, ki kaže brstične brazgotine na posameznih kvasnih celicah.

SL. 26 je slika zunanjega roba kapa-karagenanske gelne kroglice, ki kaže lagerske kvasne celice po dveh mesecih kontinuirne fermentacije.

SL. 27 je slika lagerskih kvasnih celic na zunanjem delu kapa-karagenanske gelne kroglice po dveh mesecih kontinuirne fermentacije.

SL. 28 je slika lagerskih kvasnih celic v centru kapa-karagenanske gelne kroglice po dveh mesecih kontinuirne fermentacije.

SL. 29 je slika celotne kapa-karagenanske gelne kroglice po šestih mesecih kontinuirne fermentacije; številne počene kroglice so imele votle centre oz. sredine.

SL. 5.8. Učinek mešanja ob razprševanju zraka na temperaturni profil v cilindrokoničnem zadrževalnem rezervoarju za ječmenovko

SL. 5.9 Kontrola raztopljenega kisika v ječmenovki med prenosom iz obrata London.

SL. 6.1 Celotna celična koncentracija in stopnja preživetja v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.2 Celotna celična koncentracija in stopnja preživetja v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.3 Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.4 Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.5 Koncentraciji etanola in glicerola v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.6 Koncentraciji etanola in glicerola v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.7 Koncentraciji diacetila in pentandiona v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.8 Koncentraciji diacetila in pentandiona v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.9 Primerjava koncentracij etanola šarže 1 in šarže 2 v odvisnosti od časa fermentacije. Kvas LCC3021 je bil uporabljen v pilotnem GLDT bioreaktorju.

SL. 6.12. Značilna velikostna porazdelitev kroglic nastalih z uporabo statičnega mešalnega procesa.

SL. 6.13. Značilna kumulativna velikostna porazdelitev kroglic nastalih z uporabo statičnega mešalnega procesa.

SL. 6.14. Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. povprečni kroglični premer (μm).

- SL. 6.15 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. koeficient variacije premera kroglice (%).
- SL. 6.16 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. povprečni kroglični premer (μm).
- SL. 6.17 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. koeficient variacije krogličnega premera (%).
- SL. 6.18 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. povprečni kroglični premer (μm).
- SL. 6.19 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. koeficient variacije krogličnega premera (μm).
- SL. 6.20 Povprečni kroglični premer (μm) vs. število elementov statičnega mešala (N_S).
- SL. 6.21 Koeficient variacije krogličnega premera (%) vs. število elementov statičnega mešala (N_S).
- SL. 6.23. Porazdelitev kroglične velikosti κ -karagenanskih gelnih kroglic uporabljenih v kontinuirnih fermentacijskih poskusih v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.
- SL. 6.24. Kumulativna porazdelitev kroglične velikosti κ -karagenanskih gelnih kroglic uporabljenih v kontinuirnih fermentacijskih poskusih v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.
- SL. 6.28 Celotna koncentracija kvasnih celic LCC290 v mešalnih šaržnih fermentacijah v odvisnosti od fermentacijskega časa.
- SL. 6.29 Stopnja preživetja kvasnih celic izmerjena z metilensko modrim v odvisnosti od fermentacijskega časa.
- SL. 6.30 Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od fermentacijskega časa za LCC290 kvasne šaržne fermentacije.
- SL. 6.31 Koncentracije etanola in glicerola in specifična teža tekočine v odvisnosti od fermentacijskega časa za LCC290 kvasne šaržne fermentacije.
- SL. 6.32 Višina vmesne faze kvasne suspenzije v odvisnosti od časa usedanja. Vrednosti za ta graf so bile zbrane pri različnih fermentacijskih intervalih.
- SL. 6.33 Hitrost usednja kvasne suspenzije v odvisnosti od celične koncentracije.
- SL. 6.34 Koncentracija diketonov v odvisnosti od procenta kisika v razpršilnem plinu.
- SL. 6.35 Koncentracija aldehida v odvisnosti od procenta kisika v razpršilnem plinu.
- SL. 6.36 Koncentracija estrov in 'fuzilnih' alkoholov v odvisnosti od procenta kisika v razpršilnem plinu.

- SL. 6.37 Primerjava končnega produkta z 2% kisika in 20% kisika v razpršilnem plinu z industrijsko proizvedenim pivom in pragovi okusa.
- SL. 6.38 Izvirni podatki zbrani s sistemom za zajemanje podatkov o odzivu Ingold pH sonde na različne raztopine pufrov v odvisnosti od časa.
- SL. 6.39 Kalibracijska krivulja pH sonde prikazana v odvisnosti od izmerjene napetosti električnega toka (V).
- SL. 6.40 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 0.6 .
- SL. 6.41 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 1.2 .
- SL. 6.42 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 2.3 .
- SL. 6.43 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 3.4 .
- SL. 6.44 Odzivni čas na korak spremembe ($N=3$) za Ingold pH sondo.
- SL. 6.45 Odziv pH sonde v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislinski pulz je bil vbrizgan v vodno raztopino, ki ni vsebovala trdnih snovi.
- SL. 6.46 Odziv pH sonde v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislinski pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki je vseboval visoko kosmičast kvas.
- SL. 6.47 Čas pomešanja v odvisnosti od površinske plinske hitrosti v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.
- SL. 6.48 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.
- SL. 6.49 Čas pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.
- SL. 6.50 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislinski pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje visoko kosmičast kvas, LCC290
- SL. 6.51 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislinski pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje kvas, LCC3021, imobiliziran v κ -karagenanske gelne kroglice (velikost kroglice 1-2 mm).
- SL. 6.52 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislinski pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje kvas, LCC3021, imobiliziran v κ -karagenanske gelne kroglice (velikost kroglice 1-2 mm).

- SL. 6.53 Čas pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje srednje kosmičast kvas, LCC3021 (velikost flokul < 0.5 mm).
- SL. 6.54 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje srednje kosmičast kvas, LCC3021 (velikost flokul < 0.5 mm).
- SL. 6.55 Čas pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje različne trdne snovi.
- SL. 6.56 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje različne trdne snovi.
- SL. 6.57 Hitrosti tekočine na prazen presek (mm/s) v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek (mm/s) za štiri testirane sisteme – LCC3021 kvas, LCC290 kvas, karagenanske gelne kroglice in sistem voda/netrdne snovi.
- SL. 6.58 Teoretična hitrost tekočine na prazen presek (mm/s) v odvisnosti od eksperimentalne hitrosti tekočine na prazen presek (mm/s) za štiri testirane sisteme.
- SL. 6.59 Obratovalni parameter za karagenansko imobilizacijsko fermentacijo v odvisnosti od časa fermentacije.
- SL. 6.60 Celotna koncentracija kvasnih celic in stopnja preživetja κ -karagenanskega imobiliziranega kvasa v odvisnosti od časa fermentacije.
- SL. 6.61 Koncentracija etanola in specifična teža karagenansko imobiliziranega kvasa kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.
- SL. 6.62 Profil ogljikovih hidratov karagenansko imobiliziranega kvasa kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.
- SL. 6.63 Koncentracija diketonov karagenansko imobiliziranega kvasa kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.
- SL. 6.64 Obratovalni parameter za fermentacijo LCC290 v odvisnosti od časa fermentacije.
- SL. 6.65 Celotna koncentracija kvasnih celic in stopnja preživetja kvasa LCC290 v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.66 Koncentracija etanola in specifična teža kvasa LCC290 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.67 Ogljikovohidratni profil kvasa LCC290 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.68 Koncentracija diketonov LCC290 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.69 Obratovalni parameter za LCC3021 fermentacijo v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.70 Celotna koncentracija kvasnih celic in stopnja preživetja kvasa LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.71 Koncentracija etanola in specifična teža kvasa LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.72 Ogljikovohidratni profil kvasa LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.73 Koncentracija diketonov LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.74 Koncentracija diketonov v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

SL. 6.75 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

SL. 6.76 Koncentracije estra in 'fuzilnega' alkohola v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

SL. 6.77 Koncentracija etanola in specifična teža v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

SL. 6.78 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290, kvasom LCC3021 in karagenansko gelno imobiliziranim kvasom v sistemu s plinskim vlekom.

- SL. 6.79 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290, kvasom LCC3021 in karagenansko gelno imobiliziranim kvasom v sistemu s plinskim vlekem.
- SL. 6.80 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290, kvasom LCC3021 in karagenansko gelno imobiliziranim kvasom v sistemu s plinskim vlekem.
- SL. 6.81 Prva radarska slika piv fermentiranih kontinuirno v sistemu s plinskim vlekem z uporabo ali LCC290 kvasa, LCC3021 kvasa ali LCC3021 kvasa imobiliziranega v karagenskih gelnih kroglicah.
- SL. 6.82 Druga radarska slika piv fermentiranih kontinuirno v sistemu s plinskim vlekem z uporabo ali LCC290 kvasa, LCC3021 kvasa ali LCC3021 kvasa imobiliziranega v karagenskih gelnih kroglicah. Estri in 'fuzilni' alkoholi končanih piv so predstavljeni na tem grafu.
- SL. 6.83 Radarski graf, ki primerja estre in 'fuzilne' alkohole z dušikom prepihane in s CO₂ prepihane kontinuirne s plinskim vlekem fermentacijske tekočine z industrijsko proizvedeno tekočino.
- SL. 5.7 Koncentracija raztopljenega kisika v ječmenovki v odvisnosti od zadrževalnega časa v shranjevalni posodi za ječmenovko (T-1 ali T-2) pod različnimi pogoji polnjenja posode.
- SL. 5.8.1. Celotna distribucija velikosti delcev kapa-karagenanskih gelnih kroglic, ki vsebujejo imobilizirane celice kvasovk (n=5).
- SL. 6.2 Kemijske strukture lambda, jota in kapa-karagenanov.
- SL. 6.4. a) R1; koncentracije maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.
- SL. 6.4. b) R2; koncentracije maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.
- SL. 6.4. c) R3; koncentracije maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

SL. 6.5. Koncentracija maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za kontrolne fermentacije s prosto suspendiranim lagerskim kvasom (brez imobiliziranih celic).

SL. 6.6. a) Koncentracija maltoze v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije R1, R2 in R3 ob uporabi lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

SL. 6.6. b) Koncentracija etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije, R1, R2 in R3 ob uporabi lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

SL. 6.7. a) Povprečna koncentracija imobiliziranih lagerskih kvasnih celic v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za fermentacije R1, R2 in R3.

SL. 6.7. b) Koncentracija lagerskih kvasnih celic sproščenih v glavno maso tekoče faze v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije.

SL. 6.7. c) Celotna koncentracija (imobiliziranih in v tekoči fazi) lagerskih kvasnih celic v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije.

SL. 6.8. Profil imobilizirane, v tekoči fazi in celotne (imobilizirane in v tekoči fazi) celične koncentracije v odvisnosti od časa fermentacije za R1, prvo od treh ponovljenih šaržnih fermentacij z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

SL. 6.9. Povprečna koncentracija ($n=3$) prosto suspendiranih lagerskih kvasnih celic v kontrolni fermentaciji v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije.

SL. 6.10. Koncentracija imobiliziranega lagerskega kvasa na ml gelnih kroglic v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije.

SL. 6.11. Preživelost (metilensko modro) imobiliziranih lagerskih kvasnih celic v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije.

SL. 6.12. $\ln(X/X_0)$ v odvisnosti od časa šaržne fermentacije med eksponentno fazo rasti povprečnih kontrolnih fermentacij prosto suspendiranega kvasa, kjer je X celična koncentracija pri času t in X_0 celična koncentracija pri času $t=0$ ($n = 3$).

SL. 7.1 Delovanje alfa-acetolaktat dekarboksilaze (ALDC).

SL. 7.2. Koncentracija kvasnih celic v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.

- SL. 7.3. Preživelost kvasovk v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.
- SL. 7.4. Koncentracija prisotnega amino dušika v ječmenovki v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.
- SL. 7.5. Koncentraciji etanola v tekoči fazi in celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glikoza) v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.
- SL. 7.6. Koncentracija celotnega diacetila v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.
- SL. 7.7. Koncentracija acetaldehida v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.
- SL. 7.8. Koncentracija etil acetata v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih.
- SL. 7.9. Koncentracije izoamil acetata, etil heksanoata in etil oktanoata v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju.
- SL. 7.10 Koncentracija izoamil alkohola in izobutanola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju.
- SL. 7.11. Koncentracija 1-propanola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju.
- SL. 7.12. Srednja koncentracija fermentabilne glukoze v odvisnosti od pofermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.13. Srednja koncentracija etanola v odvisnosti od pofermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.14. Srednja koncentracija acetaldehida v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.15. Srednja koncentracija celotnega diacetila v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.16. Srednja koncentracija etil acetata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.

- SL. 7.17. Srednja koncentracija izoamil acetata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.18. Srednja koncentracija etil heksanoata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.19. Srednja koncentracija izoamil alkohola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.20. Srednja koncentracija 1-propanola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.21. Srednja koncentracija izobutanola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.22. Radarski graf normaliziranih koncentracijskih podatkov dobljenih po 48 urah aerobnega in anaerobnega zadrževanja, po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom.
- SL. 7.23. Koncentracija kvasnih celic v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.
- SL. 7.24. Koncentraciji etanola in fermentabilne glukoze v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega zadrževalnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.
- SL. 7.25. Koncentraciji prostega amino dušika in 1-propanola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa kontinuirne fermentacije, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju.
- SL. 7.26. Koncentraciji celotnega diacetila in acetaldehida v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije med kontinuirnim obratovanjem učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v dnevih.

- SL. 7.27. Koncentracija izobutanola in izoamil alkohola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju.
- SL. 7.28. Koncentracija etilacetata in izoamilacetata v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju.
- SL. 7.29. Koncentracija celotnega diacetila v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinek dodatka ALCD na fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 2.
- SL. 7.30. Koncentracija fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) in koncentracija etanola v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinek dodatka ALDC na fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 2.
- SL. 7.31. Celična koncentracija v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinek dodatka ALDC k fermentacijskemu mediju ječmenovke, eksperiment 2.
- SL. 7.32. Koncentracija celotnega diacetila v tekoči fazi v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka dodatka ALDC v fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 3.
- SL. 7.33. Koncentracija etanola in celotnega fermentabilnega sladkorja (kot glukoze) v tekoči fazi v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka dodatka ALDC k fermentacijskemu mediju ječmenovke, eksperiment 3.
- SL. 7.34. Celična koncentracija tekoče faze v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka dodatka ALDC na fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 3.

Natančni opis – del 1:

PRIPRAVA KVASA IN CEPIVA

V fermentacijah v okviru tega dela je uporabljen poliploidni kvas iz družine *Saccharomyces cerevisiae* (tudi *Saccharomyces uvarum* in/ali *Saccharomyces carlsbergensis*). Pivovarska stroka bo često omenjala ta kvas v povezavi s fermentacijo na dnu za proizvodnjo lagerskega piva. To značilnost je mogoče pripisovati sposobnosti lagerskega kvasa, da se izloči iz tekočega medija (tvori usedlino). Ale kvas se bo, v nasprotju z lagerskim kvasom, dvignil na vrh fermentacijske posode in je bil poprej znan

kot vrsta za fermentacijo zgoraj. Sposobnost kvasa, da se usede ali dvigne, ni nujno odvisna od tega ali imamo opraviti s kvasom tipa lager ali ale, pač pa je odvisna od posamezne specifične vrste. Za lagerski kvas je značilno, da ne fermentira pri temperaturah nad 34°C, medtem ko ale kvas ne fermentira melibiozno. Znanstveniki bodo uporabljali te značilnosti za ločevanje lagerskih vrst od ale kvasa (McCabe, 1999).

Srednje kosmičasta vrsta kvasa *Saccharomyces cerevisiae* vrsta 3021 iz Labatt Culture Collection je bila uporabljena za obe, prosto celične samoagregacijske fermentacije in κ -karagenanske imobilizirane fermentacije. Za vrste, ki vključujejo superkosmičasti kvas kot imobilizant, je bila uporabljena različica vrste LCC3021, in sicer LCC290.

Čiste kulture kvasa so bile kriogenično shranjene v zmrzovalniku pri -80°C v Labatt Technology Development Departmentu. Po potrebi so bile sterilne zanke kulture kvasa aerobno pred-vzgajane pri 21°C na PYG agarnih ploščah (3.5 g peptona, 3.0 g kvasnega ekstrakta, 2.0 g KH_2PO_4 , 1.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20.0 g glukoze in 20.0 g agarja raztopljenega v destilirani vodi do volumna enega litra). Izolirane kolonije kvasa so bile nato prenešene v testne cevi, ki so vsebovale 10 ml pasterizirane ječmenovke in so bile inkubirane ob mešanju pri 21°C za 24 ur. To cepivo je bilo progresivno večano do volumna 5l ob dodajanju prejšnje kulture v ustrezne volumne ječmenovke (10 ml v 190 ml, 200 ml v 800 ml in 1l v 4l). Cepivo kvasa je bilo nato prenešeno v centrifugirne kivete in izpostavljeno centrifugiranju pri 10000 obratih na minuto in 4°C za 10 minut. Željena masa kvasa za vse nadaljnje fermentacije je bila izločena iz nastalih mokrih pelet kvasa (30% m/v).

FERMENTACIJSKI MEDIJ

Industrijska lagerska ječmenovka proizvedena v pivovarni Labatt London je bila uporabljena kot hranilni medij za vse fermentacije. Referenca, ki se uporablja v tem delu, se nanaša na specifično težo ječmenovke in je izražena v stopinjah Platona (°P). Formula 4.1 opisuje razmerje med specifično težo in °P.

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

Ječmenovka uporabljena v tem delu je bila 17.5 °P, kar ustreza specifični teži 1.072. Tabela 4.1 vsebuje vrednosti značilnih ogljikohidratnih parametrov ječmenovke izmerjenih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) opisane v poglavju 4.7.2.

Približno 73% ogljikovih hidratov v tej ječmenovki je mogoče fermentirati, medtem ko pivski kvas uporabljen v tej študiji ne zmore zlahka razgraditi 27% ogljikovih hidratov z dolgo verigo.

Tabela 4.1. Značilna ogljikohidratna sestava v ječmenovki uporabljeni v fermentacijskih poskusih. Ječmenovka je bila proizvedena v pivovarni Labatt London in je imela specifično težo 17.5 °P.

	srednja vrednost (g/l)	koeficient variacije (%)	fermentabilnost (%)	nefermentabilnost (%)
fruktoza	3.3	18.0	1.9	
glukoza	16.5	4.3	9.3	
maltoza	87.7	10.1	47.8	
maltotrioza	25.2	10.8	14.2	
maltotetroza	6.4	18.3		3.6
polisaharidi	41.1	9.1		23.2
SKUPNO	177.2		73.2	26.8

Koeficient variacije za večino analiziranih snovi se giblje med 10% in 20%. Ta variabilnost je v veliki meri posledica uporabljenega industrijskega procesa kot tudi variabilnosti surovih materialov od enega kuhanja do drugega.

TIPI IMOBILIZACIJE

Tri vrste imobilizacije - omreženje, adsorpcija in samo-agregacija - so bile proučevane v tej doktorski nalogi. Za industrijske nosilce so najprej predstavljeni podatki dobaviteljev, nato pa je dodana laboratorijska analiza. Slike in velikostne porazdelitve preiskovanih nosilcev (ko so le te na voljo) so v tem primeru predstavljene drugje.

Dve vrsti adsorpcijskih matriksov sta bili testirani v pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Slike obeh nosilcev so predstavljene tukaj. Schott Engineering je zagotovil sintran stekleno kroglični nosilec, Siran®. Izbrani delci so imeli premer 1-2 mm, odprte pore za imobilizacijo kvasa s 55-60% volumnom por in distribucijo velikosti por med 60 in 300 µm, primerno velikostjo za kvasne celice. Za to vrsto nosilcev je bilo objavljeno, da je biološko in kemično stabilna, enostavna za čiščenje, ponovno uporabljiva, sterilizabilna s paro, nekompaktna in nevtralna po okusu in zato odobrena po merilih prehranske industrije.

World Minerals of California je dobavil sferične nosilce izdelane iz diatomejske zemlje. Ta nosilec je zagotovil prednosti termične in kemične stabilnosti, mehanske moči in togosti. Diatomit, osnovni surov material, je pogosto uporabljen v pivovarski industriji za filtriranje piva. Nosilec Celite® R-632 je bil posebej oblikovan za celotno celično imobilizacijo.

Podatki dobavitelja so bili naslednji:

Velikostno območje:	0.595 mm do 1.41 mm (14/30 mrežni odrez)
Povprečni premer pore:	7.0 μm
Celotni volumen pore:	1.19 cm^3/g
Kompaktna (angl. 'compacted bed') gostota:	0.334 kg/m^3 .

Kapa-karagenanske gelne kroglice, nosilec na osnovi omreženja, so bile proizvedene v laboratorijih Labatt Brewing Company Ltd. Proizvodnji proces je opisan v poglavju 5.2 in rezultati tega proizvodnega procesa so predstavljeni v poglavju 6.2.1.

Najenostavnejši način imobilizacije, samoagregacija, je bil mogoč z izbiro vrst kvasa sposobnega kosmičenja oz. flokulacije. Industrijski lagerski kvas LCC3021 ima naravno sposobnost kosmičenja (flokulacije) in se smatra kot srednje kosmičasta zvrst. Med razvojem fermentacije se bodo v tekočem mediju tvorile majhne kepe kvasa, izmerjene od 0.5 mm do 1.0 mm. Kvas LCC290, različica lagerskega kvasa LCC3021, bo tvoril mnogo večje kosme (od 1.0 mm do 5.0 mm odvisno od stopnje mešanja) in se zato klasificira kot superkosmičasti kvas. Slike različnih kvasnih kosmov so predstavljene tukaj.

VZORČNI PROTOKOL

Med fermentacijskim procesom je bilo potrebno vzorčenje iz fermentacijske tekočine v številnih časovnih intervalih. Da bi izvedli to nalogo, so bile nabavljene vzorčne posode pri Scandi-brew®. Te posode so bile izdelane iz nerjavečega jekla in so bile opremljene s celico (omejeno z zgornjo in spodnjo odprtino) v kateri je lahko shranjen etanol, da bi tako vzdrževali aseptično okolje. Pred odvzemom vzorca, je etanol spuščen iz celice z odstranitvijo pokrova iz spodnje odtočne cevi. Svež etanol (75 volumskih %) teče skozi celico, pokrov pa je potem nameščen na zgornjo odprtino posode. Vzvod posode je nato potegnjen in približno 50 ml tekočega vzorca je zbranih v sterilizirni posodi. Drugi vzorec

je zbran za fermentacije in vsebuje superflokulacijski kvas, tako da lahko poteka primerna deflokulacija pred celično enumeracijo. Ko je vzorčenje končano, je celica posode sprana z vročo vodo in perocetno kislino in nato končno z etanolom. Zadrževalni pokrov je nameščen na spodnjo odtočno cev, celica pa je nato napolnjena z etanolom in tako pripravljena za naslednje vzorčenje.

MIKROBIOLOŠKI MONITORING

Štetje kvasnih celic in določanje stopnje preživetja z metilensko modro metodo

Tekoči vzorci, ki vsebujejo prosto suspendirane kvasne celice, so najprej zbrani iz fermentacijskega medija z zgornjim vzorčnim postopkom. Hauser Scientific Company hemacitometer z volumnom 10^{-4} ml je uporabljen v povezavi s svetlobnim mikroskopom za izvedbo štetja celic. Tekoči vzorci morajo biti razredčeni z destilirano vodo, da bi tako dosegli celotni kvasno število od 150 do 200 celic v področju štetja. Heggart s sodelavci (1999) opisuje vse faktorje, ki vplivajo na stopnjo preživetja in razvojne značilnosti kvasa.

Z namenom, da bi ocenili stopnjo preživetja znotraj vzorca, je bila uporabljena metilensko modra tehnika opisana v American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee ASBC, 1992). Žive celice lahko razbarvajo metilensko modre madeže z njihovo oksidacijo. Mrtve celice bodo nasprotno ostale modre. Pri pripravi metilensko modrega za določanje stopnje preživetja so bili uporabljeni naslednji reagenti:

Raztopina A: 0.1 g metilensko modrega v 500 ml destilirane vode

Raztopina B: 13.6 g KH_2PO_4 v 500 ml destilirane vode

Raztopina C: 2.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml destilirane vode

Fink-Kuhl pufrano metilensko modro je bilo nato pripravljeno z mešanjem 500 ml raztopine A z 498.75 ml raztopine B in 1.25 ml raztopine C, da bi tako dobili končno zmes s pH 4.6.

Zmes razredčene celične suspenzije in metilensko modrega je bila pripravljena v testni cevi (angl. 'test tube') in nato močno mešana. Po nekajminutnem počivanju te zmesi (s tem je zagotovljen kontakt med celicami in barvilom), je bila kapljica tekočine nameščena med hemacitometrijskim steklom za štetje in pokrovom (definiran volumen). Procent živih (preživelih) celic je bil nato določen s štetjem obeh, živih in mrtvih celic znotraj področja štetja in nato z deljenjem števila živih celic s celotnim številom celic.

4.5.2. Štetje imobiliziranih kvasnih celic - samoagregacija

Ob uporabi kvasnih celic, ki težijo k tvorbi kosmičev, postane zelo težko točno določiti število celic prisotnih v tekočem vzorcu, ker bodo celice težile k usedanju v vzorčni posodi. Da bi dobili reprezentativni vzorec, je potrebno uporabiti deflokulacijsko sredstvo. V teh eksperimentih je bilo uporabljenih 0.5 volumskih procentov raztopine žveplove kisline za destabilizacijo flokuliranih kvasnih celic. Tako je mogoče izvesti reprezentativno štetje kvasnih celic. Isto štetje in postopek za določanje stopnje preživetja, opisan v poglavju 4.5.1, je bil uporabljen z žveplovo kislino, ki je nadomestila destilirano vodo kot sredstvo za razredčenje.

Štetje imobiliziranih kvasnih celic - gelne kroglice

Preden je bilo izvedeno kvasno štetje na gelu omreženih celic, je bilo potrebno 'razbiti' gelni matriks z uporabo aparata Polytron® (Brinkmann Instruments). Vzorec kroglic je bil najprej prepuščen skozi sterilno sito (500 µm mrežna velikost) in nato spran s sterilno vodo. En mililiter na gelu omreženih celičnih kroglic in 19 ml destilirane vode je bilo nato dodanih v 50 ml vzorčno posodo. Polytron® je bil nato uporabljen za fizično razbitje gela in nato za izpuščanje kvasa v raztopino. Metodi štetja in določanja stopnje preživetja opisani v poglavju 5.5.1 sta bili nato uporabljeni na vzorcu razbitega gela.

Nadzor kontaminacije

Vse fermentacije, ki so bile izvedene v okviru tega dela, so bile redno nadzirane za kontaminacijo. Program nadzora je obsegal najmanj en pregled tekočine v 50-l kontinuirnih fermentorjih in ječmenovke v posodah za shranjevanje na teden. Tekoči vzorci so bili vzorčevani aseptično in so bili nato nanešeni na gojiščne plošče agarja iz Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories) z 10 mg/l cikloheksimida. Ti testni vzorci so bili nato inkubirani pri 28 °C do 10 dni pri obeh aerobnih in anaerobnih pogojih. Anaerobni pogoji rasti so bili vzpostavljeni s postavitvijo izbranih plošč v posode, ki so vsebovale AnaeroGen® paket (Oxoid), ki odstranjuje kakršenkoli preostali kisik. Uporaba indikatorskega traku (le ta postane roza ob prisotnosti kisika) je omogočala preverjanje, če je okolje res anaerobno. V kolikor bi bili v tekočem vzorcu prisotni bakterijski onesnaževalci, bi bili le ti detektirani s to metodo.

Določanje divjega ali nevarilnega kvasa (angl. 'non-brewing yeast') je zahtevalo posebno ločeno gojišče, ki ne bi omogočalo rasti bakterij in/ali varilnega kvasa (angl. 'brewing

yeast'). Plošče pripravljene s kvasnim medijem (YM, Difco Laboratories) z dodanim 0.4 g/l CuSO_4 so bile uporabljene za selektivno rast kateregakoli potencialnega divjega kvasa (inkubacija pri 25°C za 7 dni). Inkubiranje tekočega vzorca nanešenega na PYN agar (Peptone Yeast-Extract Nutrient, Difco Laboratories) za 7 dni pri 37 °C je omogočilo detekcijo ne-lagerskega varilnega kvasa. Rast lagerskega kvasa je bila inhibirana pri temperaturah nad 34 °C tako, da bi kakršnakoli rast na teh ploščah nakazovala kontaminacijo z ale kvasom.

ANALIZNE METODE

Ustrezne kalibracije so bile izvedene na relevantni opremi kot je predpisano v standardnih industrijskih operativnih postopkih.

Etanol

Koncentracija etanola v pivu in fermentacijskih vzorcih je bila analizirana z uporabo plinske kromatografske metode, ki jo je opisal tehniški in uredniški komite (Technical Committee and the Editorial Committee) združenja American Society of Brewing Chemists (1992). Degaziran vzorec tekočine je bil zmešan s 5% v/v izopropanolnega internega standarda, sledil pa je vbrizg 0.2 µl te zmesi v plinski kromatograf Perkin Elmer 8500. V nadaljevanju so navedeni sestavni deli plinskega kromatografa:

Plinski ionizacijski detektor (FID)

Avtomatski vzorčevalnik Dynatech

Chromosorb 102, 80-100 mrežnih podpornih tesnil (angl. 'mesh support packing')

Helij kot nosilni plin s pretokom 20 ml/min

Temperatura injektorja je bila 175°C, temperatura detektorja je bila 250°C in izotermna temperatura kolone je bila 185°C.

Ogljikovi hidrati

Koncentracije glukoze, fruktoze, maltoze, maltotrioze, maltotetroze, polisaharidov in glicerola so bile merjene z uporabo sistema tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (Spectra-Physics SP8100XR HPLC). Kationsko izmenjevalna kolona (Bio-Rad Aminex HPX-87K) z dibazičnim kalijevim fosfatom kot mobilno fazo je bila uporabljena za ločevanje teh ogljikovih hidratov med eluiranjem skozi sistem. Količina snovi je bila nato določena z uporabo detektorja na osnovi lomnega količnika za generiranje ustreznih pikov

oz. vrhov spojine. HPLC je obratoval pod protitlakom 5.52 MPa, temperatura kolone je bila 85°C, temperatura detektorja pa 40°C. Vzorci so bili degazirani in razredčeni do ustreznih nivojev. V sistem je bilo nato vbrizganih 10 ml pri pretočni hitrosti 0.6 ml/min.

Pivovarna industrija pogosto uporablja drugo merilo za ocenjevanje oz. vrednotenje skupnih ogljikovih hidratov v tekočinah. Specifična teža tekočine izražena v stopinjah Platona je bila izmerjena z Anton Paar DMA-58 Densitometrom. Filtrirani in degazirani vzorci so bili prenešeni v posebno stekleno u-cevko, ki je bila nato izpostavljena elektronski oscilaciji. Frekvenca oscilacije skozi tekočino je bila izmerjena in nato korelirana na specifično težo tekočine (g/100 g ali °P). Omenjeno mora biti, da je ta meritev aproksimacija celotne koncentracije ogljikovih hidratov vzorca (ali specifična teža), ker so kalibracije izvedene z vodnimi raztopinami sukroze pri 20 °C katere specifična teža je enaka zadevni ječmenovki.

Diketoni (angl. 'vicinal diketones')

Koncentraciji celotnega diacetil(2,3-butandiona) in celotnega 2,3-pentandiona sta bili določeni z uporabo plinskega kromatograma Perkin Elmer 8310 opremljenega z elektronskim 'capture' detektorjem. Kot nosilni plin je bil uporabljen 5% metana v nosilnem plinu argonu pri pretoku 1.0 ml/min, vzorec pa je bil voden skozi kolono J&W DB-Wax. Temperatura injektorja je bila vzdrževana pri 105 °C, medtem ko je bila temperatura detektorja nastavljena na 120 °C. Avtomatski 'headspace' vzorčevalnik Hewlett Packard 7694E je bil uporabljen za analizo. Količina je bila izračunana z ovrednotenjem površine pika izbrane vzorčne komponente in je bila nato primerjana s kalibracijsko vrednostjo internega standarda 2,3-heksandiona.

Z namenom, da bi določili 'celotno' koncentracijo teh spojin, je bilo najprej potrebno vzpostaviti temperaturo vzorcev na 65 °C in jo nato vzdrževati 30 minut. Ta predobdelava vzorca je omogočala pretvorbo α -acetolaktata in α -hidroksibutirata v njune diketone, diacetil in 2,3-butandion.

Estri in višji alkoholi

Nekatere najbolj pomembne aromatizirane spojine, ki so bile detektirane v pivu, so bile določene z uporabo 'headspace' plinske kromatografske metode. Acetaldehid, etilacetat, izobutanol, 1-propanol, izoamil acetat, izoamil alkohol, etil heksanoat in etil oktanoat so bili določeni oz. izmerjeni z uporabo n-butanola kot internega standarda. Plinski

kromatograf Hewlett Packard 5890 je bil opremljen s plinskim ionizacijskim detektorjem, HP7994 'headspace' avtomatskim vzorčevalnikom in J&W DB-Wax kapilarno kolono. Temperatura injektorja je bila nastavljena na 200 °C, temperatura detektorja pa na 220 °C. Temperaturni profil peči je bil naslednji: 40°C za 5 min, dvig od 40°C do 200°C pri hitrosti 10°C/min, dvig od 200°C do 220°C pri hitrosti 50 °C/min in končno zadrževanje pri 220°C za 5 min. Helijev maskirni plin pri 30 ml/min (0.19 MPa), vodikov tok pri 50 ml/min (0.17 MPa) in zračni tok pri 300 ml/min so bili dopolnilo helijevemu nosilnemu plinu s pretokom 6.0 ml/min. Celoten GC cikel za vzorčno zanko 1 ml je bil 40 minut.

Druge analize

Po potrebi so bile izvedene tudi številne druge analizne meritve fermentacijske tekočine, ki je bila izpostavljena zorenju in zgoščevanju (angl. 'packaging'). Končne analize produkta so bile izvedene v oddelku Labatt Quality Control in sicer po standardih, ki veljajo za končano pivo. Metode, ki jih je predpisal tehniški in uredniški komite (Technical Committee and the Editorial Committee) združenja American Society of Brewing Chemists (1992), so bile osnova za te meritve. Seznam analiz kot tudi podroben opis pomembnosti teh meritev je podan v tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Analize kontrole kvalitete in opis

Oznaka	Opis
Zrak	Celotna količina zraka porabljena med procesom zgoščevanja (angl. 'packaging'); vrednost je manj kot 1 ml.
Ogljikov dioksid	Stopnja karbonizacije produkta; podana v % z vrednostjo 2.75 %.
Žveplov dioksid	Količina žveplovega dioksida v pivu izmerjena z GC; cilj <10 mg/l.
Dimetil sulfid	Količina dimetil sulfida (vonj kuhane koruze) v pivu izmerjena z GC; cilj <70 mg/l.
Grenkoba	Grenkoba, ki jo pivu daje hmelj; meritev alfa-kislin v pivu; 1 enota grenkobe (BU) je ekvivalentna približno 1 mg/l alfa-kisline.
Barva	Barva piva izmerjena s spektrofotometrom; absorbanca vzorca pri 430 nm na svetlovni poti 1,27 cm.
pH	Izmerjen z uporabo kalibriranega pH metra; $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$
Navidezni ekstrakt	Količina razpoložljive topne mase v tekočini, ne da bi bil kompenziran učinek alkohola, na osnovi relativne gostote tekočine; izmerjen s hidrometrom in podan kot °P; AE.
Pravi ekstrakt	Enak kot navidezni ekstrakt, ne da bi bil v meritev vključen alkohol; RE
Izračunan prvoten ekstrakt	Na osnovi Ballingovega eksperimenta, da iz 2.0665 g ekstrakta nastane 1.000 g alkohola; $\text{COE} = 100 * [(2.0665 * (\% \text{ m/m alkohol}) + \text{RE}) / (100 + 1.0665 * (\% \text{ m/m alkohol}))]$.
Topla motnost (angl. 'warm haze')	Megla (motnost) prisotna v pivu pri sobni temperaturi (21°C), ne da bi bil sediment mešan; ovrednotena z uporabo nefelometrične metode na osnovi sipanja svetlobe in podana kot formazinska enota motnosti (angl. 'Formazin Turbidity Unit') (FTU); vrednost je < 200 FTU.
Začetna mrzla motnost (angl. 'initial chill haze')	Megla, ki nastane v pivu, ko je ohlajeno iz sobne temperature (21°C) na 0°C, ne da bi bil mešan sediment; metoda merjenja kot je opisana zgoraj; vrednost je < 100 FTU.
Pena	Meritev sposobnosti penjenja piva z uporabo instrumenta NIBEM; pena se tvori na kontroliran način; zabeležena je hitrost razpada pene; vrednost je > 170 sekund.

PROTOKOL USE DANJA KVASA - LCC290

Priprava testnega vzorca kvasa

Superkosmičast (superflokulacijski) kvas (LCC290) je rasel v ječmenovki, kot je opisano v poglavju 4.1. To cepivo (inokulum) je bilo nato centrifugirano pri 4°C in 10000 obratih na minuto za 15 minut z namenom, da bi tako dobili krogeljico (kepo) kvasa (angl. 'yeast pellet') za nadaljnjo cepljenje (inokulacijo). Ječmenovka, kot opisana v poglavju 4.2. je bila pasterizirana pri 100°C za 60 minut, nato pa je bil en liter aseptično prenešen v 6 x 2 l sterilizirane stresalne steklenice. Vsaka stresalna steklenica je bila cepljena (inokulirana) s 4 g centrifugiranega kvasa. Steklenice so bile postavljene na stresalnik, ki obratuje pri 135 obratih na minuto (21°C sobna temperatura) in prepuščene fermentiranju. Po ena steklenica je bila nato izločena pri naslednjih časovnih intervalih: 24h, 40h, 48h, 64h, 71h in 192h. Pri vsakem intervalu je bila odvzeta majhna količina tekočega vzorca za analizo ogljikovih hidratov in za določanje koncentracije kvasa ter stopnje preživetja (dejanske metode so opisane v poglavju 4). Preostala zmes tekočina/kvas je bila nato podvržena protokolu usedanja kvasa opisanem v poglavju 4.7.2.

Protokol usedanja kvasa

Hitrost usedanja LCC290 superkosmičastega kvasa je bila merjena z eno izmed naslednjih metod. Vsak vzorec je bil prepuščen fermentiranju do željenega intervala kot je opisano v poglavju 4.7.1. V predpisanem času je bila odvzeta ustrezna vzorčna steklenica. Vzorci so bili nato stresani z namenom, da bi zagotovili suspendiranje vseh delcev. Vsebine steklenice so bile nato nemudoma prenešene v 1000 ml graduiran cilinder. Po usedanju kosmičev, je bila izmerjena razdalja med vrhom tekočine in vmesno fazo med tekočino in kosmiči, in sicer v intervalih po 30 sekund. Usedalna hitrost je bila izračunana z uporabo naslednje enačbe:

$$\text{Usedalna hitrost} = \frac{\Delta H}{\Delta t} = \frac{(H_o - H_t)}{(t - t_o)} \quad (5.1)$$

Z uporabo standardne Kynch metode (1952) je bila, iz usedalnih krivulj dobljenih za vsak fermentacijski interval, napravljena krivulja odvisnosti usedalne hitrosti od celične koncentracije.

METODI OBKROŽILNE IN POMEŠALNE HITROSTI (angl. 'CIRCULATION & MIXING RATE METHODS')

Da bi lahko merili čas pomešanja in obkrožilno hitrost znotraj trofaznega bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom, je bil uporabljen vbrizgalni sistem za kislino, ki je bil povezan s sistemom za zajem podatkov. Z vbrizgom močne kisline v bioreaktor je bilo mogoče izračunati oboje, hitrost obkroženja in čas pomešanja s spremljanjem spremembe pH v času in ju nato primerjati z enačbami prikazanimi v poglavju 3.2.2. Sistem zajemanja podatkov je bil sestavljen iz:

Ingold pH sonde (Cole-Palmer, kat. #P-05990-90) povezane s Ingold Microprocessor-Based pH Transmitter-jem (model 2300)

Kartice za prenos podatkov DT2805

Osebnega računalnika 386DX

Programa za zajemanje podatkov Quick Basic (napisan leta 1994, avtorja C. Hudson in J. Beltran, prilagojen leta 1998, spremembe opravil N. Mensour).

10 mililitrov 10 N klorovodikove kisline je bilo vbrizganih v krožni odsek bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom (diagram na sliki 5.5) takoj pod mestom, na katerem je nameščena pH sonda. Ta razdalja je ustrezala višini 26 cm pod naglavno ploščo. PH sonda je bila dvotočkovno kalibrirana s certificiranimi standardnimi pufri (Beckman pH 7.0 zeleni pufer in Beckman pH 4.0 rdeči pufer) pred vsemi mešalnimi eksperimenti. 4-20 mA tok, ki ga je generiral pH meter, je bil povezan s priključno ploščo, kjer je bil tok pretvorjen v napetost, ki je bila nato merjena s kartico za zajem podatkov, nameščeno v računalniku. Program za zajem podatkov je bil sprožen v trenutku ob vbrizgu kisline. Dolžina zbiranja podatkov je bila 5 minut, frekvenca vzorčenja pa 50 Hz. Število vrst v programu je bilo nastavljeno na 3750 (skupaj je bilo zbranih 15000 točk) z dodatkom 1 vrste za kartični zajem podatkov.

Zbrani podatki so bili nato prenešeni iz laboratorija v močnejši računalnik (mikroprocesor Pentium II) za nadaljnjo analizo. TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Canada) je bil znatno uporabljen za analizo podatkov zaradi njegove sposobnosti obravnavanja velike množine podatkov, kot tudi njegovih številnih vgrajenih funkcij za

ravnanje s podatki (glajenje podatkov, prilagajanje krivulji, itd.). Savitzky-Golay algoritem, časovna metoda glajenja podatkov na osnovi metode najmanjših kvadratov (v tem primeru je bil uporabljen polinom druge stopnje), je bila uporabljena za odstranjevanje eksperimentalnega šuma. Zglajeni podatki so bili nato prilagojeni tako, da so odražali spremembo pH vrednosti bolj kot dejansko pH meritev. Padajoča sinusoidna funkcija je bila povlečena skozi prilagojene podatke. Čas pomešanja in hitrost obkroženja fluida so bile nato izračunane iz prilagoditvenih parametrov.

Ti mešalni eksperimenti so bili izvedeni na dejanskih fermentacijah v 50l bioreaktorju s plinskim vlekem z enim od treh prisotnih imobilizacijskih nosilcev (ali superkosmičastega kvasa LCC290, srednje kosmičastega kvasa LCC3021 ali α -karagenanskih gelnih kroglic). Tekoča faza je bilo fermentirano pivo s specifično težo 2.5°P, plinska faza pa je bila sestavljena iz razršilnega ogljikovega dioksida. Fermentacijska temperatura je bila kontrolirana na 15 °C. Hitrosti razpršenega plina na prazen presek so bile med 2.0 in 6.0 mm/s. Pri dani pretočni hitrosti plina je bilo v sistemu vzpostavljeno ravnotežje za 10 minut. Sledil bi test vbrizgavanja kisline, ki se ponovi tri krat. Nato bi bila izbrana naslednja pretočna hitrost plina, pH zmesi znotraj reaktorja pa bi bil vzpostavljen na začetni nivo.

NAČRTOVANJE PILOTNE NAPRAVE BIOREAKTORJA Z NOTRANJO ZANKO IN PLINSKIM VLEKOM

BIOREAKTORSKI SISTEM Z NOTRANJO ZANKO IN PLINSKIM VLEKOM

Sistemi z notranjo zanko in fluidiziranim slojem (angl. 'draft tube fluidized bed (DTFB)') so se izkazali kot zelo uporabni v trofaznih sistemih. Da bi lahko izvedli eksperimentalno delo za to nalogo, sta bila načrtovana, zgrajena in postavljena za obratovanje dva identična pilotna bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekem v eksperimentalni pivovarni Labatt Brewing Company Ltd. V nadaljevanju so bile številne obstoječe posode modificirane za obe funkciji, shranjevanje ječmenovke in zbiranje piva. Diagram poteka na SL. 1 prikazuje celoten proces uporabljen v pilotnih kontinuirnih fermentacijskih eksperimentih in tabela 5.1 navaja bolj podroben opis opreme prikazane na SL. 1.

Ječmenovka je bila dobavljena iz obrata London Brewing skozi 5.08 cm vode iz nerjavečega jekla in nato prenešena v rezervoarja za shranjevanje (WT1 & WT2) s 1600 l delovnim volumnom. S sistemom z dvema rezervoarjema je bilo mogoče zagotoviti kontinuirno dobavo hranilnega medija v pilotna kontinuirna fermentorja (R_1 & R_2). Vsak zadrževalni rezervoar je bil opremljen z razpršilnim ogljikovodikovim sistemom za kontrolo kisika in homogenosti in plaščnim sistemom za hlajenje z glikolom za kontrolo temperature. Ta centralni vir hranilnega medija je bil postavljen za oskrbovanje 3 neodvisnih fermentorjev skozi vodilni sistem ventilov (V7, V8 & V9). Masterflex peristaltični črpalki (P1 & P2) sta bili uporabljeni za dovajanje predpisanega toka ječmenovke na pilotno napravo bioreaktorjev (R_1 & R_2).

Tabela 5.1. Opis individualne opreme predstavljene na sliki 5.1.

<i>Predmet</i>	<i>Opis</i>
Zrak	Dobava 0.69 MPa zraka iz obrata London
CO ₂	Dobava 0.69 MPa ogljikovega dioksida iz obrata London
F1	Sterilni filter na vstopu ogljikovega dioksida
F2	Sterilni filter na vstopu ogljikovega dioksida
F3	Sterilni filter na odprtini izstopa iz WT1
F4	Sterilni filter na odprtini izstopa iz WT2
F5	Sterilni filter na vstopu razpršilnega plina
F6	Sterilni filter na vstopu razpršilnega plina
F7	Sterilni filter na izstopu iz WBT1
GLR	Glikolni povratni vod; 0.17 MPa
GLS	Glikolni dobavni vod; 0.31 MPa
NV1	Iglični ventil za ogljikov dioksid
NV2	Iglični ventil za ogljikov dioksid
NV3	Iglični ventil na vstopu zraka
NV4	Iglični ventil na vstopu ogljikovega dioksida
NV5	Iglični ventil na vstopu zraka
NV6	Iglični ventil na vstopu ogljikovega dioksida
P1	Masterflex peristaltična polnilna črpalka za R1
P2	Masterflex peristaltična polnilna črpalka za R2
PR1	Tlačni regulator za ogljikov dioksid

<i>Predmet</i>	<i>Opis</i>
PR2	Tlačni regulator za ogljikov dioksid
PR3	Tlačni regulator za zrak
PR4	Tlačni regulator za ogljikov dioksid
PR5	Tlačni regulator za zrak
PR6	Tlačni regulator za ogljikov dioksid
R1	Pilotni biorektor z notranjo zanko in plinskim vlekom, 50l delovni volumen
R2	Pilotni biorektor z notranjo zanko in plinskim vlekom, 50l delovni volumen
RM1	Rotameter za ogljikov dioksid; območje od 0 do 0.57 standardnih kubičnih metrov na uro - sm^3h^{-1} (0 do 20 scfh)
RM2	Rotameter za ogljikov dioksid; območje od 0 do 0.57 sm^3h^{-1} (0 do 20 scfh)
RM3	Rotameter za zrak; območje od 0 do 0.07 sm^3h^{-1} (0 do 2.5 scfh)
RM4	Rotameter za ogljikov dioksid; območje od 0 do 0.28 sm^3h^{-1} (0 do 10 scfh)
RM5	Rotameter za zrak; območje od 0 do 0.07 sm^3h^{-1} (0 do 2.5 scfh)
RM6	Rotameter za ogljikov dioksid; območje od 0 do 0.28 sm^3h^{-1} (0 do 10 scfh)
V1,V2,V3	Metuljni ventili na vstopu/izstopu iz WT1
V4,V5,V6	Metuljni ventili na vstopu/izstopu iz WT2
V7,V8,V9	Kroglični ventili na porazdelitveni glavi za ječmenovko
V10,V11	Kroglični ventili na vstopu ječmenovke v R1
V12	Ventil za hitro prekinitev na vstopu razpršilnega plina
V13	Metuljni ventil na izstopu iz R1
V14,V15	Kroglični ventili na vstopu ječmenovke v R2
V16	Ventil za hitro prekinitev na vstopu razpršilnega plina
V17	Metuljni ventil na izstopu iz R2
V18	Metuljni ventil na izstopu iz WBT1
WBT1	Odpadni rezervoar za pivo; 200 l delovni volumen
WT1	Rezervoar za hranjenje ječmenovke opremljen z glikolnim plaščem in razpršilno kapaciteto; 1600l delovni volumen
WT2	Rezervoar za hranjenje ječmenovke opremljen z glikolnim plaščem in razpršilno kapaciteto; 1600l delovni volumen

Ogljikov dioksid in zrak sta bila razpršena v sistem s plinskim vlekem skozi plinska cevna razpršilca iz nerjavečega jekla (SL. 7). Rotametri (RM3, RM4, RM5 & RM6) so bili uporabljeni za spremljanje pretočnih hitrosti vbrizganih v sistem. Sterilni filtri (0.2 μ m pore) so bili nameščeni na plinske vode, da bi tako onemogočili vstop kontaminantov v bioreaktorje. Produkt je iztekal iz reaktorja skozi s prelivom na ustrezni višini (SL. 4). Napajalna črpalka sama je zato kontrolirala zadrževalni čas tekočine. Oba reaktorja (R1 & R2) sta bila povezana z odpadnim rezervoarjem za pivo (WBT1) za zbiranje odvečne tekočine. Posebni 50 l zbiralni rezervoarji so bili uporabljeni za zbiranje produkta in za njegovo predelavo po potrebi.

Bolj podrobni diagrami in natančne dimenzije 50 l pilotnega bioreaktorja so predstavljeni v poglavju 5.1.1. Obdelovanje ječmenovke in protokol shranjevanja bo prikazan v poglavju 5.1.2., medtem ko bodo protokoli za čiščenje in sterilizacijo za kontinuirni fermentacijski sistem obravnavani v poglavju 5.1.3. Poglavje 5.1.4. obravnava fermentacijski protokol, ki je upoštevan v okviru tega dela.

Načrtovanje reaktorja & specifikacije

Bioreaktor s 50 l delovnim volumnom, ki je bil načrtovan za to delo, je bil v celoti zgrajen iz 304 l nerjavečega jekla s 4 gledalnimi okni iz Plexi-stekla na telesu reaktorja, tako da je bilo omogočeno opazovanje gibanja delcev in fluida. Material za izdelavo je bil izbran na osnovi njegove odpornosti na sanitarne kemikalije (baza in kislina) kot tudi na osnovi odpornosti na sterilizacijo s paro. Naslednji pomemben vidik načrtovanja je bilo minimiziranje direktnega kontakta izrezanih navojev (angl. 'threaded fitting') s fermentacijskim medijem. Namesto tega so bile odprtine zavarjene in ko je bilo potrebno, so bili uporabljeni sanitarni 'fitingi' TriClover. Reaktor je bil načrtovan tako, da je bilo območje glave nekoliko razširjeno, da bi bila tako maksimirana sprostitev plina in zato omogočen boljši prenos snovi na fazni meji med tekočino in trdno snovjo (Chisti & Moo-Young, 1993). Reaktorsko dno je bilo načrtovano z 90° koničnim kotom, da bi bila zmanjšana možnost zbiranja trdnih snovi na dnu. SL.2 je shematski prikaz 50 l pilotnih sistemov, ki so bili postavljeni v Labatt Experimental Brewery. Ta diagram prikazuje mesto vhoda razpršilnega plina, vhoda tekočine, glikolni hladilni plašč, izhod produkta, sistem za merjenje in kontroliranje temperature, kot tudi mesto dveh sanitarnih vzorčnih

odprtini. SL. 3 je shematski prikaz enakega GLDT bioreaktorja z dimenzijami izraženimi v centimetrih. SL.4 do SL.6 so podrobni prikazi 50 l bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekem v prerezu in SL.7 je shema plinske razpršilne naprave uporabljene v teh eksperimentih.

Notranja zanka in separator delcev ('baffle') sta prikazana na SL.3. Razmerje premera notranje zanke in premera reaktorja $2/3$ je bilo izbrano na osnovi literaturnih podatkov (Chisti, 1991). Velikost separatorja delcev je bila določena za boljšo separacijo plina iz zmesi trdne snovi in tekočine. S povečanjem premera te separirne naprave (20.32 cm v primerjavi s premerom notranje zanke 10.16 cm) je mogoče dobiti večjo razliko med hitrostjo dvigovanja mehurčkov in hitrostjo spusta fluida tekoče-trdno. Količina plina ujeta v vratu sistema z notranjo zanko se bo znižala kar bo vodilo do boljšega prenosa snovi na fazni meji trdno-tekoče.

Cevni razpršilec (SL. 7) je bil načrtovan za vbrizg mešalnega plina ogljikovega dioksida v notranjo zanko. V razpršilec s premerom 1.27 cm je bilo skupaj izvrtanih 160 lukenj premera 0.16 cm. Luknjice so bile razporejene z razmikom 0.8 od centra do centra v vzdolžni smeri in z razmikom 0.6 cm od centra do centra po širini (8 vrst z 20 luknjicami). Ker je bila primarna funkcija razpršilnega plina mešanje, je bil izbran premer razpršilne luknjice 0.16 cm.

Obdelava ječmenovke in protokol shranjevanja

V tradicionalnih fermentacijskih procesih ječmenovka ni dolgo zadržana ne da bi bila cepljena s kvasom. Oksidirana ječmenovka je odlično gojišče za številne organizme, vključno s kvasovkami. Ker fermentacijski protokol za kontinuirne sisteme s plinskim vlekem zahteva zadrževanje velikih količin ječmenovke, je bilo potrebno razviti protokola za prenos in zadrževanje ječmenovke. Mnenje raziskovalcev je bilo, da je lahko neoksidirana hladna ječmenovka shranjena za do dva tedna ne da bi bila kontaminirana, če je ječmenovka poprej ustrezno prenešena v zadrževalno posodo.

Domnevno je bilo potrebno zagotoviti, da je bila temperatura ječmenovke kontrolirana približno enkrat znotraj zadrževalne posode za ječmenovko. Razpoložljiv rezervoar v Experimental Brewery je bil v osnovi načrtovan bolj za fermentacijo kot za hranjenje ječmenovke. Izveden je bil test sposobnosti rezervoarja za vzdrževanje temperature mirno-stoječe tekočine. Slika. 2 nazorno prikazuje, da te posode ne morejo biti uporabljene brez

mešanja, če mora biti vzdrževana konstantna temperatura 4°C. Ječmenovka je bila v začetku uvedena v te posode pri temperaturi 4°C. Meritve temperature so bile izvedene na številnih točkah v rezervoarju z namenom, da bi bolje razumeli dejansko stanje temperature. Ko je bila tekočina puščena v posodi 24 ur brez mešanja, je temperatura tekočine blizu vrha narasla na približno 20°C. Temperature tekočine v sredini rezervoarja je prav tako nekoliko narasla ($\Delta T \sim 3^\circ\text{C}$), medtem ko je le ta v stožcu rezervoarja ostala približno na osnovni temperaturi 4°C.

Slika 5.8. prikazuje učinek mešanja ob razprševanju zraka na temperaturni profil v cilindrokoničnem zadrževalnem rezervoarju za ječmenovko. Ječmenovka je bila vodena v posodo pri temperaturi 4°C. Meritve so bile izvedene 24 ur po polnjenju rezervoarja. Ogljikov dioksid je bil razpršen v posodo s pretočno hitrostjo $0.113 \text{ cm}^3/\text{uro}$. Sobna temperatura je bila 19.8°C. Mesto merjenja: (1) vrh rezervoarja pri steni; (2) vrh rezervoarja v centru; (3) sredina rezervoarja pri steni; (4) sredina rezervoarja v centru; (5) vrh stožca pri steni; (6) vrh stožca v centru; (7) dno stožca.

S povzročanjem blagega mešanja z vbizgom ogljikovega dioksida pri pretočni hitrosti $0.133 \text{ cm}^3/\text{h}$ je bilo mogoče vzdrževati temperaturo ječmenovke znotraj zadrževalne posode pri 4°C. Posledica teh ugotovitev je bila, da sta bili obe zadrževalni posodi na dnu stožca povezani z 2.54 cm sanitarno cevjo uporabljeno za mešanje ječmenovke.

Neaerirana ječmenovka je bila nadalje prenešana iz obrata Labatt London po 5.08 cm cevi iz nerjavečega jekla v pufran rezervoar. Iz tega rezervoarja je ječmenovka potovala skozi hitri pasterizator v eno izmed zadrževalnih rezervoarjev za ječmenovko (WT1 ali WT2), kjer je bila shranjena pri 2°C za do dveh tednov. Ta pasterizacijska stopnja je potekala kot previdnostni ukrep, ki bi zagotovil, da bi bili neželeni mikroorganizmi odstranjeni iz ječmenovke med celotno zadrževalno periodo. Z uporabo neoksidirane ječmenovke bi bila poškodba vroče ječmenovke s kisikom (tvorba postanih aldehydov) minimizirana. Poleg tega bi lahko zrak, ki je bil doveden ob razpršitvi, dejansko omogočil kontrolo kisika v kontinuirnih fermentorjih.

Meritve raztopljenega kisika so bile izvedene na ječmenovki znotraj zadrževalne posode za ječmenovko. Slika 5.9 prikazuje koncentracijo raztopljenega kisika v ječmenovki v časovnem obdobju po treh prenosnih protokolih. V prvem primeru je bila ječmenovka

prenešena v zadrževalno posodo in razprševanje ogljikovega dioksida se je pričelo ($0.085 \text{ m}^3/\text{h}$), da bi bila tako zagotovljena primerna kontrola temperature. Koncentracija kisika raztopljenega v ječmenovki je nato narasla v prvem dnevu in dosegla približno 1.3 mg/L in bila nato znižana na približno 0.1 mg/l po petih dneh. V drugem poskusu je bila zadrževalna posoda z ječmenovko preprihana za 3 ure z $0.85 \text{ m}^3/\text{h}$ ogljikovega dioksida pred polnjenjem. Začetni navzem kisika se je pomembno znižal in ječmenovka z željeno vsebnostjo kisika ($< 0.1 \text{ mg/l}$) je bila dosežena v dveh dneh.

Na sliki 5.9 je prikazana kontrola raztopljenega kisika v ječmenovki med prenosom iz obrata London. Ocenjeni so bili trije polnitveni protokoli pri čemer je bil tretji preprosto kombinacija prejšnjih dveh metod. Temperatura ječmenovke je bila vzdrževana na 4°C .

V zadnjem poskusu je bil rezervoar vnaprej preprihan kot zgoraj in kontinuiran razpršen ogljikov dioksid ($0.085 \text{ m}^3/\text{h}$) je bil doveden med procesom polnjenja, kot tudi med zadrževalno periodo. Vsebnost ogljikovega dioksida je bila vzdrževana na minimum ($< 0.1 \text{ mg/l}$) med celotno zadrževalno fazo. Posledično je bila ta metoda sprejeta kot protokol za vsa kasnejša zbiranja ječmenovke.

5.1.2. Protokol čiščenja & sterilizacije

Rezervoarji za shranjevanje ječmenovke so bili izpostavljeni čistilnemu ciklusu, ki je obsegal predčiščenje z vročo vodo (85°C), bazično čistilno spiranje (40% baza pri 60°C), kateremu je sledilo naknadno spiranje z vročo vodo (85°C). 'Sanitizacija' teh posod je bila končana z obdelavo sten z raztopino perocetne kisline ($2\% \text{ m/v}$). Cevi za prenos ječmenovke so bile prav tako izpostavljene enakemu čiščenju in postopku 'sanitizacije'.

50-l bioreaktorji so bili izpostavljeni drugačnemu protokolu čiščenja in sterilizacije. Sistemi so bili spirani z vročo vodo (60°C) in nato do vrha napolnjeni s toplo vodo 40°C . Industrijsko čistilno sredstvo, Diversol CX/A (DiverseyLever, Canada) je bilo nato dodano k tej vodi, da bi tako nastala $2\% \text{ m/v}$ raztopina. Zrak je bil razpršen na dnu reaktorja pri hitrosti plina na prazen presek 5mm/s , da bi bilo tako zagotovljeno ustrezno raztapljanje in ustrezno kontaktiranje znotraj reaktorja. Po enournem kontaktnem času, je bil reaktor izprazen in spran s svežo mestno vodo. Čistilni postopek je bil nato ponovljen še enkrat, in končan z dvema končnima cikloma polnjenja in praznjenja z mrzlo mestno vodo.

Posoda za odpadno pivo je bila čiščena z uporabo 2% m/v raztopine Diversol CX/A. V nasprotju z bioreaktorji s plinskim vlekem, razprševanje ni bilo uporabljeno, ker WBT ni bil opremljen z razpršilnikom. Mehansko mešanje je potekalo z valjanjem posode po njeni strani. Ciklus je bil ponovljen dvakrat, sledila pa sta dva cikla polnjenja in praznjenja vode.

Pred sterilizacijo s paro so bili 50-l bioreaktorji povezani s posodo za odpadno pivo, napajalna linija za ječmenovko pa je bila prekinjena kot tudi linija za razpršitev plina. Ventili V10, V11, V12, V13, V14, V15, V16, V17 in V18 so bili odprti in filtri F5, F6 in F7 so bili odstranjeni. Te plinske cevi in filtri so bile obdelane v avtoklavu ločeno za 15 minut pri 121°C. Napajanje pare je bilo povezano z ventili V12 in V16. Parni ventil je bil odprt počasi, da bi bila tako zmanjšana poškodba naprave, temperatura znotraj reaktorja pa je bila natančno spremljana. 1-urna sterilizacija je bila izvedena, ko je bila dosežena interna temperatura 100°C. Ventili V10, V11, V14, V15 in V18 so bili trdno zaprti. Napajanje pare je bilo ustavljeno in steriliziran filter F7 je bil priključen. Sterilizirana filtra F5 in F6 sta bila nemudoma priključena na plinsko napajalno linijo in pognan je bil ogljikov dioksid s hitrostjo na prazen presek 3 mm/s. Ta plinski tok ni zagotavljal samo, da se reaktor ne bi zrušil med ohlajanjem, pač pa je izrinil tudi katerikoli plin prisoten v 50-l bioreaktorjih s plinskim vlekem.

Napajalna linija za ječmenovko je bila priključena na bioreaktor po tem, ko je bila dosežena interna temperatura 20°C. Z ventili V2, V5, V10 in V14 še vedno v zaprti poziciji in z odprtimi ventili V6, V7, V8, V9, V11 in V15, je bil napajalni tok priključen ali na V3 ali V6, odvisno od tega katero napajanje ječmenovke je bilo uporabljeno. Parni cikel je trajal 1 uro po kateri so bili ventili V9, V11 in V15 zaprti simultano z dovodom plina. Ko so cevi dosegle sobno temperaturo (20°C), so bili ventili V3 in V6 zaprti, dovod plina pa je bil prekinjen. Na tej točki je bil celotni kontinuiran fermentacijski sistem, vključno z napajanjem ječmenovke, 50 l bioreaktorji in rezervoarjem za odpadno pivo, steriliziran in pripravljen za fermentacijo.

5.1.3. Fermentacijski protokol

50-l pilotni bioreaktorji z notranjo zanko in plinskim vlekem so bili uporabljeni za kontinuirno primarno fermentacijo pivovarske ječmenovke v pivo. Glikolni termalni plašč je omogočal kontrolo temperature, pri čemer je bila temperatura tekočine med vsemi

fermentacijskimi poskusi 15°C. Vsak reaktor je bil opremljen s temperaturno sondo v merilne namene in temperaturnim termočlenom in glikolnim elektromagnetnim ventilom za uravnavanje polnenja glikola v reaktor. Fermentorji s plinskim vlekem so bili prav tako opremljeni s primarnim mešalnim plinom (ogljikov dioksid ali dušik) kot tudi z oskrbo zraka za doziranje kisika. Željena zmes plina je bila izbrana z nastavljanjem ustrezne kombinacije rotameter/iglični ventil in nato s prehajanjem te plinske mešanice skozi sterilni filter (Millipore, Millex®-FG₅₀, 0.2 µm filtrska enota) in v bioreaktor z notranjo zanko. Zrak s hitrostjo na prazen presek 0.39 mm/s (0.01 sm³h⁻¹) je vbrizgan v reaktor za vse fermentacije, medtem ko je bila pretočna hitrost primarnega mešalnega plina uravnana tako, da ustreza določenemu imobilizacijskemu tipu.

V 50-l bioreaktorju z zračnim vlekem je potekal tradicionalni šaržni 'start-up' pred kontinuirnim načinom obratovanja. Po čiščenju in sterilizaciji, kot je opisana v poglavju 5.1.2, je bil bioreaktor z zračnim vlekem napolnjen s 50 litri ječmenovke iz skladiščnih rezervoarjev za ječmenovko (WT1 ali WT2), nato pa je sledil vbrizg 200 gramov kvasa (4g/l) skozi Scandi-Brew® sterilno vzorčno odprtino. V primeru κ-karagenanskih gelnih kroglic je bilo 20 l kroglic vbrizganih v reaktor tako, da je bila začetna koncentracija LCC3021 srednje kosmičastega kvasa 4 gramov na liter. Tekočina v bioreaktorju je bila vzorčevana dnevno in razvoj diacetila ter specifična teža tekočine je bila skrbno spremljana. Ko je specifična teža dosegla minimalno vrednost in, ko je koncentracija diacetila padla pod 30 µg/l je bilo domnevano, da bi lahko bil sistem naravnan na kontinuirno delovanje.

Fermentacijski medij (ječmenovka) je bil kontinuirno dovajan skozi reaktorsko dno, medtem ko se je 'zeleno' pivo prelivalo skozi cev na vrhu reaktorja. Ko je bil delovni volumen reaktorja določen, je izbira pretočne hitrosti sveže ječmenovke napajane v reaktor določala povprečni zadrževalni čas tekočine. Tekoči vzorci so bili odvzeti iz reaktorja dnevno na izhodu skozi sterilni vzorčni ventil (Scandi-Brew®) za obojne, kemijske in mikrobiološke analize (metode opisane v poglavju 4).

Pri izbranih časovnih intervalih je bil zbran 'kontinuirni' fermentacijski produkt iz 50-l primarnega fermentacijskega bioreaktorja v večjih količinah (40-l sterilne posode iz nerjavečega jekla) in podvržen procesu naknadne fermentacije z namenom, da bi bilo proizvedeno končno, tržno pivo za ocenjevanje in primerjavo z industrijsko-proizvedenim kontrolnim pivom. Izbran 50-l bioreaktor je bil ločen od posode za odpadno pivo in direktno povezan s posodo za zbiranje piva. Ko je bila zbrana željena količina tekočine, je

bil bioreaktor nanovo priključen s posodo za odpadno pivo. Zbrano 'zeleno' pivo je bilo nato izpostavljeno zadrževalni pofermentacijski periodi z namenom, da bi se zmanjšal nivo diacetila v tekočini pod 30 µg/l. Kvas, ki je bil prenešen s tekočino se je lahko tako usedal, tekočina (celična koncentracija ~1-5 milijonov celic/ml) pa je bila shranjena v hladnem za staranje (7 dni pri 2°C). Po periodi staranja je bila tekočina filtrirana, razredčena na 5% volumsko koncentracijo alkohola in karbonizirana pred pakiranjem v 341 ml steklenice piva. Pakirana tekočina je bila nato pasterizirana v napravi obrata Labatt.

5.2. KONTINUIRNI POSTOPEK ZA IZDELAVO GELNE KROGLJICE

Namen tega poglavja eksperimentalnega dela je bilo ovrednotenje kontinuirnega proizvodnega postopka izdelave kroglic za proizvodnjo s kvasom inokuliranih gelnih kroglic, da bi tako preskrbeli imobilizirane LCC3021 kvasne celice v 50-l kontinuiranih bioreaktorjih z notranjo zanko in plinskim vlekom opisanih v poglavju 5.1.

Proizvodni postopek (SL. 8) je najprej sprožil formiranje emulzije med nevodno kontinuirno fazo (rastlinsko olje) in vodno disperzno fazo (κ -karagenanska gelna raztopina pomešana s kvasnimi celicami) z uporabo statičnih mešal. Hitro ohlajanje, ki sproža geliranje polimera, je sledilo tej fazi. Nastale kroglice so bile nato vodene v raztopino kalijevega klorida, kar je pospešilo tako otrjevanje kot tudi separacijo kroglic iz oljne faze. Tvorba κ -karagenanske emulzije gelnih kroglic je potekala v kontrolirani vodni kopeli s temperaturo 37°C, da bi bilo tako preprečeno prezgodnje geliranje karagenanskega gela. Steriliziran polimer je bil vzdrževan na temperaturi 37°C v temperaturno regulirani vodni kopeli in inokulum kvasa je bil vzdrževan pri 20°C pred imobilizacijo. Z uporabo Masterflex peristaltičnih črpalk (Cole Palmer Company, ZDA) sta bila gel in kvasna brozga črpana skozi statični mikser s 24 elementi premera 6.4 mm z namenom enakomernega dispergiranja skozi gel. Sterilizirano olje, shranjeno pri sobni temperaturi, je bilo črpano (Masterflex peristaltična črpalka) v vročo vodno kopel, da bi prav tako doseglo temperaturo 37°C.

Inokuliran polimer (vodna faza) je bil nato mešan z oljem (kontinuirna faza) skozi naslednje serije statičnih mešal, da bi tako nastala željena emulzija. Tako nastala emulzija je bila nato hitro ohlajena na 5°C znotraj kopeli voda/led, ob sproženju geliranja polimernih kapljic v kroglice. Kroglice so nato napredovale v sterilno raztopino 22g/l kalijevega klorida, kar je pomagalo pri njihovem utrjevanju in omogočalo njihovo

ločevanje iz oljne faze. Procesno olje je bilo nato reciklirano nazaj v proces in vodna faza (kroglice in raztopina kalijevega klorida) je bila prenešana v separacijski rezervoar za klasifikacijo po velikosti pred črpanjem v 50-l bioreaktorje.

5.2.1. Statično mešalo – Tip Kenics

V osredju tega novega postopka proizvodnje kroglic so statična mešala Kenics (Cole Parmer Instrument Company, Niles, Illinois, ZDA). Le ta so zgrajena iz serij stacionarnih elementov nameščenih v cevi z notranjim premerom, ki je ekvivalenten premeru statičnega mešala. Ti elementi tvorijo prečne kanale, ki pospešijo ločitev in vzdolžno rekombinacijo tekočine, ki potuje skozi statično mešalo. Prečna prekinitev teh finih tekočinskih tokovnih linij v vedno bolj homogeno emulzijo je bila prav tako povzročena z mešalnim sistemom. Tabela 5.2. navaja tri vrste statičnih mešal, ki so bile uporabljene v tej študiji.

Tabela 5.2. Opis uporabljenih statičnih mešal Kenics (dobavitelj Cole Palmer)

Model	Premer statičnega mešala D (mm)	Število elementov (N_T)
G-04667-04	6.4	12
G-04667-06	9.5	12
G-04667-08	12.7	12

5.2.2 Materiali za proizvodnjo gela

Dva osnovna materiala v proizvodnji gelnih kroglic sta bila olje in polimer. κ -karagenan (tip X-0909, lot 330360, Copenhagen Pectin, Danska), polisaharidni polimer ekstrahiran iz rdečih alg, je velikodušno podarila Copenhagen Pectin A/S. Ta polimer ima edinstveno lastnost termo-geliranja, pri čemer je njegova temperatura geliranja odvisna od koncentracij obeh κ -karagenana ($[Car]$) in kalijevega klorida ($[KCl]$). Polimer je bil raztopljen do koncentracije 30 g/l v destilirani vodi pri 80°C ob vsebnosti 2.0 g/l KCl. Nastala raztopina gela je imela temperaturo geliranja 28°C. Gel je bil za 1 uro postavljen v avtoklav pri 121°C in nato prenešen v 40°C vodno kopel, da se ne bi strdil. Komercialno dosegljivo koruzno olje (Pasquale Bros. Inc., Kanada) je bilo za eno uro sterilizirano pri

121°C in nato shranjeno pri sobni temperaturi (20°C) do njegove uporabe. Kvasna brozga je bila pripravljena kot je opisano v poglavju 4.1.

5.2.3 Meritve premera kroglice

Kroglični vzorci so bili zbrani na izhodu 5°C toplotnega izmenjevalca v stekleničkah, ki so vsebovale 100 ml 22 g/l KCl raztopine. Kroglice so nato v dveh urah posrkale to raztopino, ki je pospešila njihovo utrjevanje. Olje je bilo odstranjeno iz vodne faze z zaporednim spiranjem z raztopino kalijevega klorida. Vzorci so bili nato shranjeni pri 4°C, da bi bila tako preprečena mikrobiološka kontaminacija pred analizo.

Meritve premera kroglic so bile izvedene z uporabo software-a s slikovno analizo Optimas (verzija 4.02, BioScan, Inc., ZDA) povezanega z video kamero (Pentax Macro 50mm). Kroglični vzorec je bil nato prenešen v petrijevko, ki je vsebovala tanek film vode (uporabljen za ločitev kroglic) in nato postavljen pod kamero. Skupaj 300 do 400 kroglic je bilo merjenih z uporabo tega sistema. Merilne sposobnosti software-a Optimas so bile med 100µm in nekaj mm z maksimalno absolutno napako 30µm. Podatki doljeni z Optimas-om so bili nadalje analizirani z uporabo Microsoft Excel-a. Nastale porazdelitvene velikosti vzorca so bile podane s srednjim premerom vzorca (D_B) in koeficientom variacije (COV).

5.2.4 Sistem krogličnega ocenjevanja – eksperimentalni plan

Skupno so bili primerjani 3 premeri statičnega mešala ($D_S = 6.4$ mm, 9.5 mm in 12.7 mm), da bi lahko ocenili, kateri tip kroglične populacije bi lahko bil proizveden, izmerjen s povprečnim krogličnim premerom vzorca in koeficientom variacije porazdelitve velikosti. Število elementov statičnega mešala (N_s) se je spreminjalo med 12 in 120 elementov, medtem ko je bil delež volumna polimera (ϵ_c) študiran med 8.3 v/v in 50% v/v gela v oljni raztopini. Nad ϵ_c 50% sta postali dispergirana (gel) in kontinuirna (olje) faza obrnjeni, to pomeni, da so namesto gelnih kapljic znotraj oljnega matriksa nastale oljne kapljice v polimernem matriksu. Hitrost emulzije olje/gel na prazen presek skozi emulzijsko področje je bila uravnana na območje od 3.6 cm/s do 17.8 cm/s. Hitrost tekočine skozi prazen presek (V_{SL}) skozi emulzijsko statično mešalo je bila izračunana po naslednji enačbi:

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

kjer je S površina prečnega preseka cevi, ki vsebuje statično mešalo, Q_{oil} je volumska pretočna hitrost oljne faze in Q_{car} je volumska pretočna hitrost gelne raztopine karagenana.

REZULTATI IN DISKUSIJA: FERMENTACIJE & MEŠALNA DINAMIKA ZNOTRAJ 50-L BIOREAKTORJEV S PLINSKIM VLEKOM

Uporaba imobiliziranih celic za proizvodnjo etanola je že bila publicirana. V zadnjih dveh desetletjih, so si raziskovalci prizadevali optimirati proizvodnji postopek za pridobivanje etanola imobilizirane celične tehnologije s kontinuirnim procesiranjem (Kuu, 1982; Gil, 1991; Maiorella, 1983). Številni so srečali z velikim uspehom in uporaba kontinuirnih imobiliziranih celičnih sistemov za proizvodnjo etanola je postala industrijska. Kakorkoli, uporaba takšnega kontinuirnega procesa v pivovarni industriji za primarno fermentacijo piva ni tako enostavna. Pivo ne vsebuje samo etanola temveč tudi mešanico spojin z aromo, ki dajo končnemu produktu oboje, kompleksnost in globino. Naslednje poglavje opisuje rezultate, ki jih je dobil avtor pri iskanju proizvodnje dobro 'uravnoveženega' piva znotraj pilotnega GLDT fermentorja.

6.1 ŠARŽNE FERMENTACIJE V PILOTNEM GLDT SISTEMU

Šaržne fermentacije, ki uporabljajo prosto suspendirane kvasne celice, so potekale v 50-l pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Ti poskusi so omogočili ocenjevanje možnosti uporabe takšnega sistema za fermentacijo ječmenovke v pivo. Nadalje, poskusi so služili k temu, da bi dobili osnovo za kasnejšo primerjavo s kontinuirnimi fermentacijskimi tekočinami. Dve šaržni fermentaciji sta potekali v 50-l bioreaktorju z uporabo lagerskega kvasa iz Labatt Culture Collection (LCC3021). Med fermentacijami je bila spremljana hitrost rasti kvasa, kot tudi poraba hranilnih snovi in sproščanje produktov.

Sliki 6.1 in 6.2 predstavljata profile za koncentracijo kvasa in stopnjo preživetja za šaržni fermentaciji 1 oz. 2. V obeh primerih je bila rast kvasa v skladu s klasičnimi hitrostmi podanimi v literaturi. Stopnje preživetja izmerjene z metilensko modrim so ostale vseskozi visoke, z vrednostmi, ki so se gibale blizu 90%. Ogljikovohidratni koncentracijski profili za šarži 1 in 2 so prikazani na slikah 6.3 in 6.4. Kvas je najprej 'porabil' preproste

sladkorje, glukozo in fruktozo, temu pa je sledila 'poraba' maltoze in maltotrioze. Vsebnosti maltotetroze kot tudi večjih polisaharidov so ostale nespremenjene skozi fermentacijo. Etanol je eden izmed najbolj pomembnih stranskih produktov v presnovi kvasa. Med optimirano anaerobno fermentacijo bo nastalo okoli 48 g etanola in 47 g ogljikovega dioksida na 100 g metabolizirane glukoze. Prav tako bodo proizvedene majhne količine glicerola (3.3.g na 100 g glukoze), ker je ta stranski produkt vključen v vzdrževanje redoks ravnotežja v fermentabilnem kvasu in služi tudi kot celična opora v osmotskem ravnotežju, še posebno v hipertonskem mediju. Sliki 6.5 in 6.6 kažeta koncentracijsko časovno odvisnost etanola in glicerola med potekom fermentacije. Vsebnost etanola narašča zelo počasi na začetku fermentacije zaradi prisotnosti kisika v fermentacijskem mediju, ko so celice kvasa v njihovi aerobni fazi rasti. Ko se kisik porabi, vsebnost etanola raste eksponentno, dokler niso porabljeni vsi sladkorji, to pomeni, ko je dosežen koncentracijski nivo 0. Diketoni so prav tako zelo pomembni stranski produkti kvasnega metabolizma. Celotne koncentracije diacetila in pentandiona za šarži 1 in 2 so prikazane na slikah 6.7 in 6.8. Te spojine so naraščale tekom 40 ur fermentacije, ko so doseženi nivoji pika koncentracije kvasa in so rezultat sintez aminokislin, povzročenih s kvasom med njihovo fazo rasti. Med zadnjo fazo fermentacije, so diacetil, pentandion in njuna prekurzorja α -acetolaktat in α -ketobutirat s kvasom pretvorjeni v njim ustrezne manj aromatizirano aktivne diole. Iz rezultatov predstavljenih v tem poglavju je razvidno, da sta v bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom normalno potekali dve šaržni fermentaciji. Rast kvasa in poraba ogljikovih hidratov sta potekala po pričakovanih poteh, kot tudi stranski produkti, etanol, diacetil in pentandion. Primerjava individualnih šaržnih podatkov kaže, da sta dve šarži fermentirali na zelo podoben način. Slika 6.9 primerja koncentracije etanola iz šarž 1 in 2. Posamezne krivulje sledijo enakemu profilu s številnimi točkami, ki pokrivajo ena drugo, kar nakazuje stopnjo ponovljivosti. Navljub temu, da se zaporedje porabe substratov in kasnejši donos produktov ni spremenil v sistemu s plinskim vlekom, se je spremenila hitrost fermentacije. Zaključek primarne fermentacije predstavljen s koncentracijskim pikom etanola je bil v obeh šaržah dosežen pri približno 80-85 urah. Redukcija diacetila pod 30 $\mu\text{g/l}$ je bila dosežena v naslednjih 20 urah. Ti rezultati so namigovali na to, da bi lahko bila primarna fermentacija ječmenovke z visoko težo končana v približno 100 urah v primerjavi s 120-168 urami v primeru tradicionalne šaržne lagerske fermentacije. K temu zmanjšanju fermentacijskega časa je prispevalo mešanje povzročeno v bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom zaradi

povečanega prenosa snovi, ki je bil dosežen v teh sistemih. S to informacijo so bili nadaljnji poskusi fermentacije izvedeni z gotovostjo, da bioreaktor z notranjo zanko in plinskim vlekrom ni pomembno vplival na oz. spremenil fermentacijsko presnovo kvasa in, da bi fermentiranje s popolnoma suspendiranim kvasom v tem sistemu lahko zmanjšalo šazni fermentacijski čas za najmanj 20 ur.

Opis slik:

Slika 6.1 Celotna celična koncentracija in stopnja preživetja v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.2 Celotno celična koncentracija in stopnja preživetja v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.3 Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.4 Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.5 Koncentraciji etanola in glicerola v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.6 Koncentraciji etanola in glicerola v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.7 Koncentraciji diacetila in pentandiona v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 1 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Slika 6.8 Koncentraciji diacetila in pentandiona v odvisnosti od časa fermentacije za šaržno fermentacijo 2 s kvasom LCC3021 v pilotnem GLDT bioreaktorju.

Na sliki 6.9 je primerjava koncentracij etanola šarže 1 in šarže 2 v odvisnosti od časa fermentacije. Kvas LCC3021 je bil uporabljen v pilotnem GLDT bioreaktorju.

6.2 IMOBILIZACIJSKI NOSILCI

Med tem projektom so bili proučevani številni nosilci, da bi tako identificirali najbolj obetavne alternative za razvojno delo v prihodnosti. Trije različni načini imobilizacije so bili testirani v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Testirana sta bila dva komercialno dosegljiva adsorpcijska nosilca z velikostmi med 1 in 2 mm. Siran[®], stekleni kroglični nosilec, ki ga je dobavil Schott Engineering (SL. 9) in Celite[®], kroglica iz diatomejske zemlje proizvajalca World Minerals (SL. 10), sta bila testirana zaradi

predpostavljene enostavnosti rokovanja in njune komercialne dosegljivosti. Na adsorpciji temelječi nosilci dajejo možnost za bolj aseptično operacijo, ker je lahko reaktor najprej napolnjen z nosilcem, sledi sterilizacija na mestu in končno inokulacija kvasa direktno v reaktor. Iz industrijskega vidika je ta možnost zelo atraktivna, ker nosilec naj ne bi zahteval posebnega shranjevanja in obrat naj ne bi pomembno spreminjal njegove inokulacijske prakse.

Začetni rezultati fermentacije za oba nosilca v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom niso bili zadovoljivi. Problemi, ki so se pojavili, so bili predvsem zaradi visoke gostote delcev Siran-a[®] in Celite-a[®] v primerjavi s tekočim medijem. Tri fazni sistemi z notranjo zanko in plinskim vlekom delujejo najbolje, ko je razmerje med gostoto nosilca in tekočine bližje enoti. V primeru Siran-a[®] je bilo razmerje 1.34, medtem ko je bilo razmerje za Celite[®] 1.31. Posledica tako visoke razlike v gostoti med trdno in tekočo fazo je bila pomembno povišanje minimuma hitrosti plina za fluidizacijo potrebnega za operiranje 50-l bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom. Za 4 litre nosilca Siran-a[®] (8% v/v trdne snovi) je bila zahtevana plinska hitrost 21.5 mm/s (na osnovi premera notranje zanke), da bi bilo tako doseženo obkroženje (cirkulacija). Višja hitrost plina ni bil pomemben problem, ko je bilo testiranje izvedeno v vodni raztopini, kakor hitro pa je bil tekoč medij ječmenovka, se je v sistemu z notranjo zanko in plinskim vlekom (GLDT) zgodila 'katastrofalna' napaka. Zahtevana plinska hitrost je povzročila prekomerno penjenje znotraj reaktorja, kar je končno znižalo nivo tekočine pod notranjo zanko in ustavilo cirkulacijo tekočine in trdne snovi. Napaka podobna tej, ki smo jo srečali pri Siran[®]-u, se je pojavila, ko je bil Celite[®] zamenjan kot imobilizacijski material. Zaradi teh rezultatov sta bila oba nosilca na osnovi adsorpcije opuščena v nadaljnjih poskusih fermentacije s plinskim vlekom.

Uporaba nosilca na osnovi omreženja, kot je α -karagenan, je dovoljevala polnjenje sistema na 40% (v/v) osnovi s trdnjo snovjo in zahtevala okoli 0.17 standardnih kubičnih metrov na uro plina (5.8 mm/s hitrost plina na prazen presek) za njegovo fluidizacijo in kasnejšo cirkulacijo. Pozitivni rezultati, ki smo jim bili priča z operiranjem sistema z na karagenan ujetimi kroglicami kvasnih celic, so bili posledica nižje gostote nosilcev (približno 1100 kg/m³) in kasnejše enostavnosti fluidizacije. Podobno, željeno polnjenje trdnih snovi s samoagregirnim kvasom LCC3021 (srednje kosmičast) in LCC290 (super kosmičast), je bilo doseženo s hitrostmi plina za fluidizacijo približno 3 mm/s potrebnimi za zagotovitev

primerne cirkulacije. Poglavje 6.2.1 bolj podrobno opisuje κ -karagenanski gelni nosilec in poglavje 6.2.2 opisuje samoagregacijski kvas – LCC3021 kosmiče in LCC290 kosmiče α , ki so bili ocenjeni kot imobilizacijski matriksi za kontinuirno primarno fermentacijo znotraj 50-l GLDT fermentorja.

6.2.1 α -karagenanske gelne kroglice

Imobilizacijske metode na osnovi omreženja zahtevajo vključevanje celic kvasa v matriks pred njegovim uvajanjem v fermentacijsko posodo. Ker in-situ reaktorska inokulacija ni mogoča pri tem času, je potrebno proizvesti te gelne kroglice pred pričetkom fermentacije. Še vedno ni jasno, kakšen učinek ima dolgotrajno shranjevanje na inokulirane gelne kroglice. Z namenom minimiranja kakršnihkoli negativnih učinkov shranjevanja, je bilo odločeno proizvesti velike količine gelnih kroglic znotraj kratkega časovnega obdobja (8 ur). Postopek s statičnim mešanjem kroglic, ki je bil opisan v poglavju 5.2, je bil zato uporabljen v ta namen. Idealne kroglice bi imele delce premera (D_B) med 0.8 mm in 1.4 mm z minimalnim koeficientom variacije (COV) distribucije velikosti. Potrebno je bilo nastaviti številne parametre procesa za izdelavo kroglic, da bi tako proizvedli željeno količino in konsistenco kroglic. Naslednje poglavje predstavlja povzetek izbire krogličnih procesnih parametrov in poglavje 6.2.1.2 opisuje kroglice uporabljene v kontinuirnih fermentacijskih postopkih.

6.2.1.1 Proces izdelave kroglic: Izbira spremenljivk

Karakteriziranje procesa za izdelavo kroglic je potekalo v sodelovanju z drugimi raziskovalci s poudarkom na naslednjih procesnih parametrih □ premer statičnega mešala (D_s), število elementov statičnega mešala (N_s), pretočna hitrost tekočine na prazen presek (V_{SL}) in polimerni volumski delež (ϵ_c). Slike 6.12 do 6.21 povzemajo rezultate dobljene med eksperimenti.

Slika 6.12 prikazuje značilno velikostno porazdelitev dobljeno z uporabo statičnega mešalnega procesa za imobilizacijo kvasa v karagenanski gel. V tem primeru so bili uporabljeni naslednji parametri: premer statičnega mešala 12.7 mm, 60 statičnih mešalnih elementov, hitrost tekočine na prazen presek 10.5 cm/s, in polimerni volumski delež 0.25. Srednji kroglični premer je bil izmerjen pri 701 μm s koeficientom variacije 45%. Skupna porazdelitev velikosti predstavljena na sliki 6.13 se je ujemala z normalno kumulativno

porazdelitvijo izračunano s srednjo vrednostjo vzorca in standardno deviacijo. Metoda Kolmogorof Smirnova (Scheaffer in McClave, 1990) je bila uporabljena za testiranje normalnosti. Maksimalna razdalja med eksperimentalnimi podatki in krivulji prilagojenimi podatki (K-S statični D) je bila izračunana na 0.0274. Modificirana D vrednost, ki ustreza podatkom, ki sledijo normalni distribuciji, mora ležati pod 0.895 pri 95% intervalu zaupanja. V našem primeru je bila modificirana D vrednost izračunana na 0.174, precej pod limito 0.895, in zaključimo lahko, da se naši podatki ujemajo z normalno porazdelitvijo. Vsi podatki zbrani med procesom izdelave kroglic so kazali porazdelitve distribucije s samo enim vrhom. Poncelet s sodelavci (1992) je pokazal pojav satelitskih vrhov in/ali sekundarni vrh, ki ustreza kroglicam s premeri manjšimi kot 200 μm za alginatne kroglice proizvedene z razpršitvijo v mešalnem rezervoarju. Mogoče je, da so bile manjše kroglice proizvedene v našem procesu zelo preprosto izgubljene med pralnim procesom in se zato niso pojavile v naših podatkih o porazdelitvi velikosti.

Učinki hitrosti tekočine na prazen presek in premera statičnega mešala na srednji premer kroglice in na koeficient variacije porazdelitve velikosti je prikazan na slikah 6.14 oz. 6.15. Povprečni premer kroglice se zmanjša z naraščanjem hitrosti tekočine na prazen presek za vse tri premere statičnega mešala z bolj izrazitim učinkom na 12.7 mm statičnem mešalu. Kroglice s povprečnim premerom večjim od 700 μm niso bile proizvedene z manjšim premerom statičnih mešal (6.4 mm in 9.5 mm) pri vseh testiranih hitrostih tekočine, medtem ko je statično mešalo s premerom 12.7 mm proizvedlo kroglice večje od 700 μm pri hitrostih tekočine pod 11 cm/s. Vsi trije premeri statičnih mešal so proizvedli kroglice s koeficientom variacije med 38% in 58%. Prav tako se je pokazalo, da se je s povišano hitrostjo zmanjšal koeficient variacije v vseh treh primerih. Koeficient variacije se je spreminjal s premerom statičnega mešala, z najnižjo vrednostjo proizvedeno pri najnižjem premeru statičnega mešala.

Pri hitrosti na prazen presek 3.5 cm/s je polimerni volumski delež vplival na povprečni premer kroglice, medtem ko hitrosti nad 7 cm/s relativno niso povzročile razlik v eksperimentalnih vrednostih ϵ_c varirajočih med 0.083 in 0.5 (slika 6.16). Tukaj se je pokazal majhen ali sploh ne učinek na koeficient variacije polimernega volumskega deleža z naraščajočo hitrostjo tekočine na prazen presek (slika 6.17).

Sliki 6.18 in 6.19 prikazujeta učinke hitrosti tekočine na prazen presek in števila elementov statičnega mešala na srednji premer kroglice. S povišanjem hitrosti tekočine se je povprečni kroglični premer zmanjšal za vse variacije števila elementov statičnega mešala

(slika 6.18). Povprečni premer kroglice pri dani hitrosti tekočine je bil podoben za 24 do 120 elementov, medtem ko je konfiguracija 12 elementov proizvedla premere kroglic večje kot pet drugih testiranih konfiguracij. Slika 6.19 prav tako nakazuje, da povprečni premer kroglice doseže minimum nad 24 elementi statičnega mešala.

Slika 6.20 kaže učinek hitrosti tekočine na prazen presek na koeficient variacije za različna števila elementov statičnega mešala. Pokazalo se je, da hitrost tekočine ni vplivala na koeficient variabilnosti za vse testirane konfiguracije. Učinek števila elementov statičnega mešala na koeficient variabilnosti je bil bolj očiten (slika 6.21). Koeficient variacije se je zmanjšal z naraščanjem števila elementov statičnega mešala in dosegel minimum 45% pri 60 elementih in več. Ti rezultati so bili konsistentni za hitrosti tekočine med 3.6 cm/s in 17.8 cm/s.

Postavljena je bila hipoteza, da bi povečanje premera statičnega mešala (D_s) povzročilo heterogenost strižnih sil znotraj mešala, in pri tem vplivalo na povečanje velikostne porazdelitve kot je bila izmerjena s koeficientom variacije.

Hkrati bi povečanje D_s zmanjšalo intenziteto strižnih sil in tako povečalo srednji premer kroglice. Oba ta učinka sta bila opažena v eksperimentiranju s statičnim mešalom z najmanjšim premerom, ki daje kroglice z najmanjšim povprečnim premerom (400 μ m-500 μ m) in najmanjšim koeficientom variacije (približno 40%) ali porazdelitvijo velikosti.

Energija, ki je bila potrebna za nastanek emulzije, je sorazmerna medfazni površini nastali med polimerom in oljno fazo. Manjša velikost kroglice, večja energija je bila potrebna za tvorbo. Berkman in Calabrese (1988) sta pokazala, da povečanje povprečne hitrosti tekočine na prazen presek (V_s) vzpodbudi večjo razpršitev energije na enoto mase fluida, in tako vodi v zmanjšanju velikosti kroglice. Povečanje povprečne hitrosti tekočine na prazen presek (testirane med 3.6 cm/s in 17.8 cm/s) je povzročilo zmanjšanje povprečne velikosti kroglice. Takšna hitrost poveča rezultate diferencialnega tlaka med vstopom in izstopom iz statičnega mešala. Ta tlačni diferencial je sorazmeren razpršeni energiji na enoto mase fluida. Povišanje hitrosti tako povzroči povišanje razpršene energije v sistemu, ki vodi do zmanjšanja velikosti kroglic. Zmanjševanje premera kroglice, D_B , je bilo opaženo, ko so se hitrosti tekočine na prazen presek povišale. Al Taweel in Walker (1983) sta pokazala, da je vzpostavljeno dinamično ravnotežje med oblikovanjem kroglic in koalescenco med kroglicami pri visokih hitrostih, ki ustrezajo pomembnim stopnjam turbulence. Za konstantni premer statičnega mešala (D_s) in število elementov (N'_s) je imela hitrost tekočine zelo majhen učinek na koeficient variacije. Hitrost je tako parameter, ki

dovoljuje manipulacijo in izbiro povprečnega premera kroglice brez pomembne spremembe v porazdelitvi (disperziji) velikosti.

V okviru te raziskave, je imel gelni volumnski delež karagenana (ε_c) majhen vpliv na bodisi povprečni premer kroglice ali na koeficient variacije, razen za najnižje študirane hitrosti 3.6 cm/s kjer se je povprečni premer kroglice zmanjšal z zmanjševanjem ε_c . Audet in Lacroix (1989) sta proučevala ta parameter za proizvodnjo karagenanskih kroglic v dvofaznem disperznem sistemu (šaržni mešalni reaktor, ne kontinuirni proces statičnega mešanja) in zaključila, da ε_c ni imel učinka na srednji kroglični premer za polimerno raztopino s karagenansko koncentracijo 3% (m/v). Specifični učinek α -karagenanske gelne koncentracije na porazdelitev kroglične velikosti sta proučevala Audet in Lacroix (1989), ki sta pokazala, da je ta parameter močno vplival na distribucijo velikosti. Naraščajoče gelne koncentracije so povzročile povečanje povprečnega premera kroglice (D_B) in koeficienta variacije (COV). Zaznan učinek je bil pripisan povečani viskoznosti gela pri višjih koncentracijah, ki so posledica nižjih strižnih sil v emulziji in tako večjih kroglic. Čeprav učinek koncentracije gela na velikost kroglice ni bil proučevan v tej nalogi, bi lahko bil uporabljen kot nadalnje merilo za kontroliranje velikosti kroglice, če bi to bilo potrebno.

Povečanje števila mešalnih elementov (N_s) povečuje povprečni zadrževalni čas, ki ga fluidni element porabi znotraj statičnega mešala, kar vodi v bolj homogeno zmes in tako v oblikovanje manjših in bolj tesno dispergiranih kroglic. V eksperimentiranju je bilo ravnovesje v disperziji (izmerjeno s koeficientom variacije) doseženo pri okoli 60 do 72 elementih. Middleman (1974) je pokazal, da je bilo 10 elementov dovolj za dosego takšnega ravnovesja v primeru emulzij z nizko viskoznostjo (0.6 do 1.0 cP). Karagenanska raztopina uporabljena v teh eksperimentih [(3% m/v)] je imela povprečno viskoznost 200 cP in oljna viskoznost je bila 25 cP. Posledično je ta višja viskoznost zahtevala daljše zadrževalne čase znotraj mešala, da bi tako dosegli psevdo homogenost.

Opis slik:

Slika 6.12. Značilna velikostna porazdelitev kroglic nastalih z uporabo statičnega mešalnega procesa. Procesni parametri v tem primeru so bili: $D_S = 12.7$ mm, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10.5$ cm/s in $\varepsilon_c = 0.25$.

Slika 6.13. Značilna kumulativna velikostna porazdelitev kroglic nastalih z uporabo statičnega mešalnega procesa. Procesni parametri v tem primeru so bili: $D_S = 12.7$ mm, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10.5$ cm/s in $\varepsilon_c = 0.25$.

Slika 6.14. Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. povprečni kroglični premer (μm). Obravnavani so bili trije različni premeri statičnega mešala ($D_s = 12.7$ mm, 9.5 mm in 6.4 mm). Število elementov statičnega mešala (N_s) je ostalo konstantno 48 in polimerni delež ϵ_c je bil naravnan na 0.25.

Slika 6.15 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. koeficient variacije premera kroglice (%). Obravnavani so bili trije različni premeri statičnega mešala ($D_s = 12.7$ mm, 9.5 mm in 6.4 mm). Število elementov statičnega mešala (N_s) je ostalo konstantno 48 in polimerni delež ϵ_c je bil naravnan na 0.25.

Slika 6.16 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. povprečni kroglični premer (μm). Obravnavani so bili štirje polimerni deleži ($\epsilon_c = 0.5, 0.25, 0.125$ in 0.083). Število elementov statičnega mešala (N_s) je ostalo konstantno 48 in premer statičnega mešala (D_s) je bil uravnan na 12.7 mm.

Slika 6.17 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. koeficient variacije krogličnega premera (%). Obravnavani so bili štirje polimerni deleži ($\epsilon_c = 0.5, 0.25, 0.125$ in 0.083). Število elementov statičnega mešala (N_s) je ostalo konstantno 48 in premer statičnega mešala (D_s) je bil uravnan na 12.7 mm.

Slika 6.18 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. povprečni kroglični premer (μm). Število elementov statičnega mešala (N_s) se je spreminjalo do 12, 24, 48, 60, 72 in 120. Polimerni delež ϵ_c je bil konstantno 0.25, premer statičnega mešala (D_s) pa je bil uravnan na 12.7 mm.

Slika 6.19 Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) vs. koeficient variacije krogličnega premera (μm). Število elementov statičnega mešala (N_s) se je spreminjalo do 12, 24, 48, 60, 72 in 120. Polimerni delež (ϵ_c) je bil konstantno 0.25, premer statičnega mešala (D_s) je bil uravnan na 12.7 mm.

Slika 6.20 Povprečni kroglični premer (μm) vs. število elementov statičnega mešala (N_s). Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) se je spreminjala do 3.6, 7.0, 10.6, 13.2 in 17.8. Polimerni delež (ϵ_c) je bil konstantno 0.25 in premer statičnega mešala (D_s) je bil uravnan na 12.7 mm.

Slika 6.21 Koeficient variacije krogličnega premera (%) vs. število elementov statičnega mešala (N_s). Hitrost tekočine na prazen presek (cm/s) se je spreminjala med 3.6 in 17.8. Polimerni delež (ϵ_c) je bil konstantno 0.25 in premer statičnega mešala (D_s) je bil uravnan na 12.7 mm.

6.2.1.2 Proces izdelave kroglic: Značilnosti α -karagenanskih kroglic

Iz podatkov opisanih v prejšnjem poglavju je bilo mogoče izbrati parametre procesa za izdelavo kroglic z željenimi značilnostmi za fermentacijske poskuse. Da bi minimizirali koeficient variacije za določen premer statičnega mešala je bilo izbranih 60 mešalnih elementov za kreiranje disperzije olje - gel. Kroglice s povprečnim premerom približno 1 mm so bile izbrane, da bi bil tako minimiziran eksterni snovni prenos in olajšana separacija iz fermentirajoče tekočine na mehanski način. Da bi to dosegli, sta bila izbrana največje testirano statično mešalo (12.7 mm) in najnižja testirana hitrost (3.6 cm/s). Ker je imel polimerni delež manjši učinek na koeficient variacije, je bilo uporabljeno razmerje med oljem in gelom 50/50 ($\epsilon_c=0.5$), da bi tako dosegli maksimalno kroglično produktivnost.

Številne šarže gelnih kroglic z omreženim kvasom LCC3021 so bile proizvedene v laboratoriju z uporabo procesa opisanega v poglavju 5.2 z $D_s = 12.7$ mm, $N_s = 60$, $V_{SL} = 3.9$ cm/s in $\epsilon_c = 0.5$. Nastale kroglice (SL. 11) so prehajale skozi številna sita, da bi bile tako odstranjene kroglice večje kot 2.0 mm in tiste manjše od 0.5 mm. Nastala distribucija velikosti delcev je predstavljena na sliki 6.23. Slika 6.24 prikazuje kumulativno distribucijo velikosti teh kroglic. To je bila značilna distribucija uporabljena v 50-l fermentacijskih poskusih s plinskim vlekom.

Opis slik:

Slika 6.23. Porazdelitev kroglične velikosti κ -karagenanskih gelnih kroglic uporabljenih v kontinuirnih fermentacijskih poskusih v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.

Slika 6.24. Kumulativna porazdelitev kroglične velikosti κ -karagenanskih gelnih kroglic uporabljenih v kontinuirnih fermentacijskih poskusih v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.

6.2.1.3. Omejitve krogličnega procesa glede na industrijsko uporabo

Proces proizvodnje 10 l kroglic na uro, na statično mešalo, je bil razvit in uveden na nivoju pilotne naprave. Številni vidiki tega procesa zahtevajo nadaljnji razvoj in/ali optimizacijo pred kroglično proizvodnjo na industrijskem nivoju. Povečanje volumske produktivnosti sistema je nujno potrebno, da bi zagotovili volumen imobiliziranih celic

zahtevan za polnjenje večjega bioreaktorja. Na primer, 2000-hl bioreaktor z notranjo zanko in plinskim vlekrom bi zahteval približno 800 hl kroglic. Da bi dosegli takšne volumne, je potrebno povišanje obeh pretokov gela in olja. Podatki nakazujejo, da bi rezultirajoča povišana hitrost z uporabo statičnih mešal premerov 6.4 mm do 12.7 mm povzročila tvorbo kroglic, ki bi bile premajhne, da bi jih lahko uporabljali v fermentacijskem sistemu. Tako bi bilo potrebno povečati premer statičnih mešal in tako povečati povprečni kroglični premer. Kakorkoli, uporaba statičnih mešal z večjim premerom bo prav tako povečala disperzijo kroglične velikosti, s proizvodnjo večjega procenta kroglic zunaj željenega območja.

Druga alternativa bi bila izvedba sistema z uporabo statičnih mešal srednje velikosti (12.7 mm) nameščenih vzporedno. S sistemom 10 statičnih mešal so verjetno mogoče produktivnosti, ki dosegajo 100 l/h. Na 2000-hl industrijskem vzorcu, bi proces potekal kontinuirno 800 ur ali približno 34 dni za proizvodnjo željenega volumna kroglic. Številni sistemi bi lahko bili uporabljeni za znižanje produkcijskega časa, vendar bi to pomenilo še dodatni nivo kompleksnosti. Produkcijski čas bi lahko postal manj pomemben, če bi bilo mogoče shraniti kroglice za daljše časovne periode in pri tem ohraniti kvas pri življenju. Mogoče je, da bi lahko bil razvit proces za sušenje kroglic ali shranjevanje kroglic v vakuumsko zaprtem kontejnerju.

Poncelet in sodelavci (1993) so objavili delo, ki kaže, da mora biti upoštevana vrsta statičnega mešala za izdelavo disperzije. Z njihovim predpostavljenim sistemom ob uporabi drugega tipa statičnega mešala v nasprotju s Kenics tipom uporabljenim v tej raziskavi, bi bilo mogoče uporabljati mešalo z večjim premerom, ne da bi pri tem ogrozili velikostno distribucijo kroglic (z ohranjanjem nizkega koeficienta variacije).

Nadaljnja zanimanja v zvezi z obstoječim pilotnim procesom vključujejo obratovanje sistema pri 40°C in uporabo rastlinskega olja in raztopin kalijevega klorida za kroglično proizvodnjo. Zaradi visokih produkcijskih temperatur sta v procesu potrebna oba, grelni in hladilni sistem. Potencialni termični šok, kateremu so izpostavljene kvasne celice, terja dodatno preiskavo, tako da je lahko napravljena ocena potencialnih negativnih posledic. V tej študiji so bile proizvedene imobilizirane celične kroglice z visoko stopnjo preživelosti kvasovk (nad 90%), pri čemer katerikoli drugi učinki, ki jih proces lahko povzroči na populaciji kvasovk, niso bili proučevani. Ker je olje uporabljeno za proizvodnjo željene emulzije in posledično tvorbo kroglic in ker bo olje delovalo kot površinsko aktivno sredstvo za preprečevanje nastajanja pene, je preostanek olja na površini kroglice

pomembno vprašanje. Čeprav bi ta preostanek lahko pomagal med fermentacijsko fazo, bi bil kakršenkoli prenos v končno pivo uničujoč glede na to, da je pena v končnem produktu željena. Veliki volumni raztopine kalijevega klorida so bili uporabljeni za ločevanje trdne faze (krogljic) od olja, in metoda za odstranjevanje te slane raztopine iz krogljične brozge pred uvajanjem krogljic v bioreaktor zahteva posebno pozornost. Drugače bi bilo nujno potrebno sprati to raztopino iz reaktorja in nato dodajati krogljice v reaktor.

Ker so imobilizirane celične krogljice proizvedene zunaj bioreaktorja, morajo biti med procesom tvorbe krogljic uporabljene aseptične tehnike in sterilnost mora biti ohranjena dokler niso krogljice uvedene v bioreaktor. Številne prenosne točke med rezervoarji predstavljajo priložnost za kontaminacijo in morajo biti nadzirane zaradi dejstva, da lahko prisotnost kontaminanta vodi do njegove ko-imobilizacije v krogljico. S prizadevnostjo v laboratoriju je mogoče neprestano proizvajati aseptične krogljice. Kakorkoli, okolje znotraj obrata morda ni prijazno kot laboratorij, zato je zahtevana bolj natančna kontrola.

6.2.2 Kosmičaste celice kvasa

Ena izmed najbolj naravnih oblik imobilizacije je samoagregacija mikroorganizmov v flokule celic. Calleja in Johnson (1977) sta predlagala tri možne vzroke, da celice kontaktirajo med sabo in oblikujejo agregate, z vsemi lastnostmi vezanja. Prvi vključuje celice različnih spolov, ki se privlačujejo s sproščanjem feromonov ($\square$ in α -faktorji). Ta tip vezanja je začasen in vključuje protein-protein vezanje med $\square$ in α -aglutinini pripetimi na komplementarne celične stene. Celice lahko prav tako agregirajo, ko se po napaki ločijo od materinske celice med procesom cepljenja. Ta napaka je lahko povezana oz. prirojena vrsti kvasa ali pa je lahko povzročena s pomanjkanjem hraniva ali mutacijo številnih genov. Ta fenomen vodi do tvorbe verige in ne do kosmičenja. Vezi med temi celicami so lahko ireverzibilno poškodovane oz. uničene z mehanskim striženjem (Stratford, 1996).

Tretji scenarij je bolj pogosto znan kot izkosmičenje oz. flokulacija. Stewart in Rusell (1981) sta definirala flokulacijo kot reverzibilni 'fenomen kjer se celice kvasa vežejo v kepe ali celo sedimentirajo hitro iz medija v katerem so suspendirane ali se dvignejo na površino medija'. Številni dokazi kažejo, da je flokulacija genetsko kontrolirana in da mehanizem flokulacije temelji na izbranih molekulah, ki se obnašajo kot mostovi med sosednjimi celičnimi zidovi. Bolj natančno, mišljeno je, da so določeni lektini vezani na α -

mannan-e sosednjih celic v prisotnosti Ca^{2+} ionov (Calleja in Johnson, 1977). Za to vezanje protein/ogljikov hidrat je bilo ugotovljeno, da je reverzibilno preprečeno s kelatnimi sredstvi ali določenimi sladkorji. SL. 12 prikazuje tri mogoče konfiguracije kvasnih celic, in sicer nekosmičast kvas, kvas, ki tvori verigo in kosmičast kvas. V primeru kvasa, ki tvori verigo, čeprav so bile celice agregirane, le ta ni smatran kot vrsta flokulacije oz. izkosmičenja, ker te celice nikoli niso bile samostojne, da bi z njimi pričeli in flokulacija se nanaša na samostojne celice, ki se združujejo tako, da oblikujejo maso zaradi ugodnih okoliških pogojev (Ca^{2+} ioni in nizke vsebnosti inhibitornih sladkorjev). V primeru kosmičastih celic, je lahko določena velikost flokul oz. kosmov odvisna od celične genetike kot tudi od hidrodinamskih pogojev katerim je celica izpostavljena (strižno okolje).

SL. 13 in SL. 14 prikazujeta dva vrsti Labatt lagerskega kvasa z različnima stopnjama izkosmičenja oz. flokulacije. Srednje kosmičast kvas, LCC3021, je predstavljen na SL. 13. V prisotnosti kalcijevih ionov bo ta vrsta tvorila 0.5 mm do 1.0 mm aggregate, ko se porabi glukoza iz tekočega medija. SL. 14 je slika superkosmičastega kvasa, LCC290, ki bo tvoril flokule oz. kosme velikosti večje kot 1mm in pod nižjim strižnim okoljem agregiral v skupke premera do 5 mm. Pod zmernimi mešalnimi pogoji bo premer kosma oz. flokule LCC290 med 1 in 2 mm.

Številne merilne metode so bile predlagane za ocenjevanje izkosmičenja kvasa (Speers & Ritcey, 1995; Ajiyama-Jibiki s sodelavci, 1997; Teixeira s sodelavci, 1991; Stewart & Russell, 2000). V 'Brewer's Yeast' (Stewart & Russell, 2000) je bilo predlagano, da so lahko metode kvasnega kosmičenja oz. flokulacije deljene v tri kategorije, in sicer sedimentacijske metode, statične fermentacijske metode in direktno opazovanje tvorbe kosmov v rasnem mediju.

Sedimentacijsko metodo, ki jo je najprej opisal Burns 1937, je dopolnil Helm s kolegi 1953 in je danes del standardnih metod analize priznane s strani tehniškega in uredniškega komiteja (Technical Committee and the Editorial Committee) združenja American Society of Brewing Chemists (1992). Ta tehnika je obravnavana kot in vitro tehnika, ker so ocenjevane usedalne značilnosti kvasa v kalcij-sulfatnem pufru in ne v dejanskem fermentacijskem mediju. Statična fermentacijska metoda (tudi poznana kot Gilliland metoda) vključuje rast kvasa v 'vzburjeni' ječmenovki in merjenje flokulacijskih značilnosti v živo. Obe ti metodi vključujeta meritve absorbance usedlih vzorcev kvasa vs. vzorcev kvasa, ki so bili deflokulirani z uporabo UV/vidnega spektrofotometra.

Stewart in Russell (2000) predstavljata metodo za merjenje flokulacije kvasa z vidnim opisovanjem stopnje flokulacije, ki se zgodi v vzorcu kvasa zraslega v 20 ml stekleničkah z navojnim pokrovom. Za izražanje stopnje flokulacije sta uporabila subjektivne kriterije, na primer: 5 – ekstremno flokuliran (kosmičast), 4 – zelo flokuliran (kosmičast), 3 – zmerno flokuliran (kosmičast), 2 – šibko flokuliran (kosmičast), 1 – grobo flokuliran (kosmičast) in 0 – neflokuliran (nekosmičast). Superkosmičasta vrsta kvasa LCC290 je dobila oceno 4 – zelo flokuliran (kosmičast), medtem ko je LCC3021 vrsta kvasa dobila oznako 3 – zmerno flokuliran (kosmičast).

Kosmičavost je pomembna značilnost v pivovarski industriji, ker je naravna težnja kvasa ali usedanje ali dvigovanje na površino pogosto uporabljena kot separacijska metoda za ta kvas iz fermentirajoče tekočine. Kakorkoli, vrsta kvasa, ki flokulira preden je fermentacija zaključena, je nezaželjena, ker tekočina ne bo dosegla stopnje njenega idealnega alkohola in preostalega sladkorja. V kontinuirni fermentaciji in še posebej v kontinuirni fermentaciji z notranjo zanko in plinskim vlekrom, kosmičast kvas deluje kot imobilizacijski matriks. Njihova tendenca po usedanju je kompenzirana z vbrizgom razpršilnega plina, ki ga ohranja v suspenziji. S takšnim sistemom je strah pred nezadostno fermentacijo tekočega medija eliminiran, ker trdni delci kontinuirano krožijo in vzdržujejo intimni kontakt s fermentirajočo tekočino.

V poglavju 6.2.2.1 so podrobno opisane usedalne lastnosti in fermentacijski učinek superkosmičastega kvasa LCC290. Koristno je bilo identificirati pričetek flokulacije za to določeno vrsto kvasa. V nadaljevanju je bila določena usedalna hitrost kvasa z namenom dobiti koristne informacije, ki bi lahko bile uporabljene za načrtovanje usedalnih posod za kvas v prihodnosti.

6.2.2.1 Značilnosti superkosmičastega kvasa, LCC290

Pred izvajanjem kontinuirnih fermentacij s superkosmičastim kvasom LCC290 v bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom, je bilo odločeno okarakterizirati kvas na laboratorijskem nivoju fermentacij v stresalnih posodah. Slika 6.28 prikazuje razvoj kvasne populacije s časom. Kot je bilo pričakovano, je koncentracija narasla zelo strmo v prvih 48 urah in se nato stabilizirala ob rahlem padcu na koncu fermentacije. V prvih 48 urah je bilo v ječmenovki prisotnega dovolj hraniva in kisika za rast kvasa. Kakorkoli, ko kvas nadaljuje porabljati ogljikove hidrate v odsotnosti kisika, se ne bo reproduciral pač pa bo

vstopil v anaerobno fermentacijsko fazo. Ko je vsebnost ogljikovih hidratov potrošena, majhna populacija kvasa pričinja odmirati. Ta fenomen je predstavljen na sliki 6.29, kjer je stopnja celične preživelosti padla iz približno 97% na samo okoli 90%.

Slika 6.30 kaže porabo ogljikovih hidratov med procesom fermentacije. Celice kvasa so najprej porabile preproste sladkorje glukozo in fruktozo, nato pa so v skladu z naravnim delovanjem porabile maltozo in maltotriozo. Pivovarski kvas, kakorkoli, ne metabolizira maltotrioze ali dolgoverižnih polisaharidov (poli 1 & 2). Ko je celotna koncentracija ogljikovih hidratov padla (predstavljeno s krivuljo specifične teže na sliki 6.31), je koncentracija etanola narasla proporcionalno. Po približno 37 urah fermentacije sta bili koncentraciji etanola in ogljikovih hidratov enaki.

Z vidika rasti in metabolizma ogljikovih hidratov se je zdelo, da se je superkosmičasti kvas LCC290 obnašal kot bi se industrijski kvas vrste LCC3021. Pokazalo se je, da je fermentacija dosegla zaključek, ko je specifična teža tekočine dosegla približno 2.7°P. Često kosmičaste vrste kvasa oblikujejo velike skupke (flokule) in se sesedejo iz raztopine pred koncem fermentacije; ta fenomen je znan v pivovarski industriji kot 'hung' fermentacija. V naših šaržnih poskusih smo lahko končali fermentiranje, ker so bile posode mešane in je tako ostal kvas v suspenziji in v tesnem kontaktu z oskrbo hrane.

Druge pomembne značilnosti, ki je bila proučevana, je bila sposobnost kvasa, da se kosmiči oz. flokulira. Še posebej smo bili zainteresirani za določitev hitrosti s katero bi se kvas usedel, zanimal pa nas je tudi indikator kdaj bi ta določena vrsta kvasa pričela flokulirati. Obe značilnosti sta pomembni za kontinuirne fermentacijske poskuse, ker igrajo vlogo pri vzdrževanju zdrave populacije kvasa v fermentorju s plinskim vlekom. Slika 6.32 kaže usedalne krivulje za kvas v obdobju fermentacije. Zelo malo usedline se je pojavilo v vzorcu testiranem po 24 urni fermentaciji. Flokulacija je bila preprečena s prisotnostjo

določenih sladkorjev; glukosa je znana kot inhibitor, zato se bo flokulacija pričela samo, ko se ta inhibitor porabi. V vzorcu po 40 urni šaržni fermentaciji so celice pričele flokulirati in se usedati iz raztopine, ko so bile testirane po metodi opisani v poglavju 4.7. Usedanje je bilo zelo hitro za vse testirane intervale, razen za 24 urni, ko do usedanja ni prišlo. Med najpočasnejšim usedalnim poskusom, ki je bil izveden pri 40 urah, je kvas porabil 90 s za to, da bi se kompletno usedel v testnem aparatu. Pri 71 urah je bilo za usedanje potrebnih samo 50 s.

Raziskovalci so predpostavili, da je usedalna hitrost odvisna od koncentracije trdnih snovi (Coe in Clevenger, 1916). Slika 6.33 prikazuje hitrost usedanja trdnih snovi pri dani koncentraciji kvasnih celic. Podatkovne točke za to krivuljo so bile dobljene z uporabo metode, ki jo je predlagal Kynch (1952) na osnovi usedalnih podatkov zbranih pri vsakem fermentacijskem intervalu. Rezultati ležijo na približno enaki krivulji in tako potrjujejo enak fenomen, kot sta ga opazila Coe in Clevenger (1916).

Rezultati zbrani med usedalnim testom so pokazali, da bo superkosmičasta vrsta kvasa LCC290 flokulirala pri specifičnih težah tekočine 6°P in nižje. Ta vrednost je lahko uporabljena kot vodilo za kontinuirne fermentacije in sicer za nakazovanje, kje mora biti obdržana specifična teža tekočine v psevdo ravnotežnem stanju, če želimo, da poteka flokuliranje oz. izkosmičenje celic. Operiranje reaktorja nad 6°P bi lahko povzročilo destabiliziranje flokuliranih celic in bi lahko mogoče vodilo do izpiranja populacije imobiliziranega kvasa. Usedalne značilnosti superkosmičastega kvasa kažejo, da se bo kvasna populacija usedla dokaj hitro, če pustimo, da mirno stoji. S trifaznim bioreaktorjem z notranjo zanko in plinskim vlekrom bo mogoče obdržati celice v kroženju, vendar bi se v primeru napake v sistemu dovajanja plina celična populacija sesedla hitro in verjetno zahtevala pomožno razprševanje plina, da bi se tako trdne snovi resuspendirale. Za po-fermentacijska procesiranja je ta značilnost hitrega usedanja prednostna, ker so lahko za odstranjevanje trdnih snovi v glavni masi uporabljene separacijske naprave za trdne snovi, kot so težnostni usedalniki. V pivovarni industriji bi to zmanjšalo nalaganje trdnih snovi na centrifugirno opremo in tako dovolilo daljše obratovalne čase med zamenjavami centrifugirnih bobnov. Tako bi po pričakovanju prišlo do manjše izgube piva in neželjen priokus, ki je pivu prenešen s centrifugo (čeprav minimalen) bi bil zmanjšan zaradi manjše vsebnosti kvasne biomase, ki potuje skozi centrifugo.

Opis slik:

Slika 6.28 Celotna koncentracija kvasnih celic LCC290 v mešalnih šaržnih fermentacijah v odvisnosti od fermentacijskega časa. Fermentacijska temperatura je bila vzpostavljena na 15°C.

Slika 6.29 Stopnja preživetja kvasnih celic izmerjena z metilensko modrim v odvisnosti od fermentacijskega časa.

Slika 6.30 Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od fermentacijskega časa za LCC290 kvasne šaržne fermentacije.

Slika 6.31 Koncentracije etanola in glicerola in specifična teža tekočine v odvisnosti od fermentacijskega časa za LCC290 kvasne šaržne fermentacije.

Slika 6.32 Višina vmesne faze kvasne suspenzije v odvisnosti od časa usedanja. Vrednosti za ta graf so bile zbrane pri različnih fermentacijskih intervalih.

Slika 6.33 Hitrost usednja kvasne suspenzije v odvisnosti od celične koncentracije. Vrednosti za ta graf so bile zbrane pri številnih fermentacijskih intervalih.

6.3 OCENJEVANJE TEHNOLOGIJE S PLINSKIM VLEKOM ZA KONTINUIRNO FERMENTACIJO PIVA

Prvi in najpomembnejši cilj te teze je bil oceniti sposobnost obratovanja 50-l pilotnega bioreaktorja s plinskim vlekrom v kontinuiranem načinu z uporabo α -karagenanskih gelnih kroglic za omreženje celic *Saccharomyces carlsbergensis* (opisanih v poglavju 6.2.1). V nadaljevanju je bila naša želja proučevati ali je lahko severnoameriška vrsta lagerskega piva sprejemljive arome proizvedena v takšnem sistemu. Prav tako smo načrtovali določiti minimalni zadrževalni čas potreben za popolno 'atenuacijo' ječmenovke z visoko težo (17.5 °P) kot tudi dognati obratovalno območje za kisik znotraj kontinuirnega fermentacijskega sistema.

Minimalni zadrževalni čas, v katerem so bili porabljeni vsi sladkorji v ječmenovki, je bil 24 ur. To je primerljivo s časom klasične šaržne fermentacije pet do sedem dni. Koncentracija raztopljenega kisika merjena z Ingold kisikovo sondo znotraj bioreaktorja je bila blizu nič ne glede na kisik dodan razprševalnemu plinu (območje od 0 do 20 % v/v). To je nakazovalo, da je bil kisik doveden v ječmenovko ali hitro porabljen s kvasnimi celicami ali preprosto odveden v izstopni plin. Delež prostih celic v izlitju piva je bil velikostnega razreda 10^8 celic na ml zelenega piva. Vsebnosti diketonov, diacetila in 2,3-pentandiona, kot tudi vsebnost acetaldehida, se je znižala z znižanjem deleža kisika v razprševalnem plinu (sliki 6.34 in 6.35). Izmerjeni estri (etil acetat in izoamil acetat) in višji alkoholi (propanol, izobutanol, izoamil alkohol) niso pokazali, da bi nanje vplivala sprememba v oskrbi s kisikom (slika 6.36).

Slika 6.37 primerja različne aromatsko aktivne spojine v dveh končnih testnih pivih in sicer v pivu proizvedenem s kontinuirnim imobiliziranim celičnim sistemom in v kontrolnem pivu proizvedenem industrijsko (prosto celična šaržna fermentacija). Nekatere razlike v estrih (etil acetat, izoamil acetat) in višjih alkoholih (propanol) so bile dosledno

opažene med kontinuirno fermentiranim pivom in kontrolo, ne glede na stopnjo oskrbe s kisikom. Okus končanega piva proizvedenega z 2% kisikom so ocenili kvalificirani preiskuševalci (angl. 'trained taste-panel') in sicer kot relativno blizu kontrolnemu pivu (industrijski produkt). Pivo proizvedeno z 20% kisikom pa je bilo ocenjeno kot nesprejemljivo in povezano z aromatsko oksidacijo in 'papirnim' in 'vinskim' okusom.

Pri psevdoravnotežnem stanju je pilotni bioreaktor obratoval z zadrževalnim časom 24 ur v 6-tedenski periodi. 'Zeleno' pivo je imelo sprejemljiv aromatski profil in večja odstopanja (žveplova odstopanja) niso bila opažena. Količina kisika v razpršenem plinu se je potrdila kot kritičen element v tem eksperimentiranju. Piva proizvedena z 2 do 5% kisika v razpršilnem plinu so dala najboljše profile okusa. Za to kritično kontrolno točko je potrebna nadaljnja pozornost z osredotočanjem na bolj točne kisikove merilne tehnike z meritvami izvedenimi na večjem nizu pred-fermentacijskih in po-fermentacijskih analitov. V tradicionalni šaržni primarni fermentaciji je bila ječmenovka dozirana s kisikom preden je bila prenešena v fermentor. Po inokulaciji medija, je koncentracija raztopljenega kisika hitro padla kot posledica porabe kvasnih celic (prvih 24 ur fermentacije, ko poteka rast celic). Preostala fermentacija zato poteka pod večinoma anaerobnimi pogoji. Za uporabo kontinuirnega homogenega sistema za primarno fermentacijo ni značilna ta sprememba koncentracije kisika v času. Zato je zelo težko doseči popolno ujemanje okusa piva, ki je proizvedeno z uporabo kontinuirne in šaržne fermentacije. Ne glede na te razlike, je testirana konfiguracija bioreaktorja v tem začetnem ocenjevanju dala pivo s sprejemljivo kvaliteto arome in sprejemljivim analitskim profilom. Z uporabo bioreaktorja s plinskim vlekrom z relativno majhnimi kroglicami (~ 1 mm) je bilo mogoče povečati volumsko produktivnost bioreaktorja z zmanjševanjem časa za primarno fermentacijo za nekaj dni. Vsebnost sproščene biomase v obstoječem pivu je pokazala, da je bila stopnja rasti kvasa v imobiliziranem celičnem bioreaktorju ekvivalentna le tej v prosto celični šaržni fermentaciji pod podobnimi pogoji. Ta opazovanja potrjujejo povezanost tvorbe arome s stopnjo rasti kvasa. S tem je mogoče razložiti napako prejšnjih poskusov, da bi proizvedli sprejemljivo pivo s sistemi z omejeno rastjo imobiliziranih celic. Oskrba kontrolirane plinske zmesi je lahko močno orodje pri finem uravnavanju organoleptičnih lastnosti v kontinuirnih imobiliziranih celičnih fermentacijah.

Drugi raziskovalci so tudi opazili visoko vsebnost diacetila (Virkajarvi & Pohjala, 1999; Kronlof s sodelavci, 2000). V severnoameriški vrsti lagerskih piv je ciljna vsebnost

diacetila 30 $\mu\text{g/l}$ v primerjavi z vsebnostjo 400 – 800 $\mu\text{g/l}$ v obstoječi kontinuirani fermentacijski tekočini. Uporaba tradicionalne tehnologije zorenja (hladno staranje pri 2 °C za 14 dni) je znižala vsebnost diacetila na željeno območje vendar na škodo celotne procesne produktivnosti. Uporaba hitre sekundarne fermentacijske tehnologije, ki je bila navajana v poglavju 2, bi lahko pomagala znižati vsebnost diacetila brez pomembnega znižanja produktivnosti (2-urni proces). Dodatni stroški bi kakorkoli lahko bili previsoki in vsi pivovarji morda ne bi želeli izpostaviti njihovega piva višjim temperaturam (80 °C do 90 °C).

Opis slik:

Slika 6.34 Koncentracija diketonov v odvisnosti od procenta kisika v razpršilnem plinu. Fermentacije so bile izvedene v 50-l sistemu s plinskim vlekem napolnjenim s 40% (v/v) karagenanskih gelnih kroglic. Celotna hitrost razpršilnega plina je ostala konstantna pri 0.18 sm^3h^{-1} . Zadrževalni čas je bil 24 ur.

Slika 6.35 Koncentracija aldehida v odvisnosti od procenta kisika v razpršilnem plinu. Fermentacije so bile izvedene v 50-l sistemu s plinskim vlekem napolnjenim s 40% (v/v) karagenanskih gelnih kroglic. Celotna razpršilna hitrost je ostala konstantna na 0.18123 sm^3h^{-1} . Zadrževalni čas je bil 24 ur.

Slika 6.36 Koncentracija estrov in 'fuzilnih' alkoholov v odvisnosti od procenta kisika v razpršilnem plinu. Fermentacije so potekale v 50-l sistemu s plinskim vlekem napolnjenim s 40% (v/v) karagenanskih gelnih kroglic. Celotna razpršilna hitrost je ostala konstantna 0.18 sm^3h^{-1} . Zadrževalni čas je bil 24 ur.

Slika 6.37 Primerjava končnega produkta z 2% kisika in 20% kisika v razpršilnem plinu z industrijsko proizvedenim pivom in pragovi okusa. Za kontinuirne fermentacijske produkte so bile fermentacije izvedene v 50-l sistemu s plinskim vlekem napolnjenim s 40% (v/v) karagenanskih gelnih kroglic. Celotna razpršilna hitrost je bila konstantna pri 0.18 sm^3h^{-1} . Zadrževalni čas je bil 24 ur.

6.4 HITROSTI POMEŠANJA IN OBKROŽENJA FLUIDA V FERMENTACIJAH V TRIFAZNEM BIOREAKTORJU Z NOTRANJO ZANKO IN PLINSKIM VLEKOM

Mešalni eksperimenti so bili izvedeni z metodo kislinskega vbrizga opisano v poglavju 4.8. Cilji te faze eksperimentiranja so bili dvojni. Najprej smo želeli oceniti ali je bil sistem s plinskim vlekem dobro mešan z izračunavanjem hitrosti obkroženja fluida in iz nje določenega časa pomešanja za številne imobilizacijske nosilce pri različnih hitrostih plina

na prazen presek za fluidizacijo (angl. 'superficial fluidizing gas velocity'). Ti poskusi so od tistih objavljenih v literaturi odstopali po tem, da je bilo celotno eksperimentiranje izvedeno na dejanskem fermentacijskem mediju z aktivnimi kvasnimi celicami in ne na modelnih raztopinah (voda-trdna snov-plin sistemi). Ti mešalni eksperimenti si bili prav tako vodeni v smislu izračunavanja hitrosti tekočin na prazen presek, ki bi bile lahko uporabljene v nadaljnji izgradnji pilotnega sistema.

6.4.1 Kalibracija sonde

pH sonda, ki je bila uporabljena v mešalnih eksperimentih, je bila kalibrirana z uporabo metode opisane v poglavju 4.8. 4-20 mA signal, ki ga je emitirala pH sonda, je potoval skozi 250 Ohm upor in je bil pretvorjen v 1-5 voltni signal, ki bi lahko bil zabeležen s kartico za zajemanje podatkov (DAC). pH sonda je bila zaporedoma potopljena v vrsto pufrov, kot sledi: pH 4.6 pufer, pH 4.0 pufer, pH 5.0 pufer, pH 6.0 pufer in končno v pH 7.0 pufer (Beckman certificirani standardi, Cole Palmer). Slika 6.38 prikazuje podatke zbrane z zajemalnim sistemom za odziv Ingold pH sonde na 5 standardnih pH raztopin. Slika 6.39 je kalibracijska krivulja za pH sondo, ki grafično prikazuje dejansko pH vrednost v odvisnosti od izmerjenega voltne signala. Najboljše pokrivanje kalibracijske krivulje za ta sistem (koeficient korelacije 0.9996) je bilo definirano z naslednjo enačbo:

$$\text{pH} = 3.68 * \text{napetost električnega toka} - 3.53 \quad (6.1)$$

Zbrani podatki mešanja so bili pretvorjeni z uporabo enačbe 6.1, da bi odražali dejanske pH vrednosti kot so bile izmerjene znotraj bioreaktorja s plinskim vlekom.

Odzivni čas pH sonde na spremembo pH je bil prav tako izmerjen. Slike 6.40 do 6.43 prikazujejo značilen odziv pH sonde na štiri različne korake sprememb pH, in sicer 0.6, 1.2, 2.3 in 3.4. Osnovnim podatkom je bila prilagojena pulzna funkcija z uporabo software-a TableCurve 2D (Jandel Scientific) za prikazovanje in analizo podatkov. Nastale prilagoditvene krivulje so imele koeficiente korelacije večje kot 0.994. Iz teh krivulj je bil izračunan čas potreben za odziv sonde na 98% spremembe (odzivni čas) in je bil nato prikazan v odvisnosti od koraka spremembe pH (slika 6.44). Odzivni čas se je zmanjšal s korakom spremembe pH v testiranem območju. Za najmanjši korak spremembe 0.6, je bil

odzivni čas pH sonde ~ 6.4 sekund. Odzivni čas se je zmanjšal na približno 4.2 sekund za korak spremembe pH 3.4.

Ta način karakterizacije sonde je pomemben, še posebej, ko je bil sistem uporabljen za oceno časa pomešanja in hitrosti obkroženja fluida. Sonda mora imeti nizek odzivni čas, da bi reflektirala spremembe v mediju, ki ga meri. Še posebej mora biti odzivni čas pH sonde nižji kot hitrost obkroženja fluida v reaktorju, če želimo, da je le ta ustrezno uporabljena v takšni meritvi. Kvazi-trenutni odziv kljub temu ni potreben, ker bo majhen lag v odzivu enostavno reflektiran v naslednjih meritvah hitrosti obkroženja fluida in zato izničen.

Opis slik:

Slika 6.38 Izvirni podatki zbrani s sistemom za zajemanje podatkov o odzivu Ingold pH sonde na različne raztopine pufrov v odvisnosti od časa. Frekvenca zajemanja podatkov je bila 50 Hz za skupno 15000 točk.

Slika 6.39 Kalibracijska krivulja pH sonde prikazana v odvisnosti od izmerjene napetosti električnega toka (V). Črta, ki se najbolje prilega kalibracijski črti, ima naslednjo enačbo: $\text{pH} = 3.68 * \text{napetost električnega toka} - 3.53$ s korelacijskim koeficientom 0.9996 ($N = 2500$).

Slika 6.40 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 0.6. Skozi točke odziva je bila potegnjena krivulja z uporabo TableCurve software-a. Najboljše prilagojena pulzna funkcija je imela koeficient korelacije 0.995.

Slika 6.41 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 1.2. Skozi točke odziva je bila potegnjena krivulja z uporabo TableCurve software-a. Najboljše prilagojena pulzna funkcija je imela koeficient korelacije 0.999.

Slika 6.42 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 2.3. Skozi točke odziva je bila potegnjena krivulja z uporabo TableCurve software-a. Najboljše prilagojena pulzna funkcija je imela koeficient korelacije 0.999.

Slika 6.43 Značilni odzivni čas pH sonde na korak spremembe pH ~ 3.4. Skozi točke odziva je bila potegnjena krivulja z uporabo TableCurve software-a. Najboljše prilagojena pulzna funkcija je imela koeficient korelacije 0.999.

Slika 6.44 Odzivni čas na korak spremembe ($N=3$) za Ingold pH sondo. Sonde so bile potopljene v pufer z višjim pH in nato takoj izpostavljene nižjemu pH pufru 4.0. Črta, ki se najbolje prilega vsaki odzivni krivulji, je bila uporabljena za izračun časa, ki je potreben, da bi sonda dosegla 98% koraka spremembe.

6.4.2 Čas pomešanja in hitrost obkroženja fluida

Eksperimenti za določanje časa pomešanja in hitrosti obkroženja fluida so bili izvedeni na treh vrstah fermentacij z imobiliziranimi celicami. Eksperimentiranje je potekalo v 50-l pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko na modelni vodni raztopini, ki ne vsebuje trdnih snovi in nato na fermentacijski juhi s specifično težo 2.7 °P, ki vsebuje ali κ -karagenanske gelne kroglice, superkosmičast kvas LCC290 ali srednje kosmičast kvas LCC3021. Sliki 6.45 in 6.46 sta vzorčna prikaza surovih podatkov zbranih z uporabo sistema pH sonde po vbrizgu kislinskega pulza (metoda opisana v poglavju 4.8). Slika 6.45 prikazuje odziv pH sonde na vbrizg kisline v vodno raztopino, ki ne vsebuje trdnih snovi, medtem ko je slika 6.46 odziv po vbrizgu kisline v fermentacijsko juho, ki vsebuje visoko kosmičast kvas, LCC290. Signali so bili primerjani s padajočo sinusoidno krivuljo in koeficienti korelacije 0.96 oz. 0.90 so bili izračunani za odgovarjajoče enačbe. Prilagoditvena parametra 'b' in 'c' na diagramih **ustrezata 'a' in '□'** vrednostima v enačbi za padajočo sinusoido (3.1). Te številčne vrednosti so bile uporabljene v enačbah 3.2 in 3.3 za izračun hitrosti obkroženja fluida in časa pomešanja za dan sistem. Dodatek B vsebuje preostale podatke za mešanje in prilagoditvene krivulje za vse eksperimente.

Sliki 6.47 in 6.48 sta grafa za čas pomešanja in hitrost obkroženja fluida za vbrizg kisline v vodno raztopino, ki ne vsebuje trdnih snovi. Sliki 6.49 in 6.50 sta ustrezna grafa za mešalne eksperimente z uporabo močno kosmičastega kvasa LCC290, medtem ko so rezultati κ -karagenanskih mešalnih testov predstavljeni na slikah 6.51 in 6.52. Končno, čas pomešanja in hitrost obkroženja fluida srednje kosmičastega kvasa LCC3021 sta prikazana na slikah 6.53 in 6.54. Ne glede na vrsto testirane trdne snovi, sta oba, čas pomešanja in hitrost obkroženja padla z ustreznim povečanjem hitrosti plina na prazen presek. Zveza med hitrostjo obkroženja fluida in hitrostjo tekočine na prazen presek je ustrezala enačbi 3.11, ki sta jo predlagala Kennard in Janekah (1991) za vse štiri testirane sisteme. Čas pomešanja je sledil zvezi v enačbi 3.11 za sistem voda/ne trdne snovi in κ -karagenanski sistem gelnih kroglic. Oba sistema s kosmičastim kvasom kot imobilizacijskim matriksom nista pokazala močne zveze s teoretičnim modelom Kennard in Janekah. Sistema LCC290 in LCC3021 sta imela začetne čase pomešanja (dokler ni hitrost plina na prazen presek presegla 4 mm/s) nižje kot so bili le ti predpostavljeni z modelom. Hitrost znižanja časa pomešanja pa se je upočasnila pri superkritičnih plinskih hitrostih večjih od 4 mm/s, medtem ko so bile vrednosti modela nižje. Tabela 6.1 prikazuje izpeljane enačbe za čas obkroženja fluida in čas pomešanja, ko se le te nanašajo na hitrost plina na prazen presek.

Slika 6.55 prikazuje zvezo časa pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek za vse štiri sisteme. Scenarij voda/ netrdne snovi je pokazal najdaljši čas za 98% mešanje pH pulza (~ 220 sekund pri V_{sg} 3 mm/s) in sistem LCC290 je pokazal najboljšo kapaciteto za zmanjšanje učinka pulza kisline v sistemu (~ 110 sekund pri V_{sg} 3 mm/s). Vrednosti za LCC3021 in κ -karagenanski sistem so bile med voda/netrdne snovi in LCC290 sistemi. Trdne snovi v bioreaktorju s plinskim vlekom pomagajo z disperzijo fluidnih elementov tekoče faze pri stimuliranju tvorbe vrtincev in pospeševanju ko-aksialnega mešanja. Superkosmičast kvas LCC290, je navkljub enaki vsebnosti tdnih snovi (16% m/v) kot srednje kosmičast kvas LCC3021, dovoljeval hitrejšje (nižje) čase pomešanja pri vseh testiranih hitrostih plina na prazen presek.

Slika 6.56 prikazuje čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek za vse štiri testirane sisteme. Pri hitrosti plina na prazen presek 2 mm/s, je bil čas obkroženja fluida med 28 sekundami in 35 sekundami s sistemom voda/netrdne snovi z najvišjo hitrostjo obkroženja fluida in sistemom LCC290, ki prikazuje najnižjo hitrostjo obkroženja fluida. Pri višjih plinskih hitrostih so bile razlike med 4 sistemi znižane na približno 3 sekunde. Pri vseh testiranih hitrostih pa je sistem LCC290 predstavljal nekoliko počasnejše hitrostjo obkroženja fluida, medtem ko je imel sistem voda/netrdne snovi najvišje hitrosti obkroženja fluida.

Slika 6.57 prikazuje zvezo med hitrostjo plina na prazen presek in hitrostjo tekočine na prazen presek. Enačba 3.7, ki sta jo predlagala Livingston in Zhang (1993), je bila uporabljena za izračun hitrosti tekočine na prazen presek za dano hitrost obkroženja fluida in vrsto trdne snovi. Hitrost tekočine na prazen presek je narasla z odgovarjajočim naraščanjem hitrosti plina na prazen presek. LCC3021 in sistemi voda/netrdne snovi so imeli podobne trende, medtem ko sta LCC290 in κ -karagenanski sistem pokazala nekatere podobnosti. Model enačbe, ki sta ga predlagala Kennerd in Jenekah, je ustrezal krivulji hitrosti tekočine na prazen presek v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek na sliki 6.57. Slika 6.58 grafično prikazuje eksperimentalno izračunano hitrost tekočine na prazen presek v odvisnosti od teoretično izračunane hitrosti tekočine na prazen presek z uporabo enačbe 3.10. Vsi štirje sistemi so se ujemali z enačbo pokazano z linearno funkcijo z naklonom 1 in izhodiščem $y=0$. Tabela 6.1 podaja zveze, ki so bile dobljene za sisteme, ki so bili testirani v tem raziskovalnem delu.

Opis slik:

Slika 6.45 Odziv pH sonde v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v vodno raztopino, ki ni vsebovala trdnih snovi. Hitrost plina na prazen presek je bila uravnana na 1.94 mm/s. Dejanski podatki so bili primerjani s padajočo sinusoidno krivuljo. Koeficient korelacije je bil 0.96.

Slika 6.46 Odziv pH sonde v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki je vseboval visoko kosmičast kvas, LCC290. Hitrost plina na prazen presek je bila uravnana na 1.94 mm/s. Dejanski podatki so bili primerjani s padajočo sinusoidno krivuljo. Koeficient korelacije je bil 0.90.

Slika 6.47 Čas pomešanja v odvisnosti od površinske plinske hitrosti v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v vodno raztopino, ki ni vsebovala trdnih snovi. Čas pomešanja ustreza času potrebnemu za izničenje 98% koraka spremembe. (N=3).

Slika 6.48 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v vodno raztopino, ki ni vsebovala trdnih snovi. (N=3).

Slika 6.49 Čas pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje visoko kosmičast kvas, LCC290 (velikost kosmiča > 1.0 mm). Čas pomešanja ustreza času potrebnemu za izničenje 98% koraka spremembe. (N=3).

Slika 6.50 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje visoko kosmičast kvas, LCC290 (velikost kosmiča > 1.0 mm). (N=3).

Slika 6.51 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje kvas, LCC3021, imobiliziran v κ -karagenanske gelne kroglice (velikost kroglice 1-2 mm). Čas pomešanja ustreza času potrebnemu za izničenje 98% koraka spremembe. (N=3).

Slika 6.52 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekcom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje kvas, LCC3021, imobiliziran v κ -karagenanske gelne kroglice (velikost kroglice 1-2 mm). (N=3).

Slika 6.53 Čas pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje srednje kosmičast kvas, LCC3021 (velikost flokul < 0.5 mm). Čas pomešanja ustreza času potrebnemu za izničenje 98% koraka spremembe. (N=3).

Slika 6.54 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje srednje kosmičast kvas, LCC3021 (velikost flokul < 0.5 mm). (N=3).

Slika 6.55 Čas pomešanja v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje različne trdne snovi. Čas pomešanja ustreza času potrebnemu za izničenje 98% koraka spremembe. (N=3).

Slika 6.56 Čas obkroženja fluida v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek v 50-l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. Kislini pulz je bil vbrizgan v fermentacijski medij, ki vsebuje različne trdne snovi. (N=3)

Slika 6.57 Hitrosti tekočine na prazen presek (mm/s) v odvisnosti od hitrosti plina na prazen presek (mm/s) za štiri testirane sisteme – LCC3021 kvas, LCC290 kvas, karagenanske gelne kroglice in sistem voda/netrdne snovi. Testiranje je bilo izvedeno v 50-l pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom.

Slika 6.58 Teoretična hitrost tekočine na prazen presek (mm/s) v odvisnosti od eksperimentalne hitrosti tekočine na prazen presek (mm/s) za štiri testirane sisteme. Teoretična vrednost je bila izračunana z uporabo naslednje zveze, ki sta jo predlagala Kennard in Janekah (1991): $V_{SL} \propto V_{SG}^M$. Linearna premica ima naklon 1 in presečišče z y osjo 0.

Tabela 6.1 Pregled izračunanih zvez za čas pomešanja, čas obkroženja fluida in hitrost tekočine na prazen presek za štiri testirane sisteme.

	Čas pomešanja	Čas obkroženja fluida	Hitrost tekočine na prazen preseki
Voda/netrdne snovi	$t_m = 336.04 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 37.94 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 189.06 V_{SG}^{0.283}$
LCC290 kvas	$t_m = 181.55 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 44.67 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 134.75 V_{SG}^{0.419}$
κ -karagenanski gel	$t_m = 254.68 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 41.73 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 171.92 V_{SG}^{0.283}$
LCC3021 kvas	$t_m = 322.07 V_{SG}^{-0.4}$	$t_c = 37.90 V_{SG}^{-0.4}$	$V_{SL} = 158.12 V_{SG}^{0.427}$

Za tekočinsko zvezo na presek sta Kennard in Janekah (1991) predlagala eksponent 0.41 v destilirani vodi in 0.64, ko je raztopina vsebovala ogljikovometilno celulozo in etanol.

Sistema LCC290 in LCC3021 sta imela eksponenta 0.419 oz. 0.427, medtem ko je imel sistem κ -karagenan in sistemi voda/netrdne snovi eksponent 0.283.

Osnovna predpostavka tehnologije z notranjo zanko in plinskim vlekom je, da sistem zagotavlja ustrezno mešanje in sicer tako, da je fluidni element v reaktorju popolnoma mešan. Pri obratovanju 50-l pilotnih sistemov kot kontinuirnih fermentorjev, je bil vbrizgan svež hranilni medij na dno reaktorja s pretočno hitrostjo 36 ml na minuto v celotni volumen reaktorja 50 l. To pomeni približno 1000-kratno redčenje napajalnih komponent. Z mešalnimi karakteristikami izračunanimi za LCC290 kvasni sistem, je fluidni element mešan v približno 3 reaktorskih krožilnih zankah, medtem ko je za scenarij voda/netrdne snovi potrebnih 10 reaktorskih krožilnih zank. V nadaljevanju, zadrževalni čas (24 ur) je približno 1000 krat večji kot čas pomešanja (180 sekund). Hitro mešanje združeno z redčenjem hranilnih snovi v sistemu in velika razlika v času pomešanja v odvisnosti od zadrževalnega časa močno svetuje ustrezen mešalni sistem. Prvotna premisa za uporabo bioreaktorja s plinskim vlekom je bila, da je le ta zagotovil idealno mešalno okolje za fermentacijo piva. Rezultati študij mešanja izdelanih na vseh treh fermentacijskih nosilcih potrjujejo to predpostavko.

6.5 OVREDNOTENJE ŠTEVILNIH IMOBILIZACIJSKIH METOD ZA KONTINUIRNO PRIMARNO FERMENTACIJO V SISTEMU S PLINSKIM VLEKOM

Kontinuirne fermentacije so bile izvajane v 50-l pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekomb ob uporabi treh vrst imobilizacijskih nosilcev – κ -karagenanskih gelnih kroglic, superkosmičastega kvasa LCC290 in srednje kosmičastega kvasa LCC3021. Vse fermentacije so bile pričete z enako vsebnostjo kvasnega inokuluma (4g/l), industrijska lagerska ječmenovka pa je bila uporabljena kot hranilni medij. Fermentacije so se pričele v šarži, da bi bila tako omogočena hitra redukcija sladkorjev v ječmenovki, kot tudi, da bi bila pospešena rast kvasa v fermentorju. V primeru kosmičastega kvasa je ta šaržna faza omogočala tvorbo flokul kvasa, ki bi lahko bile zadržane v bioreaktorju tudi po tem, ko se je pričelo kontinuirano polnjenje. Ko je vsebnost diacetila v fermentacijski tekočini padla pod 30 $\mu\text{g/l}$, se je pričelo kontinuirno polnjenje ječmenovke. Naslednja poglavja bolj podrobno opisujejo fermentacijsko analizo, ki izhaja iz teh treh vrst imobilizacijskih matrikov.

6.5.1 Uporaba κ -karagenanskih gelnih kroglic: Omreženje

Uporaba κ -karagenanskih gelnih kroglic kot imobilizacijskega matriksa je pomagala pri oceni potencialne možnosti tehnologije s plinskim vlekomb za kontinuirno fermentacijo piva (poglavje 6.3). Še vedno je bilo potrebno oceniti ali lahko takšen sistem operira v daljših časovnih obdobjih (do 2 meseca) brez večjih obratovalnih težav vključno s fermentacijsko nestabilnostjo in kontaminacijo. Operacijski parametri za ta fermentacijski poskus so prikazani na sliki 6.59. Hitrost CO_2 na prazen presek je bila uravnana na 5.5 mm/s, medtem ko je bilo 0.9 mm/s zraka dovajanega v reaktor v tem razpršilnem plinu. Oksigenacijska hitrost je bila zato nastavljena na 3% celotnega razpršilnega plina, kar sovпада z rezultati v poglavju 6.3, ki navajajo proizvodnjo preferenčnega piva, ko je v sistem uvedeno 2-5% kisika. Fermentacijska temperatura je bila kontrolirana na 15°C. Nekatera odstopanja so vidna v podatkih in se nanašajo na naravo kontrolne zanke, ki je bila uporabljena.

Slika 6.60 predstavlja razvoj proste kvasne celične populacije skozi čas, kot tudi stopnjo preživetja kvasa. Stopnja preživetja je ostala relativno visoka med 2-mesečno fermentacijo

z začasnim zmanjšanjem izmerjenim okoli 200 ur. To odgovarja točki tik pred začetkom kontinuirnega dovajanja ječmenovke. V šaržni fermentaciji je pogosto, da se stopnja preživelosti zmanjša na koncu fermentacije, ker so celice prikrajšane za hranljive snovi. Ko se je kontinuirano napajanje ječmenovke pričelo, je stopnja preživelosti narasla nazaj na več kot 90%. Prosta kvasna celična populacija je bila nizka med 400 urami fermentacije in je nato, tekom naslednjih 300 ur, narasla za okoli deset krat od ~ 100 milijonov celic na ml do ~ 1.5 bilionov celic na ml. Ko je dosegla to maksimalno koncentracijo, je prosta celična kvasna populacija vzdrževala to psevdo ravnotežno vrednost med preostalo fermentacijo.

Nenadno povečanje prosto kvasne koncentracije je bilo verjetno povezano z imobilizirano kvasno celično populacijo. Na začetku fermentacije bo kvas omrežen v gel rasel znotraj gela, dokler ni bil zapolnjen ves razpoložljiv prostor. Ko so gelne kroglice napolnjene s kvasom, se bo razširjena populacija 'prelila' v tekoč medij. Zdi se, da naši rezultati nakazujejo, da je med prvimi 400 urami imobiliziran kvas rasel z gelom in, da pri ~ 700 urah, kvas ni imel več prostora, da bi rasel znotraj kroglice in zato se je pričelo sproščanje večjih količin celic v fermentacijsko brozgo.

Nestabilnost kvasne populacije se je odražala v etanolnem profilu in profilu specifične teže (slika 6.61). Med začetnimi 200 urami fermentacije je bilo pričakovano, da bi etanol naraščal s časom in da bi lahko specifična teža znižala nadaljno tradicionalno šaržno kinetiko. Med 200 in 600 urami, je etanol dosegel plato 45 g/l, specifična teža pa je ostala pri ~ 6°P. Ta rezultat ni bil pričakovan, ker bi naj imela tekočina po končani fermentaciji specifično težo ~ 2.5 do 2.7°P. Pri približno 600 urah, ko je bila prosta kvasna populacija ravno na tem, da doseže njen maksimum, je nivo etanola narasel do približno 70 g/l specifična teža ječmenovke pa je padla na približno 2.2°P. Podrobna obravnava specifičnih ogljikovohidratnih profilov v času (slika 6.62) kaže, da koncentracija maltoze ni padla do približno 600 ur procesa. Drugi sladkorji so bili reducirani kot je bilo pričakovano.

Dva druga ključna analita – diacetil in 2,3 pentandion - sta bila spremljana med 2-mesečnim kontinuirnim potekom (slika 6.63). Nižje točke pri približno 180 urah odgovarjajo koncu šaržne uvajalne faze. Ko se prične kontinuirano dovajanje, sta oba, diacetil in 2,3-pentandion, narasla hitro na okoli 500 µg/l oz. 400 µg/l. Začetno povečanje je bilo pričakovano, ker bi dovajanje svežega hranljiva stimuliralo rast kvasa in zato naraščanje vsebnosti presežnih metabolitov diacetila in 2,3 pentandiona. Med fermentacijo

je vsebnost 2,3-pentandiona ostali okoli 400 $\mu\text{g/l}$, medtem ko je koncentracija diacetila padla od 500 $\mu\text{g/l}$ do 275 $\mu\text{g/l}$ na polovici poti skozi kontinuirni fermentacijski proces. Ta točka sovpada tudi z vsebnostjo diacetila, ki je padel pod vsebnost 2,3-pentandiona kot je bilo opaženo v ocenitvi možnost uporabe poročani v poglavju 6.3.

Opis slik:

Slika 6.59 Obratovalni parameter za karagenansko imobilizacijsko fermentacijo v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.60 Celotna koncentracija kvasnih celic in stopnja preživetja κ -karagenanskega imobiliziranega kvasa v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.61 Koncentracija etanola in specifična teža karagenansko imobiliziranega kvasa kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.62 Profil ogljikovih hidratov karagenansko imobiliziranega kvasa kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.63 Koncentracija diketonov karagenansko imobiliziranega kvasa kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

6.5.2 Uporaba superkosmičaste vrste kvasa: Samokosmičenje (samoflokulacija)

Kontinuirne fermentacije z uporabo 50-l pilotnega bioreaktorja s plinskim vlekom napolnjene z LCC290 superkosmičastim kvasom so potekale v 3 mesečni časovni periodi. CO_2 razpršilni plin je bil uravnan na $\sim 2.5 \text{ mm/s}$, medtem ko je bil zrak uvajan pri $\sim 0.4 \text{ mm/s}$, da bi tako pospešil rast kvasa (to ustreza v celoti 1.51 l plina na minuto, ki je uvajan s 3% kisikom). Temperatura fermentacije v reaktorju je bila vzdrževana pri $\sim 15^\circ\text{C}$ med celotnim potekom. Prekinitev oskrbe z električno energijo nas je prisililo k znižanju temperature fermentorja na 4°C za periodo treh dni (okoli 1700 ur fermentacije) (slika 6.64). To ohlajanje reaktorja je bilo izvedeno z namenom upočasnitve presnove kvasa in vzdrževanja stopnje preživetja kvasa med prekinitvijo oskrbe z električno energijo. Ta nepričakovani dogodek je omogočal ocenitev prožnosti sistema ob dogodkih, ki bi se lahko pogosto pojavili v realnih industrijskih razmerah. Ko je bila elektrika ponovno vzpostavljena, je bila temperatura reaktorja ponovno uravnana na 15°C , fermentacija pa je potekala še nadaljnjih 30 dni.

Ko je bila začetna šaržna faza zaključena (~ 180 ur), je bila ječmenovka kontinuirano dovajana v sistem pri pretočni hitrosti 2.16 l na uro, kar je zagotavljalo 24 urni zadrževalni čas na osnovi 50 l delovnega volumna reaktorja. Po začetni šaržni periodi je celična koncentracija narasla in dosegla 3 bilijone celic/ml pri približno 750 urah fermentacije (slika 6.65). Ta masa kvasa je nato padla na približno 1 bilijon celic na ml pri okoli 1000 urah in ostala na tem nivoju do konca fermentacije. Stopnja preživetja kvasa je bila nad 90% med postopkom fermentacije. (slika 6.65).

Koncentracija etanola in specifična teža fermentacijske brozge je dosegla psevdo ravnotežno stanje kmalu po tem, ko se je pričelo kontinuirano polnjenje (slika 6.66). Koncentracija etanola je naraščala na približno 70 g/l in specifična teža tekočine je bila ~ 2.3°P za preostanek fermentacije. Profili ogljikovih hidratov na sliki 6.67 potrjujejo psevdo ravnotežno stanje pri približno 270 urah v kontinuirnem poteku fermentacije. Koncentracija polisaharida je padla od ~ 42 g/l na ~ 33 g/l pri približno 1400 urah fermentacije. Ta rezultat je posledica razlik v šaržah ječmenovke. Ker lagerski kvas ne more porabiti teh polisaharidov, ta anomalija v hranljivu ječmenovke ni imela izrazitega učinka na obratovanje oz. zmogljivost primarne fermentacijske posode. To razliko v deležu nefermentiranega sladkorja bi lahko zaznali trenirani preiskusovalci okusa (angl. 'taste panelists'), ki bi ugotovili, da je imel produkt 'ozko grlo'.

Koncentraciji diacetila in 2,3-pentandiona v času so predstavljene na sliki 6.68. Kot v primeru κ -karagenanskih kontinuirnih fermentacij sta vsebnosti diacetila in 2,3-pentandiona narasli kakor hitro se je pričelo napajanje ječmenovke. Diacetil je dosegel približno 375 μ g/l, medtem ko je bila koncentracija 2,3-pentandiona približno 600 μ g/l. Ti koncentracijski nivoji so bili vzdrževani med potekom fermentacije dokler ni prišlo do prekinitve v napajanju električne energije pri ~ 1700 urah. Ker je bila tekočina v šarži tri dni brez nadaljne presnove kvasa (zaradi pomanjkanja hranljiva), se je zmanjšala tudi vsebnost diketonov. Ko se je napajanje ječmenovke ponovno pričelo, sta se diacetil in 2,3-pentandion povrnili na vrednosti njunega psevdo ravnotežnega stanja.

Opis slik:

Slika 6.64 Obratovalni parameter za fermentacijo LCC290 v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.65 Celotna koncentracija kvasnih celic in stopnja preživetja kvasa LCC290 v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.66 Koncentracija etanola in specifična teža kvasa LCC290 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.67 Ogljikovohidratni profil kvasa LCC290 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.68 Koncentracija diketonov LCC290 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

6.5.3 Uporaba srednjega kosmičastega kvasa: Samokosmičenje (samoflokulacija)

Številne fermentacije so potekale z uporabo srednjega kosmičastega kvasa tipa LCC3021 kot imobilizacijskega matriksa v 50-l pilotnem bioreaktorju s plinskim vlekom. Kot v primeru dveh prejšnjih modelov imobilizacije, je bila začetna koncentracija kvasa 4g/l. Ta kvas je bil cepljen v industrijsko lagersko ječmenovko (opisano v poglavju 4.2) in je dovoljeval fermentacijo v šarži dokler niso bili porabljeni vsi fermentabilni sladkorji in dokler vsebnost diacetila ni padla pod 30 $\mu\text{g/l}$. Fermentacijska temperatura je bila kontrolirana na 15°C in hitrost razpršilnega plina je bila kontrolirana na enakem nivoju kot LCC290 fermentacija (hitrost ogljikovega dioksida na prazen presek je bila ~ 2.5 mm/s in ~ 0.4 mm/s zraka kar daje približno 3% kisika v celotnem razpršilnem plinu) (slika 6.69).

Ta začetna šaržna faza je omogočala kosmičenje (flokulacijo) kvasnih celic, ki so bile tako lažje zadržane v sistemu s plinskim vlekom. Na koncu šaržnega pogona je bila hitrost napajanja ječmenovke 2.16 l na uro, kar je ustrezalo zadrževalnemu času ~ 24 ur na osnovi delovnega volumna reaktorja 50 litrov. Kvasna populacija (slika 6.70) se je povečala na okoli 1 bilijon celic na mililiter in ostala na tem nivoju za samo okoli 1000 ur (med 500 in 1500 urami za kontinuirno fermentacijo). Kvasna populacija se je nenadoma podvojila pri ~ 1500 urah v fermentaciji in se je nato izravnala pri 2 bilijona celic/ml. Ta sprememba v kvasni populaciji je bila nepričakovana. Stopnja preživetja kvasa med potekom fermentacije je bila vzdrževana pri nad 90% (slika 6.70).

Slika 6.71 predstavlja podatke za koncentracijo etanola in specifično težo fermentacijske brozge med 3-mesečnim kontinuirnim potekom. Hitro po šaržnem zagonu (180 ur), se je koncentracija etanola izravnala pri 70 g/l in specifična teža je dosegla minimum pri ~ 2.2°P. Nenadno povišanje populacije kvasa, ki je bilo diskutirano zgoraj, se ni odražalo v padcu koncentracije etanola. Najbolj logična razlaga za to povišanje kvasne populacije je, da je večji del celotne kvasne populacije vstopil v fazo rasti, kar se je odrazilo na podvojeni koncentraciji kvasa. Padec etanolne koncentracije bi lahko pričakovano

sovpadal s povečanjem koncentracije kvasa, vendar se to nedvoumno ni zgodilo, ker je etanol ostal pri njegovi psevdo ravnotežni vrednosti 70 g/l med kontinuirnim procesom. Koncentracijski profili ogljikovih hidratov v odvisnosti od fermentacijskega časa (slika 6.72) so kazali na enak zaključek kot krivulje za etanol in specifično težo. Ta potek je dosegel psevdo ravnotežno stanje pri približno 250 urah med kontinuirno fermentacijo.

Slika 6.73 prikazuje koncentracijske krivulje za diacetil in 2,3-pentandion v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije. Kot rezultati za κ -karagenanski gel in LCC290 diketone, se je koncentracija diacetila in 2,3-pentandiona povečala po začetku šaržne faze do psevdo ravnotežne vrednosti $\sim 225 \mu\text{g/l}$ oz. $400 \mu\text{g/l}$.

Opis slik:

Slika 6.69 Obratovalni parameter za LCC3021 fermentacijo v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.70 Celotna koncentracija kvasnih celic in stopnja preživetja kvasa LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.71 Koncentracija etanola in specifična teža kvasa LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.72 Ogljikovohidratni profil kvasa LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

Slika 6.73 Koncentracija diketonov LCC3021 kontinuirne fermentacije v odvisnosti od časa fermentacije.

6.5.4 Primerjava različnih nosilcev

V poglavjih 6.5.1 do 6.5.3 so bile predstavljene fermentacijske lastnosti κ -karagenanskih gelnih kroglic, LCC290 superkosmičastega kvasa in LCC3021 srednje kosmičastega kvasa kot imobilizacijskih matrikov. Vsi trije nosilci so bili domnevno primerni za kontinuirno primarno fermentacijo v 50-l pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekom. 24 urni zadrževalni časi tekočine so bili doseženi v vseh treh primerih. Fermentacijski postopki z uporabo LCC290 superkosmičastega kvasa so dosegli psevdo ravnotežno stanje dosti hitreje kot LCC3021 srednje kosmičast kvas in κ -karagenanski imobilizirani celični sistemi. LCC290 fermentacija je dosegla maksimalno koncentracijo etanola 70 g/l pri približno 250 urah procesiranja. LCC3021 proces je dosegel ravnotežno

koncentracijo etanola 70 g/l pri ~ 600 urah. Med κ -karagenansko kontinuirno fermentacijo, se je koncentracija etanola izravnala pri dveh ločenih točkah med potekom procesa. Najprej je etanol dosegel koncentracijo 45 g/l med 200 in 500 urami in je nato narasel na 70 g/l pri približno 575 urah in ostal pri tej koncentraciji do konca poskusa.

Zdelo se je, da so trije fermentacijski sistemi dosegli maksimalno koncentracijo prostih kvasnih celic ~ 1 bilijon celic na mililiter. Nekonsistentnost kvasne koncentracije je negativno vplivala na produktivnost etanola v κ -karagenanskem sistemu (nižja začetna psevdo ravnotežna koncentracija etanola v primerjavi z LCC290 kvasnim sistemom). Kvasna koncentracija je dosegla vrh pri različnih časovnih intervalih v vsakem sistemu. Za proces LCC290 je etanol dosegel njegov maksimum med 500 in 1000 urami v kontinuirni fermentaciji, medtem ko je dosegla fermentacija LCC3021 maksimalno celično število med 1500 in 2000 urami v kontinuirnem procesu. κ -karagenanski imobiliziran sistem je dosegel maksimalno celično koncentracijo med 700 in 1000 urami kontinuirnega obratovanja.

Psevdo ravnotežne koncentracije diacetila in 2,3-pentandiona v treh vrstah imobilizirane celične fermentacije – LCC290 superkosmičast kvas, LCC3021 srednje kosmičast kvas in κ -karagenanski imobiliziran kvas – niso bile enake. Za LCC290 fermentacijo je diacetil dosegel koncentracijo 375 $\mu\text{g/l}$, medtem ko se je njegova koncentracija v LCC3021 fermentaciji izravnala pri približno 225 $\mu\text{g/l}$. V primeru κ -karagenanske fermentacije je koncentracija diacetila dosegla koncentracijo 500 $\mu\text{g/l}$ in je na polovici kontinuirnega postopka postopoma padla na približno 200 $\mu\text{g/l}$ v časovnem okviru 500 ur. Koncentracija 2,3-pentandiona je zrcalila koncentracijo diacetila v vseh treh procesih s koncentracijami 2,3-pentandiona višjimi od koncentracij diacetila med fermentacijami LCC290 in LCC3021. κ -karagenanski postopek je prikazoval različni vzorec, z vsebnostmi diacetila višjimi kot 2,3-pentandiona med njegovim prvim psevdo ravnotežnim stanjem po katerem je koncentracija diacetila padla pod koncentracijo 2,3-pentandiona. Podatki o koncentraciji za kvas in o proizvodnji etanola prav tako namigujejo, da sta bili doseženi dve ločeni in enkratni psevdo ravnotežni stanji med κ -karagenanskimi fermentacijami.

Naloga, da bi primerjali različne sisteme fermentacije in ocenili kateri sistem je boljši, lahko postane zelo kompleksna, ko vrednosti sistema temeljijo na več kot enem kriteriju. Na primer, če je merilo uspeha samo celotna koncentracija etanola, bi vsi trije sistemi šteli enako, ker je vseh primerih dosežena proizvodnja 70 g/l etanola na 50 l reaktorski volumen med 24 urnim zadrževalnim časom.

Proizvodnja prodajnega piva zahteva več kot samo enostavno proizvodnjo etanola. Predlagan fermentacijski sistem bi moral biti ocenjen na osnovi sposobnosti proizvodnje sprejemljivega piva (produktivnost etanola in vsebnost diacetila, med drugim), na osnovi potencialnih dodatnih stroškov za nosilec, na osnovi dostopnosti nosilca, na osnovi enostavnosti obratovanja sistema, na osnovi okoljskih dejavnikov, kot je odstranitev nosilca, na osnovi stabilnosti nosilca kot tudi na osnovi fleksibilnosti, ki jo daje nosilni sistem. Z namenom ocenjevanja takšnega večplastnega scenarija poslovni svet uporablja proces brezdimenzijske analize imenovan 'Balanced Scorecard' (Kaplan in Norton, 1996). Prva faza vključuje identifikacijo kriterijev na katere mora biti sistem ocenjen. Vsakemu kriteriju je nato dana ocena na skali od 1 do 5, kjer je 1 najmanj priljubljena in 5 najbolj priljubljena. Na koncu analize so seštete točke za vsako opcijo in alternativa z najvišjim številom točk je najboljše ocenjena glede na okoliščine.

Tabela 6.2 predstavlja rezultate analize Balanced Scorecard izvedene na imobilizacijskih nosilcih, ki so bili videni kot potencialne alternative za uporabo v 50-l pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom za fermentacijo. Skupaj 6 nosilcev - Chitopearl® - citosanske kroglice, Celite® - diatomarne zemeljske kroglice, Siran® - steklene kroglice, κ -karagenanske gelne kroglice, srednje kosmičast kvas LCC0321 in superkosmičast kvas LCC290 – je bilo ocenjenih glede na primarni kriterij proizvodnje prodajnega piva. Vsak sistem nosilca je bil ovrednoten s prej omenjeno skalo. Gledano v celoti, se je LCC290 superkosmičast kvas izkazal najboljše, kmalu mu je sledil srednje

kosmičast kvas LCC3021. Štirje drugi nosilci so prejeli ocene med 16 in 20. Tretja preferenca je bila dana κ -karagenanskemu sistemu, ker je bila prodajna tekočina proizvedena v pilotni enoti. To ocenjevanje nosilca odločno namiguje na to, da mora biti cilj nadaljnega razvoja kontinuirnih fermentacijskih sistemov, voden v smeri samoagregacije kot načina imobilizacije. Razpoložljivost (lahko dosegljiv), cena (nizka cena, ker ni potrebna nobena dodatna oprema za obratovanje), enostavnost obratovanja (v skladu z operacijami v obstoječem obratu) zagotovljena s takšno alternativo prevlada potencialno nestabilnost kvasnih kosmov (flokul) v mešanem sistemu. Mogoče je uporabiti strižno občutljivost samoagregacije za kontrolo velikosti flokul med fermentacijskim procesom, in mogoče je doseči povečan prenos snovi in tako nadaljnje povečanje bioreaktorske volumetrične produktivnosti.

Tabela 6.2 Primerjava številnih imobilizacijskih nosilcev za primarno fermentacijo piva v bioreaktorskem sistemu z notranjo zanko

	Chitopearl®	Celite®	Siran®	Karagenan	LCC3021	LCC290
Dobro pivo	3	1	1	4	5	4
Stroški	2	3	1	3	5	5
Razpoložljivost	1	5	5	2	5	5
Enostavnost obratovanja	3	1	1	3	4	5
Odstranjevanje/okoljsko	4	3	4	2	3	3
Stabilnost	4	1	1	3	2	3
Fleksibilnost	3	3	3	1	2	5
SKUPAJ	20	17	16	18	26	30

6.6 Proizvodnja severnoameriške vrste lagerskega piva z uporabo tehnologije z notranjo zanko in plinskim vlekom

Proizvodnja severnoameriške vrste lagerskega piva (angl. 'North American (NA) type lager beer') predstavlja številne izzive za pivovarja. NA vrsta lagerskih piv je značilna po svetli barvi in profilu okusa z nizko grenkobo, nizkimi preostalimi sladkorji (suho), brez dominantne arome in je zato relativno brez dolgotrajnega okusa. Zaradi teh naravnih lastnosti lahko pivovar prekrije zelo malo napak v aromi. Visoke vsebnosti diacetila

(maslen), acetaldehida (zeleno jabolko), žveplova odstopanja (sežgana guma, dihurjavost, gnila jajca, kuhana zelenjava) so najbolj pogosti problemi povezani z aromo, ki mučijo pivavorje današnjih dni. Čeprav lahko tudi bakterijska kontaminacija fermentacijskega medija povzroči ta odstopanja v aromi piva, daje neprimerna kontrola fermentacijskega procesa često višja odstopanja v aromi kot bi bilo pričakovati.

Med kontinuirnimi fermentacijskimi poskusi izvedenimi kot del te naloge, je bil nivo kontaminacije v obeh ječmenovki in fermentacijskih posodah kontroliran s prizadevnim izvajanjem aseptične tehnike. Fermentacijski poskusi s tremi vrstami nosilcev, ki so potekali nekaj mesecev, niso pokazali detektiranih vsebnosti kontaminacij (spremljano z metodo opisano v poglavju 4). Višje kot željene vsebnosti diacetila (cilj manj kot 30 µg/L)

in acetaldehida (cilj manj kot 10 mg/L) so obremenjevale produkte iz kontinuirnih primarnih fermentacij in te vsebnosti niso bile posledica bakterijske infekcije. Ta spoznanja se ne razlikujejo od tistih, ki so bila objavljena v literaturi (Pajunen s sodelavci, 2000; Kronlof s sodelavci, 2000). Belgijski pivovar je prevedel njihove visoke vsebnosti aldehida v pivo iz kontinuirnega fermentacijskega procesa v prodajno karakteristiko in tržil produkt kot ale pivo z jabolčno aromo (Andries s sodelavci, 1996b).

Visoke vsebnosti diacetila po primarni fermentaciji so prav tako normalne v pivovarski industriji. Nekateri pivovarji so prevzeli prakso imenovano 'breztemperaturna rast', ki sledi zaključku njihove primarne fermentacije z namenom zmanjšati vsebnost diacetila. Drugi so izbrali enostavno zadržanje njihovih produktov za daljše periode med procesom staranja, da bi tako zmanjšali vsebnost diketonov (diacetila in 2,3-pentandiona) do željenih vrednosti. V drugem primeru, so številne raziskovalne skupine razvile hitro tehnologijo staranja, ki je bila obravnavana v poglavju 2, da bi tako obvladali visoke vsebnosti diacetila. Čeprav je ta pot zelo učinkovita, daje celotnemu procesu izdelave piva dodatno stopnjo kompleksnosti, ki jo nekateri težko sprejmejo.

Ekonomija hitrega procesa staranja je dokaj čista, vendar bi bilo v teh zgodnjih dneh kontinuirnega obratovanja pivovarne industrije mogoče svetovati, da bi minimizirali tehnološko kompleksnost in tako zagotovili tranzicijo iz tradicionalne šaržne fermentacije v kontinuirno proizvodnjo. Iz teh razlogov je bilo odločeno, da bi proučevali uporabo šaržnega zadrževanja, ki ji sledi kontinuirna primarna fermentacija v 50-l pilotnih sistemih s plinskim vlekrom, da bi tako kontrolirali visoke vsebnosti diacetila v končanem pivu. Dodatni procesni korak ni bil predviden na začetku programa doktorskega dela, vendar ga je bilo potrebno izvesti, da bi tako primerjali piva proizvedena kontinuirno s pivi proizvedenimi v šaržnem procesu.

6.6.1 Uporaba šaržnega procesa, ki ji sledi kontinuirna primarna fermentacija

Kritičen parameter za določanje zaključka primarne fermentacije je vsebnost diacetila v dokončno fermentirani tekočini. Konverzija diacetilnega prekursorja, α -acetolaktata, v diacetil, je korak, ki določa hitrost diacetilne poti (slika 3.5). Prva reakcija je po naravi kemijska in je močno odvisna od temperature. Če 'zeleno' pivo 'vstopi' v hladen proces staranja preden se zgodi kemijska pretvorba α -acetolaktata v diacetil, ima morda nastalo pivo vsebnost diacetila nad pragom okusa 20 $\mu\text{g/l}$, razen če so uporabljene podaljšane časovne periode, ki omogočajo, da se zgodi počasna pretvorba prekursorja. V vseh treh

kontinuirnih fermentacijah opisanih v poglavju 6.5, je vsebnost diacetila, ki zapušča reaktor, nad željeno ciljno vrednostjo 30 $\mu\text{g/l}$ v nerazredčenem pivu. Če je bila tekočina v tej fazi filtrirana, da bi bil tako odstranjen kvas, bi diacetil ostal visok. Zato je bila uporabljena topla šaržna perioda, da bi se tako vsebnost diacetila znižala pod sprejemljivo limitno vrednost.

Kontinuirno fermentirano pivo je bilo zbrano in zadržano v 40-l posodah za pivo iz nerjavečega jekla pri 21°C. Majhni vzorci (100 ml) so bili redno odvzeti iz tekočine in analizirani na vsebnost diacetila, etanola, specifično težo, estre in 'fuzilne' alkohole. Slika 6.74 kaže redukcijo diacetila v odvisnosti od toplega zadrževalnega časa v šarži za pivo, ki je bilo kontinuirno fermentirano z LCC290 kvasom kot imobilizacijskim matriksom. Topla zadrževalna perioda je bila učinkovita pri zmanjšanju vsebnosti diacetila od ~600 $\mu\text{g/l}$ do pod 30 $\mu\text{g/l}$, kar je v pivovarni industriji smatrano kot limitna vrednost 'pre-drop limit'.

V drugem testu je bil proučevan učinek mešanja na zmanjšanje diacetila med zadrževalno periodo. Razpršilni plin ogljikov dioksid (0.14 m³/h) je bil uveden skozi 1.27 cm cevko iz nerjavečega jekla na dno zbirne posode za pivo, da bi tako tekočina ostala mešana med zadrževalno periodo. Slika 6.75 predstavlja rezultate tega eksperimenta. Zdi se, da je imelo mešanje, ki je bilo povzročeno z razprševanjem CO₂, zelo malo vpliva na hitrost redukcije diacetila v tem drugem zadrževalnem rezervoarju. Ta rezultat lahko namiguje na neustrezno mešanje, ki je posledica mešalnega plina CO₂ in zato na nepovečanje reakcijske hitrosti 1. kemijske reakcije (pretvorba α -acetolaktata v diacetil) ali nepovečanje hitrosti snovnega prenosa 2. reakcije, da bi le ta potekala hitreje (pretvorba diacetila v acetoin s kvasom). Mogoče bi bilo tudi, da je imela nemešana posoda dovolj celic v suspenziji, da bi nadalje prišlo do redukcije diacetila v aromatsko neaktiven acetoin, ko je potekla kemijska pretvorba (1.korak), ki določa hitrost sistema.

Učinki tega toplega zadrževanja v šarži, ki ji sledi kontinuirna primarna fermentacija na koncentracije estrov in 'fuzilnih' alkoholov in na koncentracijo etanola in specifično težo tekočine, so predstavljeni na slikah 6.76 oz. 6.77. Iz teh rezultatov se zdi, da je imela topla zadrževalna perioda majhen učinek na koncentracije acetaldehida, etil acetata, propanola, izobutanola, izoamil alkohola in izoamil acetata (slika 6.76). Specifična teža tekočine v zadrževalni posodi se je znižala od 2.7°P na 2.0°P v prvih 12 urah zadrževalne periode in se je nato izravnala pri tej nizki vrednosti. Koncentracija etanola je bila konstantno 70 mg/l med 65-urno testno periodo. Ti rezultati nakazujejo, da bi zadrževalna perioda primarno

vplivala na koncentracijo diacetila in 2,3-pentandiona, medtem ko bi bil vpliv na estre, 'fuzilne' alkohole in etanol minimalen.

Opis slik:

Slika 6.74 Koncentracija diketonov v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

Slika 6.75 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom. En vzorec je bil mešan z razpršenim ogljikovim dioksidom, medtem ko je drugi vzorec ostal statičen (nemešan).

Slika 6.76 Koncentracije estra in 'fuzilnega' alkohola v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

Slika 6.77 Koncentracija etanola in specifična teža v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290 v sistemu s plinskim vlekom.

Zadrževalni protokol v šarži je potekal na tekočini, ki je bila proizvedena med kontinuirnimi fermentacijami v 50-l bioreaktorju s plinskim vlekom z uporabo LCC290 superkosmičastega kvasa, LCC3021 srednje kosmičastega kvasa ali κ -karagenanskega imobiliziranega kvasa. Profili redukcije diacetila teh treh testnih postopkov so predstavljeni na sliki 6.78. Diacetil je bil uspešno znižan na njegovo ciljno vrednost 30 $\mu\text{g/l}$ v vseh treh primerih. Čas, ki je bil potreben za dosego tega znižanja, se je v teh treh primerih spreminjal. V primeru LCC290, je bila redukcija iz 600 $\mu\text{g/l}$ na 30 $\mu\text{g/l}$ dosežena v približno 48 urah, medtem ko je LCC3021 fermentacija in κ -karagenanska fermentacija zahtevala samo ~24 ur in ~40 ur, da bi bil dosežen ta cilj. Domnevano je bilo, da je to odstopanje povezano z začetno vrednostjo diacetila in ne z vrsto uporabljenega imobilizacijskega matriksa.

Slika 6.79 prikazuje enake diacetilne rezultate kot slika 6.78 s prilagoditvijo časa na rezultate iz LCC3021 in κ -karagenanske fermentacije. Originalne diacetilne redukcijske krivulje iz zadnjih dveh fermentacij so bile premaknjene tako, da so njihove začetne vrednosti padle na diacetilno redukcijsko krivuljo LCC290 superkosmičastega kvasa. S to transformacijo se zdi, da je redukcijski profil za vse tri sisteme padel na enako linijo. Z

uporabo TableCurve2D software-a, so bili ti rezultati prilagojeni na kinetično enačbo prvega reda (Levenspiel, 1972) (slika 6.80). Izračunano je bilo, da so bili prilagojeni eksperimentalni podatki iz slike 6.79 v skladu z naslednjo enačbo:

$$[\text{Diacetil}] = 648.54 e^{(-0.0426t)} \quad (6.1)$$

s korelacijskim koeficientom 0.96. Ta rezultat močno podpira teorijo, da kažejo vsi trije imobilizacijski sistemi enak diacetilni redukcijski potencial. Ti rezultati ne bi smeli biti presenetljivi, ker je redukcija diacetila pogosto vezana na celice kvasa (Nakatani s sodelavci, 1984). κ -karagenanski sistem je imobiliziral LCC3021 kvas v njegovo gelno strukturo in LCC290 kvas je bil izbran kot različica LCC3021 vrste.

Ko je bila vsebnost diacetila pod ciljnim nivojem $30\mu\text{g/l}$, so bila nastala piva starana v hladnem (2°C) za 7 dni pred potekom končne priprave produkta (filtracija, redčenje, karbonacija in pakiranje). Tabela 6.3 povzema analizo piv proizvedenih v 50-l pilotnih sistemih z ali LCC290 kvasom, LCC3021 kvasom ali κ -karagenansko imobiliziranim kvasom kot imobilizacijsko matriko. Slika 6.81 je radarska slika estrov in 'fuzilnih' alkoholov treh piv proizvedenih kontinuirano in enega kontrolnega piva proizvedenega industrijsko v šarži. V primerjavi z industrijsko proizvedeno šaržno tekočino (kontrola), so imele kontinuirne tekočine nižje estre (etil acetat, izoamil acetat) in višji propanol in nižji izobutanol, primarni amil alkohol in izoamil alkohol. Vsebnosti acetaldehidov v kontinuirnih fermentacijskih produktih so bile višje kot v kontrolni tekočini. Nivo penjenja, začetna hladna motnost, topla motnost, dimetil sulfid, žveplov dioksid, ogljikov dioksid in vsebnost zraka so bili znotraj specifikacij.

Opis slik:

Slika 6.78 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290, kvasom LCC3021 in karagenansko gelno imobiliziranim kvasom v sistemu s plinskim vlekem.

Slika 6.79 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290, kvasom LCC3021 in karagenansko gelno imobiliziranim kvasom v sistemu s plinskim vlekem. Vrednosti za LCC3021 fermentacijo in karagenansko fermentacijo so bile časovno prilagojene tako, da so imele enako začetno točko kot LCC290 fermentacija.

Slika 6.80 Koncentracija diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentaciji s kvasom LCC290, kvasom LCC3021 in karagenansko gelno imobiliziranim kvasom v sistemu s plinskim vlekom. Vrednosti za LCC3021 fermentacijo in karagenansko fermentacijo so bile časovno prilagojene tako, da so imele enako začetno točko kot LCC290 fermentacija.

Številni drugi parametri (navidezni ekstrakt, dejanski ekstrakt, izračunan originalni ekstrakt, barva in grenkoba), ki so bili močno afektirani z redčenjem produkta od njegove prvotne koncentracije etanola do končne vrednosti 5.0 % v/v, so bili drugačni od kontrolnih, ker so kontinuirni produkti zahtevali višje redčenje z vodo, da bi dosegli željeno vrednost etanola zaradi višjih prvotnih koncentracij etanola (70 g/l vs. 60 g/l v šarži). Slika 6.82 je radarska slika alkohola, diacetila, pH, barve in grenkobe enakih tekočin, kot so bile opisane zgoraj. Vsebnosti alkohola, diacetila in pH so znotraj željenih, medtem ko sta barva in grenkoba izven specifikacij. 'Nižja' barva je povezana z večjim redčenjem kateremu so bile izpostavljene kontinuirne tekočine in to je lahko izravnano s 'povečanjem' barve v dotoku hranljiv ječmenovke. Vrednosti grenkobe so prav tako izpostavljene enaki redčevalni napaki in bila bi prav tako izravnanana z dotokom ječmenovke.

Tabela 6.3 Povzetek analiz na pivih proizvedenih v sistemu s plinskim vlekom.

Opis	Industrijsko šaržno fermentirana tekočina	LCC290 kontinuirano fermentirana tekočina	LCC3021 kontinuirano fermentirana tekočina	Karagenanska kontinuirano fermentirana tekočina
Zrak (mL)	< 1	0.40	0.35	0.35
Ogljikov dioksid (%)	2.75	2.90	2.81	2.73
Žveplov dioksid (mg/l)	< 10	0	0	0
Dimetil sulfid (μg/l)	< 70	59	30	30
Grenkoba (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
Diacetil (μg/l)	< 20	12	12	9
Alkohol (% v/v)	5.00	4.99	5.03	5.04
Alkohol (% m/v)	3.93	3.93	3.96	3.96
Navidezni ekstrakt (°P)	1.55	1.02	1.40	1.44
Dejanski ekstrakt (°P)	3.36	2.84	3.24	3.27
Izračunan originalni ekstrakt (°P)	11.0	10.5	11.0	11.0
Topla motnost (FTU)	< 200	45	50	47
Začetna hladna motnost (FTU)	< 100	43	51	54
Pena (s)	> 170	167	187	175
Acetaldehid (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
Etil acetat (mg/l)	32.4±4.3	11.0	10.6	8.7
Izobutanol (mg/l)	21.6±3.4	10.6	8.3	8.9
Primarni amil alkohol (mg/l)	20.0±2.3	15.2	9.4	6.4
Izoamil alkohol (mg/l)	60.9±8.6	48.0	40.9	46.5
Izoamil acetat (mg/l)	2.5±0.7	0.32	0.25	0.18

Opis slik:

Slika 6.81 Radarska slika piv fermentiranih kontinuirno v sistemu s plinskim vlekom z uporabo ali LCC290 kvasa, LCC3021 kvasa ali LCC3021 kvasa imobiliziranega v karagenskih gelnih kroglicah. Estri in 'fuzilni' alkoholi končanih piv so predstavljeni na tem grafu. Vsi produkti so bili izpostavljeni zadrževalnemu času v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentacijski fazi.

Slika 6.82 Radarska slika piv fermentiranih kontinuirno v sistemu s plinskim vlekom z uporabo ali LCC290 kvasa, LCC3021 kvasa ali LCC3021 kvasa imobiliziranega v karagenskih gelnih kroglicah. Estri in 'fuzilni' alkoholi končanih piv so predstavljeni na tem grafu. Vsi produkti so bili izpostavljeni zadrževalnemu času v toplem šaržnem sistemu po kontinuirni primarni fermentacijski fazi.

6.6.2 Izbira najboljšega razpršilnega plina

Ogljikov dioksid je lahko dosegljiv v večini pivovarn, ker je naravni stranski produkt fermentacije kvasa. Pivovarne zbirajo nastal CO_2 in nato čistijo plinski tok, da bi odstranili neznatne nečistoče, ki bi lahko bile prenešene v zbirni tok (tipično žveplove spojine). Tak očiščen tok je nato stisnjen in shranjen kot tekočina za nadaljnjo uporabo v pivovarni (99.95% čistosti). Uporaba ogljikovega dioksida kot razpršilnega plina v kontinuirni fermentaciji se zdi logična izbira iz obratovalnega vidika. Obrat bi bil sposoben uporabljati njihov zbiralni sistem in nazaj dobaviti CO_2 , ki izhaja iz kontinuirnega fermentorja. Uporaba drugih plinov bi samo dodala dodatno stopnjo kompleksnosti k obstoječim operacijam obrata.

Kakorkoli, da bi kontinuirna fermentacija postala realna alternativa obstoječim šaržnim operacijam, je potrebno proizvesti produkt, ki je blizu obstoječim vrstam. Verjeti je, da je mogoče z minimiranjem bioloških/biokemijskih vplivov, katerim je izpostavljen kvas med kontinuirno fermentacijo, doseči takšno produktno ujemanje. Ogljikov dioksid je znan kot plin, ki negativno vpliva na metabolizem kvasa med primarno fermentacijo. Ta učinek je še povečan v visokih cilindrokoničnih posodah, kjer tlak v vrhu sistema preprečuje prosto sproščanje CO_2 iz tekočega medija. Ti pogoji vodijo do proizvodnje piv z nižjimi estri in višjimi 'fuzilnimi' alkoholi. Uspešni poskusi so bili izvedeni za odstranitev nekaj tega CO_2 iz fermentacije s periodičnim vbrizgavanjem pomožnega toka plina na dno cilindrokonične

posode. Učinki CO₂ zadrževanja so bili zmanjšani z nastalimi produkti, ki vsebujejo manj fuzilnih alkoholov in višje vsebnosti estrov.

Na osnovi tega znanja je bila proučevana uporaba dušikovega plina namesto ogljikovega dioksida kot razpršilnega plina v sistemu s plinskim vlekcom. Številne tekočine fermentirane v 50-l reaktorjih s plinskim vlekcom, so bile zbrane in obdelane v eksperimentalni pivnici Labatt Experimental Brewery po naslednjih korakih. Po 14 urah zbiranja tekočine iz reaktorja (24 urni zadrževalni čas) je bilo iz kvasa dekantirano 'zeleno pivo'. Ta tekočina je bila nato izpostavljena 48 urni zadrževalni periodi pri sobni temperaturi (21°C), ki je omogočala obema diacetilu in acetaldehidu dosego Labatt specifikacij (diacetil < 30 µg/l in acetaldehid < 10 µg/l). Ta tekočina je bila nato starana v hladnem tokom 7 dni in nato obdelana v skladu s standardno industrijsko prakso.

Tabela 6.4 primerja rezultate končanih piv dobljenih iz kontinuirne fermentacije z LCC290 kvasom s CO₂ in N₂ razpršilnima sistemoma s standardno industrijsko proizvedeno tekočino (kontrolno). Z dušikom prepihana tekočina je favorizirana v primerjavi z industrijsko proizvedeno tekočino. Analize so pokazale, da je bilo v primeru z dušikom prepihane tekočine dvakrat več 1-propanola v tekočini, medtem ko je bila koncentracija dimetil sulfida približno trikrat nižja. Oboje, vrednosti barve in grenkobe so bile višje kot v industrijski tekočini, kot tudi sposobnost penjenja merjena z NIBEM testom. S CO₂ prepihano pivo je vsebovalo nižje estre (etil acetat, izoamil acetat) in višji 1-propanol kot je bilo to v primeru s dušikom prepihane tekočine. Razmerja estrov (etil acetat, izoamil acetat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat) do 'fuzilnih' alkoholov (1-propanol, izobutanol, izoamil alkohol) so bila izračunana za kontrolno tekočino, z dušikom prepihano tekočino in s CO₂ prepihano tekočino in so bila 0.30 oz. 0.27 oz. 0.15.

Tabela 6.4 Povzetek kemijskih analiz za številne produkte fermentirane kontinuirno z uporabo sistema s plinskim vlekom napolnjenega z LCC290 superkosmičastim kvasom.

Analiza	Industrijsko šaržno fermentirana tekočina	Z dušikom prepihana kontinuirno fermentirana tekočina	S CO ₂ prepihana kontinuirno fermentirana tekočina
Acetaldehid (mg/l)	2.53	3.68	4.80
Etil acetat (mg/l)	28.08	30.90	14.14
1-propanol (mg/l)	13.03	28.45	40.03
Izobutanol (mg/l)	17.15	17.89	7.01
Izoamil acetat (mg/l)	2.57	2.06	0.69
Izoamil alkohol (mg/l)	74.54	78.45	51.35
Etil heksanoat (mg/l)	0.140	0.180	0.074
Etil oktanoat (mg/l)	0.110	0.280	0.059
Etil dekanat (mg/l)	0.0079	0.0630	0.0081
Diacetil (µg/L)	6	9	10
2,3-pentandion (µg/L)	4	5	14
Žveplov dioksid (mg/l)	1.3	1	0
Dimetil sulfid (mg/l)	79	24	64
Grenkoba (BU)	11.5	20.6	15.5
Barva (SRM)	3.1	4.1	3.7
Pena (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

Slika 6.83 je radarska slika, ki predstavlja koncentracije estrov, 'fuzilnih' alkoholov in acetaldehida za tri tekočine. Profil z dušikom prepihane tekočine zelo blizu sledi profilu kontrolnega piva razen za višje vsebnosti propanola. S CO₂ prepihana fermentacija je pokazala mnogo nižje estre in 'fuzilne' alkohole, ki se niso ujemali s kontrolnim vzorcem. V obeh kontinuirnih fermentacijskih tekočinah, so bile vsebnosti diacetila in acetaldehida pod vsebnostmi specifikacij Labatt-a.

Odkritja so pokazala, da je razpršen dušik povečal proizvodnjo estrov na vsebnosti podobne komercialnim pivom, medtem ko je razpršen ogljikov dioksid proizvedel tekočine z relativno nižjimi koncentracijami estrov. Ti rezultati namigujejo na spremenjen metabolizem kvasa v s CO₂ prepihanem okolju. Vsebnosti propanola, ne glede na razpršilni plin, so bile precej višje v kontinuirno fermentiranih pivih kot tiste izmerjene v industrijsko fermentiranih kontrolnih pivih. Čeprav so koncentracije propanoma močno pod pragom zaznave okusa 100 mg/l, bi lahko bile opažene razlike pokazatelj nekoliko spremenjenega metabolizma, ki se zgodi v primeru kontinuirne fermentacije v primerjavi s šaržno fermentacijo. Prav tako je mogoče, da so višje vsebnosti propanola posledica kontinuirnega dovajanja amino kisline treonina, ki bo po oksi-kislinski razgradni poti dal propanol.

Opis slik:

Slika 6.83 Radarski graf, ki primerja estre in 'fuzilne' alkohole z dušikom prepihane in s CO₂ prepihane kontinuirne s plinskim vlekom fermentacijske tekočine z industrijsko proizvedeno tekočino.

POGLAVJE 7.0 ZAKLJUČKI

Na osnovi raziskave izvedene skozi to nalogo je mogoče potegniti naslednje zaključke. Sprejemljivo pivo brez večjih pomanjkljivosti v aromi je lahko proizvedeno z uporabo 50-l pilotnega bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom kot kontinuirnim primarnim fermentorjem, ko le temu sledi 2-dnevno zadrževanje v šarži za kontrolo diacetila. Minimalni zadrževalni čas 24 ur ali 1 zamenjavo reaktorskega volumna na dan je mogoče doseči za fermentacijo z visoko težo ječmenovke (17.4°P) v končno fermentirano brozgo (2.5°P). Superkosmičast kvas LCC290, srednje kosmičast kvas LCC3021 in κ -karagenansko imobiliziran kvas so vsi učinkoviti nosilci v sistemu s plinskim vlekom. Uporaba težjih vnaprej pripravljenih nosilcev, kot sta Siran® steklene kroglice in Celite® diatomarne zemeljske kroglice, niso praktične alternative sistemu z notranjo zanko in plinskim vlekom. Minimalno 2 meseca kontinuirnega obratovanja v primeru κ -karagenanskih gelnih kroglic in minimalno 3 mesece kontinuirnega obratovanja v primeru LCC290 in LCC3021 fermentacij je mogoče brez zaznave kakšnihkoli mikrobnih kontaminacij ali nestabilnosti v obratovanju reaktorja. Nadalje, kontinuirni sistem je bil

sposoben obratovalnega potenciala in predpostavljenih odstopanj v napajanju industrijske ječmenovke med razširjenimi obratovalnimi periodami.

Kontinuirna fermentacija z uporabo superkosmičastega kvasa LCC290 z dušikom kot razpršilnim plinom, ki ji je sledilo 2-dnevno šaržno zadrževanje, je dajala najboljše ujemanje arome z industrijskim kontrolnim pivom. Dvodnevno šaržno zadrževanje zamišljeno za uravnavanje visokih koncentracij diacetila v iztočni tekočini kontinuirnega primarnega fermentorja je bil učinkovit, čeprav ne optimalen kontrolni mehanizem. Diacetilna redukcijska kapaciteta treh testiranih kontinuirnih fermentacijskih sistemov je bila zelo podobna, in kot je bilo vnaprej predvideno, bi lahko to pripisali vrsti sistema. Zadrževalna šaržna perioda ni vplivala na koncentracije estrov in 'fuzilnih' alkoholov v pivu med zadrževalno fazo.

Uporabljen 3% kisika v razpršilnem plinu je zagotavljalo primerne vsebnosti kisikovega nutrienta v ječmenovki, kar je vodilo do vzdrževanja žive populacije kvasa (nad 90%) med fermentacijskimi procesi pri proizvodnji piv s sprejemljivim aromatskim profilom. Kontinuirne fermentacije z uporabo LCC290 kvasa in LCC3021 kvasa kot imobilizacijskih matrikov so dosegle psevdo ravnotežno stanje hitreje kot κ -karagenanski gelni kroglični

sistem. Nestabilnost κ -karagenanskih imobiliziranih fermentacij, ki verjetno izhaja iz povečanja v imobilizirani populaciji kvasa, je povzročila fermentacijo produkta pod željenimi nivoji. Za idealno kontinuirno proizvodnjo je ta fenomen zelo nezaželen, ker podaljšan pričetek poveča čas, ki je potreben za reakcijo in ponovni pričetek, ki mu sledi katastrofalna napaka. Daljša začetna faza bo prav tako zahtevala daljši potek kontinuirne faze, da bi tako postala zanimiva.

Kontinuirni proces izdelave gelnih kroglic je proizvedel zahtevane količine kroglic za testiranje znotraj pilotnih enot. Potrebno je kakorkoli nadalje optimizirati proizvodni proces kroglic, da bi tako proizvedli kroglice z ožjo velikostno porazdelitvijo. Proces prav tako zahteva nadaljno preiskavo za določanje njegove primernosti na industrijskem nivoju. Raje kot tip Kenics preiskovan v tej raziskavi, je potrebno najti in testirati novo vrsto statičnega mešala za katero je mogoče nadgradnjo izvesti s povečanjem premera namesto samo s povečanjem števila statičnih mešal, da bi tako takšen izbor postal realnost.

Kislinska pulzna zasledovalna tehnika uporabljena v tej tezi je omogočala določiti čas pomešanja in hitrost obkroženja fluida v 50-l pilotnem bioreaktorju med dejanskimi fermentacijami, ki vključujejo LCC290 superkosmičast kvas, LCC3021 srednje kosmičast

kvass, in κ -karagenanski imobiliziran kvas. Mešalni podatki so se ujemali s padajočo sinusoidno funkcijo iz katere sta bila izračunana čas pomešanja in hitrost obkroženja fluida. Hitro mešanje je potekalo znotraj sistema z notranjo zanko in plinskim vlekom s časi mešanja izračunanimi pri manj kot 200 sekundah za vse tri vrste imobilizacijske nosilcev. Čas pomešanja se je nekoliko znižal s povišanjem hitrosti plina na prazen presek v vseh treh testiranih scenarijih. Pri vseh testiranih hitrostih plina na prazen presek (2 mm/s do 6 mm/s) je sistem LCC290 pokazal najhitrejši čas pomešanja (med 100 s in 120 s). Časi obkroženja fluida so bili zelo podobni za vse tri vrste nosilcev ne glede na hitrost plina na prazen presek. Tudi ti so padali linearno z ustreznim naraščanjem plinske hitrosti. Kompletno mešanje tekočine (98% odziv na pulz) se je zgodilo znotraj treh do šestih reaktorskih krožilnih ciklusih za vse testirane imobilizacijske nosilce. Ti rezultati so potrdili, da je testiran 50-l pilotni sistem preskrbljen z ustreznim mešanjem za kontinuirno fermentacijo. Čisti časi pomešanja bi lahko namigovali na možne mrtve cone in to bi bilo neželjeno za fermentacijo piva.

To doktorsko delo je natančno prikazalo možnost nadaljnje izgradnje načrtovanega produkcijskega sistema, zgrajenega in obratovanega v Labatt Experimental Brewery. Kot

izbran sistem je priporočena uporaba bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom z LCC290 superkosmičastim kvasom in dušikom kot razpršilnim plinom, ki ji sledi 2-dnevno šaržno zadrževanje pri 21°C.

Podroben opis – 2. del

Poglavje 4. MATERIALI IN METODE

4.1 Čisti kvas in značilnosti

Lagerska pivovarniška čista kultura kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, Labatt Culture Collection (LCC) 3021, je bila uporabljena v tem delu. *Saccharomyces cerevisiae* je sinonim za *Saccharomyces uvarum* Beijerinck var. *Carlsbergensis* Kudryavtsev, 1960 (Kurtzman, 1998). Pri 37°C LCC3021 ne bo rasla. To pomaga razlikovati LCC3021 lagersko kvasovko od večine ale kvasovk, ki bodo rasle pri 37°C in pri višjih temperaturah. LCC3021 je kvas, ki fermentira pri dnu, kot večina lagerskih kvasov, vendar so tukaj tudi izjeme. Nadalje, ta kultura bo fermentirala glukozo, galaktozo, sukrozo, maltozo, rafinozo

in melibiozo, vendar ne škrobov. Sposobnost fermentacije melibioze je orodje, ki ga uporabljajo taksonomisti za njeno ločevanje od ale kvasovk.

Kot v primeru večine pivovarniških čistih kultur, je LCC3021 poliploid in se razmnožuje z mitotsko delitvijo. Pod normalnimi pivovarniški pogoji se lagerske kvasovke ne razmnožujejo z meiozo. To ima prednost pri izdelavi pivovarniških čistih kultur, ki so genetsko stabilne, ker je prehod faktorja na drugi kromosom (angl. 'crossover') genetskega materiala manj verjeten (Kreger-van Rij, 1984).

4.2 Priprava inokuluma kvasovke

Kultura kvasovke je bila vzeta iz kivete kriogenično shranjene v zmrzovalniku pri -80°C in nanešena na gojišče peptonski agar Peptone Yeast Extract Nutrient (PYN) (pepton, 3.5 g/l; ekstrakt kvasovk, 3.0 g/l; KH_2PO_4 , 2.0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/l; glukoza, 20.0 g/l; agar, 20.0 g/l v dH_2O), da bi tako dobili dobro ločene kolonije. Sterilna zanka (angl. 'sterile loop') sestavljena iz več kolonij je bila odvzeta iz 3-4 dni stare plošče rastočega kvasa, in te kolonije so bile inokulirane v 10 ml volumna ječmenovke v testni cevi. Sledila je rast pri 21°C čez noč, iz tega sledi termin 'overnight culture', nato pa je bila

zmes dodana k večjemu volumnu ječmenovke, ponavadi 200 ml, da bi tako porasla biomasa kvasa. V naslednjih dneh je bila ta zmes dodana naslednjemu večjemu volumnu ječmenovke, in tako dalje, dokler ni bila razmnožena željena količina biomase kvasa. Na splošno bi nekdo pričakoval proizvodnjo približno 20 g lagerskega kvasa na liter ječmenovke. Za pripravo inokulacije kvasovk, je bila kultura centrifugirana pri 4°C in 1.0×10^4 obratov na minuto (polmer = 0.06 m) za 10 minut. Po centrifugiranju je bila tekočina dekantirana in značilna mokra teža kvasa je bila dobljena iz kroglice za cepljenje.

4.3 Fermentacijski medij ječmenovke

Labatt Breweries iz Kanade je dobavil pivovarsko ječmenovko s specifično težo 17.5°P . Koncentracija fermentabilnih ogljikovih hidratov, specifična teža in prosti amino dušik v pivovarski ječmenovki uporabljeni za fermentacije v tem delu so podane v dodatku A2.1. Dodatno razlago o sestavi ječmenovke je podal Dale s sodelavci, 1986, Hoekstra, 1975, Hough s sodelavci, 1982, Kloppe, 1974 in Taylor, 1989.

Šaržne fermentacije: Ječmenovka je bila segrevana v avtoklavu za 45 minut pri 100°C in nato ohlajena pred inokulacijo z imobiliziranimi celičnimi kroglicami ali prosto suspendiranim kvasom.

Kontinuirne fermentacije: Ječmenovka uporabljena za kontinuirne fermentacije je bila hitro pasterizirana (Fisher Plate Heat Exchanger, combi-flow Type Eurocal 5FH) pred polnjenjem v bioreaktor s plinskim vlekem in ta ječmenovka je bila redno kontrolirana na mikrobiološke onesnaževalce, kot je opisano v poglavju 4.6. Če je bila onesnaženost detektirana v ječmenovki, je bila le ta takoj izpraznjena in nova ječmenovka je bila zbrana iz obrata.

Hitro pasteriziranje je bilo izvajano pri volumski pretočni hitrosti 0.8 m³/h. Enota je imela cevasto zadrževalno sekcijo kjer je bila ječmenovka zadrževana pri povprečni temperaturi 85°C z minimalno temperaturo 80°C. Volumen zadrževalne sekcije je bil 1.13 x 10⁻²m³, ki je dajal zadrževalni čas v zadrževalni sekciji 51 sekund. Po koraku segrevanja je bila ječmenovka hitro ohlajena na temperaturo 2°C na obstoječi enoti.

4.4 Imobilizacijska metodologija

Kapa-karagenanski gel X-0909 je bilo darilo Copenhagen Pectin A/S. Kapa-karagenanske gelne kroglice, ki so vsebovale celice omreženega lagerskega kvasa, so bile proizvedene z

uporabo statičnega procesa mešanja, kot ga je podrobno opisal Neufeld s sodelavci (1996) z začetno celično koncentracijo 10⁷-10⁸ celic/ml gela, ki je bila določena za vsak eksperiment. Kot je prikazano na SL. 15, statični proces mešanja temelji na tvorbi emulzije med ne-vodnokontinuirno fazo, rastlinskim oljem (Mazola Corn Oil) in vodno disperzno fazo, kapa-karagenansko (3% m/v) v KCl (0.2% m/v) raztopino, inokulirano s kvasom, ob uporabi 'in-line' poliacetalnih statičnih mikserjev (Cole-Palmer Instrument Co., ZDA). V področju segrevanja na shemi, kjer je bil kvas hitro mešan s karagenansko raztopino in kjer je nastala emulzija, je bila temperatura 37°C. Geliranje kapa-karagenanskih kapljic v emulziji je bilo povzročeno s hitrim ohlajanjem v ledeni kopeli in kasnejšim otrjevanjem v kopeli kalijevega klorida (22 g/l). Statični mikser s 24 elementi premera 6.4 mm je bil uporabljen za ustvarjanje zmesi kvasa in karagenana. Drugi mikser s 42 elementi s premerom 12.7 mm je bil uporabljen za tvorbo emulzije. Kroglice uporabljene za eksperimentalno delo so bile 0.5 mm < (premer kroglice) < 2.0 mm.

4.5 Skupna porazdelitev velikosti delcev kapa-karagenanskih gelnih kroglic

Vsebnost imobiliziranih celic kvasa

Kapa-karagenanske gelne kroglice so bile naključno vzorčene iz 30-l proizvodnje gelnih kroglic, da bi tako lahko izračunali porazdelitev velikosti delcev na osnovi mokre teže. Vsak vzorec je imel približno 500 g mokre teže. Presejanje je bilo uporabljeno z namenom določitve velikostne porazdelitve kroglic. Kroglice so padale skozi vrsto sit z velikostjo luknjic 2.0, 1.7, 1.4, 1.18, 1.0 in 0.5 mm. 4.5l volumen 22 g/l KCl raztopine je bil uporabljen za sejanje vsakega vzorca kroglic. Predpostavljeno je bilo, da so kapa-karagenanske gelne kroglice perfektno sferične, tako da je bil premer luknjice v situ upoštevan kot premer delca. Prav tako je bilo predpostavljeno, da je bila gostota kroglic uniformna in neodvisna od velikosti delca.

4.6 Štetje kvasnih celic in sposobnost za preživetje

Sposobnost za preživetje prosto suspendiranega kvasa in celična koncentracija:

Mednarodno priznana metilensko modra barvalna tehnika American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee ASBC, 1992) je bila uporabljena za merjenje sposobnosti za preživetje celic kvasovk. Obarvan madež je merilo za to, ali je populacija kvasa sposobna preživetja ali ne na osnovi sposobnosti živih celic, da bi oksidirale barvilo v njegovo nebarvno obliko. Nežive celice nimajo sposobnosti oksidirati barvila in zato ostane modro. Fink-Kuhles pufrano metilensko modro je bilo pripravljeno z mešanjem 500 ml raztopine A (0.1 g metilensko modro/ 500 ml dH₂O) s 500 ml raztopine B (498.65 ml 13.6 g KH₂PO₄/500 ml dH₂O pomešane z 1.25 ml 2.5 g Na₂HPO₄·12H₂O/100 ml dH₂O), da bi tako dobili končno pufrano metilensko modro raztopino s pH 4.6.

Razredčena raztopina kvasa je bila pomešana z raztopino metilensko modre v testni cevi do suspenzije približno 100 celic kvasovk v mikroskopskem polju. Majhna kapljica dobro premešane suspenzije je bila nanešena na mikroskopsko steklo in pokrita s pokrivalnim stekelcem. Po eni do petih minut kontaktiranja z barvilom so bile celice, ki so se obarvale modro in celice, ki so ostale neobarvane, preštete. Procent živih celic je bil izražen kot procent celotnega števila prešteti celic. Celična koncentracija je bila določena z uporabo svetlobnega mikroskopa in hemacitometra (Hauser Scientific Company).

Sposobnost za preživetje imobiliziranih celic in celična koncentracija: Gelne kroglice so bile ločene iz fermentirajoče tekočine s prehodom zmesi skozi sterilno sito (velikost por 500 μm) in sprane z 10 ml destilirane vode. Gelne kroglice, 1 ml, ki vsebujejo omrežen kvas, so bile dodane v sterilno 50 ml vzorčno posodo, ki vsebuje 19 ml destilirane vode. Kroglice so bile nato razbite z uporabo Polytron® (Brinkmann Instruments) aparata, da bi bile tako celice kvasovk sproščene iz gela. Celična sposobnost za preživetje in koncentracija sta bili merjeni kot je bilo opisano za prosto suspendirane celice.

4.7 Mikrobiološke analize

Analize v tekoči fazi: Vzorci za mikrobiološke analize so bili odvzeti iz kontinuirnih fermentacij najmanj enkrat na teden. Ječmenovka, ki je bila uporabljena za kontinuirne fermentacije, je bila prav tako testirana na onesnaženje pred njenim prenosom v bioreaktor. Za testiranje prisotnosti obeh aerobnih in anaerobnih bakterij, so bili vzorci nanešeni na Universal Beer Agar (UBA, Difco Laboratories), z dodatkom 10 mg/l cikloheksimida, in inkubirani pri 28°C za 10 dni. Plošče, ki so bile testirane na anaerobno bakterijsko onesnaženje, so bile postavljene v anaerobno posodo z AnaeroGen®-om (Oxoid) paketom, ki navzame kisik, ki je preostal v posodi in tako tvori anaerobno okolje. Anaerobni indikator (Oxoid), ki se spremeni v roza v prisotnosti kisika, je bil uporabljen za

preverjanje anaerobnih pogojev v posodi. Onesnaženje z divjim kvasom je bilo testirano z nanašanjem vzorcev na kvasni medij (YM agar, Difco Laboratories) ob dodatku CuSO_4 (0.4 g/l) inkubiranih pri 25°C za 7 dni. Peptonski agar Yeast-Extract Nutrient agar (PYN) opisan predhodno, je bil uporabljen za pregled vzorcev na nelagerske kvasne kontaminante pri 37°C za 7 dni. Nerast kvasa na PYN pri 37°C je bil indikator, da ni bil prisoten ale kvas ali kontaminanti, ki rastejo pri 37°C.

Analize gelne faze: Test je bil razvit v našem laboratoriju, da bi zagotovili, da so bile imobilizirane celične kroglice, ki naj bi bile uporabljene v fermentacijah, brez kontaminacijskih bakterij pred njihovim cepljenjem v bioreaktor. Glavna skrb je bila preprečiti kontaminacijo z organizmi, ki uničijo pivo, kot so *Pediococcus sp.* in *Lactobacillus sp.* ali divji kvas. 3 ml volumen karagenanskih gelnih kroglic je bil inokuliran v 100 ml številnih izbirnih tekočih medijev, opisanih spodaj, in prenešen v 250 ml stekleničke pri 25°C, ter stresan pri 100 obratih na minuto v inkubatorskem mešalu.

NBB brozga (Nachweis von Bierschädlichen Bakterien) (BBL kat # 98138, NBB Broth Base, 0.02 g/l cikloheksimid) je semi-selektivni medij, ki je bil uporabljen za testiranje na pivo uničujočih bakterij, kot sta *Pediococcus sp.* in *Lactobacillus sp.*. Bakrova sulfatna brozga (16 g/l YM brozge, Difco; 0.4 g/l CuSO_4) je semiselektivni medij za testiranje divje kvasnih kontaminantov. Končno, Standard Methods (STA) + cikloheksimidna brozga (16 g/l 'Standard Methods' brozga, Difco; 0.02 g/l cikloheksimid) je bila uporabljena za testiranje na bakterije najdene v vodi, odpadni vodi, mlečnih produktih in hrani (Power in McCuen, 1988). Selektivni mediji so bili izbrani za detekcijo in identifikacijo organizmov, ki potencialno uničujejo pivo v treh dneh. Da gre za kontaminirane vzorce je bilo mogoče sklepati na osnovi motnosti vzorcev in verjetna identifikacija kontaminantov je bila opravljena.

Metodologija za detekcijo kvasnih celic na osnovi nepopolnega dihanja: Trifeniltetrazolin kloridna (TTC) pokrivna tehnika (angl. 'Respiratory Deficient (RD) Yeast Cell Detection Methodology: Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) Overlay Technique'). Ta metoda je bila uporabljena za razlikovanje kvasovk z nepopolnim dihanjem od preostale populacije in temelji na principu, da je TTC brezbarvna sol, ki tvori rdeč precipitat po redukciji. Ko so kolonije kvasovk, ki rastejo na kvas-pepton-dekstroznem agarju (YPD) (ekstrakt kvasa, 10 g/l; pepton, 20 g/l; dekstroza, 20 g/l; agar, 20 g/l v dH_2O), prekrile s TTC, bodo kvasovke s popolnim dihanjem reducirale TTC, in te kolonije bodo postale temno roza do rdeče. Kakorkoli, kvasovke z nepopolnim dihanjem ne reducirajo barvila in zadržijo njihovo originalno barvo.

Kulture so bile serijsko razredčene do primerne koncentracije mikroorganizmov, ~100 celic/0.2 ml, za nanašanje na plošče. YPD plošče so bile nato inkubirane za približno 3 dni pri 21°C dokler so bile kolonije kvasovk vidne v aerobnem okolju. Vsaka plošča je bila prekrita z 20 ml 50°C TTC pokrivnim agarjem. Po ohlajanju posameznih raztopin do 50°C, je bil TTC pokrivni agar napravljen z mešanjem 1:1 raztopine A (12.6 g/l NaH_2PO_4 ; 11.6 g/l Na_2HPO_4 ; 30.0 g/l agarja v dH_2O , obdelane v avtoklavu pri 121°C, 15 min) z raztopino B (2.0 g/l 2,3,5-trifeniltetrazolijevega klorida v dH_2O , obdelanega v avtoklavu pri 121°C, 15 min). Plošče so bile 'prečitane' po 3 urah inkubacije pri sobni temperaturi. Procent RD je bil podan kot procent neobarvanih kolonij celotnega opaženega števila.

4.8 Elektronska mikroskopija ('Scanning Electron Microscopy') (SEM) **imobiliziranega kvasa v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah**

Kapa-karagenanske gelne kroglice, ki so vsebovale imobiliziran kvas, so bile odstranjene iz bioreaktorja skozi vzorčno odprtino in prenešene v 10 ml stekleno kiveto s pokrovom z navojem, s kroglicami potopljenimi v majhen volumen fermentirajoče brozge. Kiveta je bila nemudoma pokrita z ledom in transportirana v izoliranem kontejnerju do SEM naprave. Kapa-karagenanske gelne kroglice, ki so vsebovale imobiliziran kvas, so bile fiksirane v 2% (v/v) glutaraldehida pripravljenega v Sorensenovem fosfatnem pufru, 0.07 M, pH 6.8 (Hayat, 1972). Temu je sledilo naknadno fiksiranje v 1% (m/v) osmijevega tetroksida pripravljenega v enakem pufru in dehidracija skozi niz alkoholnih raztopin z naraščajočim deležem 50, 70, 80, 90, 95, 100% (v/v), pri čemer je vsaka trajala 15 minut in nato se tri spremembe pri 100%. Pred kritično točko sušenja (Ladd Research Industries, Burlington, VT) skozi ogljikov dioksid, so bile nekatere kroglice zamrznjene v tekočem dušiku, razdrobljene in zbrane v 100% alkoholu. Zamrznjeno drobljenje omogoča, da je notranja stran kroglic izpostavljena minimalnim deformacijam. Po kritični točki sušenja so bili vzorci brizgalno premazani (Polaron SC500 brizgalni premazovalnik, Fison Instruments, Anglija) z 30 nm zlata/paladija in nato snemani s Hitachi S-4500 emisijskim elektronskim mikroskopom (angl. 'field scanning electron microscope') (Nissei Sangyo, Tokio, Japonska).

4.9 Protokol vzorčevanja iz bioreaktorja

Rezervoar, ki je vezan na vzorčno odprtino bioreaktorja (Scandi-Brew Type T membranski vzorčni ventil) je bil napolnjen s 70% (v/v) etanolne raztopine za vzdrževanje aseptičnih pogojev okoli odprtine med vzorčenji. Pri odvzemanju vzorca je bil zamašek etanolnega rezervoarja odstranjen iz dna, potopljen in intenzivno spiran z etanolom pred odprtjem vzorčne odprtine. Vzorci so bili zbrani v 'nagubano' kiveto ali v posodo s pokrovom z navojem in volumni so bili različni od 5-60 ml, odvisno od zahtevane analize. Pri testiranju mikrobiološkega onesnaževanja je bilo 10 ml fermentacijske raztopine vakuumsko črpanih skozi enoto sterilnega membranskega filtra. Membrana velikosti por 0.45 μm je bila nameščena na primeren selektivni medij, kot je bilo opisano v poglavju 4.6.

Za kemijske analize je bilo odvzetih 60 ml vzorca skozi septo iz 100 ml 'nagubane'-zaprte kivete in filtriranih skozi iglo skozi Schleicher in Schull, FP-050, dvojnoslójni filterni sistem z iglo velikosti por 5 μm in 0.45 μm . Zahtevan volumen vzorca je bil nato razdeljen

v 20 ml kivete z naglavno odprtino in začepjen s teflonsko septo in aluminijasto kapo. Zahtevani vzorčni volumni so navedeni v tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Zahtevani vzorčni volumni za različne kemijske analize.

Vzorec	Volumen (ml)
Etanol	5
Dioli s kratkimi verigami	10
Hlapne spojine piva (angl. 'beer volatiles')	12
Diketoni	5
Ogljikovi hidrati/specifična teža	12
Prosti amino dušik/protein	12

4.10 Meritve raztopljenega kisika

Dr. Thiedig Digox 5 naprava za merjenje raztopljenjega kisika meri raztopljen kisik v območju od 0.001-19.99 mg/l v ječmenovki, fermentirani ječmenovki in pivu (Anon, 1998). Vilachá in Uhlig (1985) sta testirala številne instrumente za merjenje raztopljenega kisika v pivu in ugotovila, da daje Digox analizator zanesljive, natančne vrednosti. Metoda

elektrokemijskega merjenja uporabljena v primeru Digox 5 temelji na amperometrični tri-elektrodni razporeditvi s potenciometrom. Merilna celica sestoji iz merilne elektrode (katode) in nasprotne elektrode (anode). Te elektrode so bile izpostavljene tekočini v kateri je bila merjena koncentracija kisika. Reakcija na merilni elektrodi se zgodi po fiksiranju določenega merilnega potenciala. Na veliki, srebrni merilni elektrodi, so molekule kisika reducirane v hidroksilne ione. Dve molekuli vode reagirata v enačbi 4.1 z eno molekuljo kisika, pri tem absorbirata štiri elektrone in tako dajeta štiri hidroksilne ione.



Anoda iz nerjavečega jekla absorbira štiri elektrone sproščene na katodi in tako zagotovi tok. V enačbi 4.2 je tok, ki ga merimo, direktno proporcionalen koncentraciji kisika, $C_{\text{L},\text{O}}$:

$$I = K \times C_{L,O}$$

(4.2)

kjer na konstanto K vpliva Faradayeva konstanta, število elektronov pretvorjenih na molekulo, površina katode in širina mejnega sloja na površini merilne elektrode. Konstanten, značilen merilni potencial, je kritičen za selektivnost (za kisik) in točnost meritve. Merilna napetost je stabilizirana z referenčno elektrodo, ki s tokom ne izgoreva. Ta skupaj s potenciostatom, ki daje električno povratno zanko, zagotavlja stalni merilni potencial. Površina merilne elektrode je elektrolitsko povezana z referenčno elektrodo preko membrane.

Napaka na merilnem območju končne koncentracije raztopljenega kisika je bila $\pm 3\%$ (Anon, 1998). Aparat za določanje raztopljenega kisika je bil kalibriran z uporabo Thiedig Active Calibration, v katerem je Digox 5 produciral določeno količino kisika na osnovi Faradayevega zakona (0.500 mg/l) in nato preveril to vrednost z merjenimi vrednostimi v matriksu. To je omogočalo instrumentu, da je bil kalibriran pod tlakom, temperaturo in pretočnimi pogoji, ki ustrezajo merilnim pogojem, znotraj ene minute. Ker je zamenjava molekul v senzorju difuzijski proces, nanjo vpliva temperatura, ki vodi do hitrejših reakcijskih hitrosti in poveča izmerjen tok. Zato je bil Digox prav tako opremljen s senzorjem, ki meri temperaturo in avtomatsko kompenzira fluktuacije.

Digox 5 ima nekatere prednosti pred membranskimi kisikovimi senzorji. Ker Digox ne uporablja elektrolita, je izguba občutljivosti relativno počasna, na merilni elektrodi pa pride le do neznatnega nalaganja. Nadalje, občutljivost je lahko določena pri kateremkoli času, z izvajanjem aktivne kalibracije. Čiščenje elektrode in rekaliibriranje instrumenta je enostaven postopek. Pri večini membranskih senzorjev se srebrov klorid odlaga na katodo, raztopine elektrolita se spremenijo, kar vodi postopoma do nižjih vrednosti. Zaradi tega je priporočeno, da so membrane in elektroliti zamenjani vsakih nekaj tednov in nato sistemi rekaliibrirani, kar je dolgotrajna in nerodna operacija. Kalibracija membranskih senzorjev je ponavadi izvedena v laboratoriju v pogojih nasičenja s kisikom, kar lahko povzroči znatne napake, še posebej v ječmenovki in pivu pri zelo nizkih nivojih kisika. Temperatura bo imela trikratni vpliv na membranske kisikove senzorje: membranska permeabilnost se bo spremenila, parcialni tlak kisika se bo spremenil in topnost kisika v elektrolitu se bo spremenila. Temperaturna kompenzacija za te tri faktorje v membranskih senzorjih je težka.

Meritev raztopljenega kisika v ječmenovki med shranjevanjem: Upogljiva Tygon® cev dovoljena za prehrabeno industrijo (0.635 cm notranjega premera) je bila aseptično priključena na vzorčno odprtino locirano blizu vrha konične osnove shranjevalne posode za ječmenovko, T-1 in T-2 (glej poglavje 4.2.1). Peristatična črpalka spremenljive hitrosti je omogočala volumsko pretočno hitrost 11 l/h skozi analizni blok za raztopljen kisik ((Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Parmer kat.# P-07523-50)). Meritve raztopljenega kisika v ječmenovki so bile nato registrirane po 4-5 minutah.

Meritve raztopljenega kisika v bioreaktorju: Pred izvajanjem meritev raztopljenega kisika bioreaktorju, je bil Digox 5 analizni blok 'sanitiziran'. Odprtina (vhod) senzorja je bila priključena na sterilno Tygon® cev dovoljeno za prehrabeno industrijo (6.35 mm notranjega premera). 70% (v/v) etanolne raztopine je bilo črpane skozi merilnik pri volumski pretočni hitrosti približno 10 l/h za 15 minut. Merilnik raztopljenega kisika je bil priključen na laboratorijsko vodo iz pipe in vroča voda (70°C) je potovala skozi senzor minimalno 2 uri. Ta metodologija je bila uporabljena raje kot sterilizacija s paro, ker materiali analiznega bloka ne dopuščajo temperature nad 70°C. Po dvo-urni periodi sanitacije so bile cevi na vstopu in izstopu enote trdno pripete, da bi bila tako vzdrževana sterilnost v merilniku. V pokritem laminarnem toku, je bilo na novo sterilizirano cevje priključeno na vstop in izstop iz merilnika. Prosti konci cevja so bili nato aseptično trdno vpeti na odprtine iz nerjavečega jekla na naglavni plošči bioreaktorja z notranjim premerom 6.35 mm in meritve so bile izvedene. Ko odprtine na bioreaktorju niso bile uporabljene, so bile začepjene s steriliziranim kratkim cevjem Tygon®, ki je dovoljeno za prehrabeno industrijo. Raztopljeni kisik je bil izmerjen on-line v bioreaktorju s plinskim vlekem z odvzemanjem tekočine iz fermentacije skozi odprtino, ki se je nahajalo na naglavni plošči bioreaktorja. Fermentacijska tekočina je zapustila bioreaktor skozi filter iz nerjavečega jekla (glej poglavje 4.1.2) priključen na 6.35 mm cev iz nerjavečega jekla, ki je penetrirala bioreaktorjevo naglavno ploščo. Tekočina se je nato pretakala skozi gibljivo Tygon® cev dovoljeno za prehrabeno industrijo (6.35 mm notranjega premera), ki je bila priključena na peristaltično črpalko s spremenljivo hitrostjo (Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Patmer kat.# P-07523-50), ki omogoča volumsko pretočno hitrost 11 l/h skozi analizni blok za določanje raztopljenega kisika. Fermentacijska tekočina je bila nato reciklirana skozi drugo odprtino iz nerjavečega jekla z notranjim premerom 6.35 mm, ki je penetrirala bioreaktorjevo naglavno ploščo. Tygon® cev dovoljena za prehrabeno industrijo (Cole-Palmer, 1999) je bila uporabljena za priključitev senzorja na bioreaktor

zaradi njegove od dobavitelja določene nizke permeabilnosti kisika 30 $\text{cm}^3 \text{mm}/(\text{scm}^2 \text{cmHg}) \times 10^{-10}$. Meritev je bila izvedena po 4-5 minutah kroženja.

4.11 Kemijske analize

Kalibracije so bile izvedene z uporabo primernih standardnih reagentov. Vsi reagenti, ki so bili uporabljeni za analize so bili čistejši kot 99%. Ko je bilo potrebno, je bilo izvedeno naknadno čiščenje z destilacijo.

4.11.1 Etanol

Koncentracija etanola je bila določena z uporabo interne standardne plinsko kromatografske (GC) metode American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee ASBC, 1992). Degazirani vzorci so bili obdelani direktno z izopropanolnim internim standardom, 5% (v/v) in vbrizgani v Perkin Elmer 8500 plinski kromatograf, ki je bil opremljen s plamenskim ionizacijskim detektorjem (FID) in avtomatskim vzorčevalnikom Dynatech. Uporabljena je bila Chromosorb 102, 80-100 mrežna kolona s helijem kot nosilnim plinom. Kromatografski pogoji: pretok 20 ml/min, temperatura injektorja 175°C, temperatura detektorja 250°C, temperatura kolone 185°C.

4.11.2 Določanje ogljikovih hidratov

Koncentracije glukoze, fruktoze, maltoze, DP3 (maltotrioze), DP4 (maltotetroze), poli-1 (polisaharidni vrh 1) in glicerola v fermentacijskih vzorcih so bile določene z uporabo Spectra-Physics (SP8100XT) tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (HPLC) opremljeno s kationsko izmenjevalno kolono (Bio-Rad Aminex, HPX-87K) in detektorjem lomnega količnika (Spectra-Physics, SP6040XR). Mobilna faza je bila kalijev fosfat, dibazičen, 0.01M, in sistem je bil opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom Spectra-Physics (SP8110). Instrument je deloval s povratnim tlakom 5.5 MPa. Pretočna hitrost vzorca in eluenta skozi kolono je bila 0.6 ml/min, s temperaturo kolone 85°C in temperaturo detektorja 40°C. Injekcijski volumen je bil 10 μl .

4.11.3 Specifična teža

Specifična teža ječmenovke in fermentacijskega medija je opisana v tej študiji s terminom pravi ekstrakt (angl. 'real extract') (stopinje Platona, °P), ki je sprejeta enota uporabljena v pivovarski industriji.

Fermentacijski vzorci so bili filtrirani, kot je opisano v poglavju 4.8 in premešani pred analizo z digitalnim merilnikom gostote (Anton Paar DMA-58 Densimeter), da bi bila tako izmerjena specifična teža ječmenovke (stopinje Platona). Za določitev specifične teže so bili fermentacijski vzorci vstavljeni v stekleno u-cevko, ki je elektronsko oscilirala. Specifična teža je bila tako indirektno podana v stopinjah Platona.

Stopinja Platona je numerična vrednost procenta (m/v) sukrozne raztopine v vodi pri 20°C katere specifična teža je enaka kot teža obravnavane ječmenovke. Ker skala v stopinjah Platona in nastale tabele za specifično težo raztopine v odvisnosti od koncentracij topila temeljijo na vodni raztopini sukroze, je le ta samo približek količini ekstrakta. Ekstrakt je termin, ki se nanaša na celotno topno maso v pivovarski snovi kot taki in/ali potencialno med procesiranjem (Hardwick, 1995), kot so ogljikovi hidrati, proteini, tanini. Ekstrakt je trenutno še vedno izražen v pivovarski industriji kot specifična teža v stopinjah Platona, ker še vedno ni bolj primerne reference, ki bi bolje odražala spremenljivost v sestavi ječmenovke različnih izvorov.

4.11.4 Celotni diacetil

Celotni diacetil (2,3-butandion) v pivu in fermentacijskih vzorcih je bil izmerjen z analizno vzorčno tehniko (angl. 'headspace analyte sampling technique'), ki ji je sledila kapilarna GC separacija (Hewlett-Packard 5890) in detekcija z ujetjem elektronov (ECD) (angl. 'electron capture detection') na osnovi metode American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee ASBC, 1992). Metoda se nanaša na 'celotni diacetil', ker meri količino diacetila in njegovega predkurzorja, alfa-acetolaktata. Nosilec je bil 5% metan in argon pri 1.0 ml/min, uporabljena kolona pa je bila J&W DB-Wax. Razdelilno razmerje je bilo 2:1 in pomožni plin je bil helij pri 60 ml/min. Temperatura injektorja je bila 105°C in temperatura detektorja je bila 120°C. Sistem je bil opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom Hewlett Packard 7694E, kot interni standard pa je bil uporabljen 2,3-heksandion. Čas potovanja vzorca je bil 40 min, s časom potrebnim za vzpostavitev ravnotežja v kivetu 30 min pri 65°C, časom pod pritiskom 2 min pri 33.1 kPa, časom polnitve zanke 0.2 min, časom vzpostavitve ravnotežja v zanki 0.1 min in časom

potrebnim za vbrizg 0.27 min. Pritisk nosilca je bil 0.13 MPa, temperatura prenosne cevi 95°C in temperatura zanke 65°C.

4.11.5 Hlapne snovi v pivu

Hlapne snovi v pivu vključno z acetaldehidom, etil acetatom, izobutanolom, 1-propanolom, izoamil acetatom, izoamil alkoholom, etil heksanoatom in etil oktanoatom so bile merjene z metodo plinske kromatografije GC (Hewlett Packard 5890), internega standarda (n-butanola) in plamenskega ionizacijskega detektorja (FID). Nosilni plin je bil helij pri 6.0 ml/min, GC pa je bil opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom Hewlett Packard 7694.

Temperatura injektorja GC je bila 200°C, temperatura detektorja pa 220°C. Temperaturni profil peči: 40°C (5 min), 40 - 200°C (10°C/min), 200 - 220°C (50°C/min), 220°C (5 min). FID plini so vsebovali nosilec pri 6.0 ml/min, helijev maskirni plin pri 30 ml/min in 0.19 MPa, H₂ pri 50 ml/min in 0.17 MPa in zrak pri 300 ml/min in 0.24 MPa. Septa je bila čiščena s pretočno hitrostjo 0.8 ml/min. Tlak v glavi je bil 27.6 kPa. Ko je bil avtomatski vzorčevalnik priključen preko igle na injekcijsko odprtino, je bil tlak kivete 0.11 MPa, tlak nosilnega plina 49 kPa, tlak v glavi kolone 27.6 kPa, razdelilni pretok 18 ml/min in pretok

v koloni 6 ml/min. Temperature v posameznih področjih: kiveta 70°C, zanka 80°C, prenosna cev 150°C.

Čas potovanja po GC cevki je bil 40 min, s časom za vzpostavitev ravnotežja v kivetu 35 min, časom, ko je bila kiveta pod pritiskom 0.25 min, časom za polnjenje zanke 0.1 min, časom za vzpostavitev ravnotežja v zanki 0.1 min, časom potrebnim za vbrizg 3 min in volumnom vzorca v zanki 1 ml.

4.11.6 Prosti amino dušik (angl. 'Free Amino Nitrogen (FAN)')

Za določanje prostega amino dušika v fermentacijskem vzorcu je bila uporabljena mednarodna metoda American Society of Brewing Chemists (Technical Committee and Editorial Committee ASBC, 1992) z uporabo Perkin Elmer LS50B spektrofotometra. Ta spektrofotometrična metoda temelji na barvni reakciji med ninhidrinom in dušikom prisotnim v vzorcu. Absorbanca je direktno proporcionalna količini prisotnega prostega amino dušika.

a) barvni reagent: 19.83 g dinatrijevega vodikovega fosfata (Na_2HPO_4)

30.00 g kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4)

2.78 g ninhidrina monohidrata

1.50 g fruktoze

b) reagent za raztapljanje: 2.00 g kalijevega jodata (KIO_3)

596 ml destilirane, deionizirane vode

404 ml 95% (v/v) etanola

shranjen v hladilniku in uporabljen pri sobni temperaturi.

c) matična raztopina glicina: 0.1072 g/100 ml destilirane deionizirane vode

d) standardna raztopina glicina: matična raztopina je bila razredčena 1:100 (v/v) z destilirano, deionizirano vodo. Takšen standard vsebuje 2 mg/l prostega amino dušika.

Vzorci so bili razredčeni v razmerju 100:1 z destilirano vodo in 2 ml razredčenega vzorca je bilo prenešenega v vsako od 3 testnih cevi. Slepa proba je bila pripravljena z uvajanjem 2 ml destilirane deionizirane vode v vsako izmed 3 testnih cevi. Tri testne cevi, od katerih je vsaka vsebovala 2 ml glicinske standardne raztopine, so bile prav tako pripravljene. V vsak vzorec je bil dodan 1 ml barvnega reagenta in nato so bili postavljeni v 100°C vodno kopel za natančno 16 min. Testne cevi so bile nato ohlajene v 20°C vodni kopeli za 20 min. Pet ml razredčevalnega reagenta je bilo nato dodanih v vsako izmed testnih cevi.

Sledilo je intenzivno mešanje. Vzorci so bili nato puščeni mirovati 10-15 min. Absorbanca pri 570 nm je bila nato izmerjena z uporabo spektrofotometra in količina FAN v vzorcu je bila izračunana po enačbi 4.3.

$$\text{FAN (mg/l)} = (\text{A}_p - \text{A}_B - \text{A}_F)2d/\text{A}_S \quad (4.3)$$

kjer je FAN količina prostega amino dušika v vzorcu v mg/l, A_p je povprečje absorbanc testnih raztopin, A_B je povprečje absorbanc za slepe vzorce, A_F je povprečje absorbanc za korekcijo za črno ječmenovko in piva, 2 je vrednost FAN v glicinski standardni raztopini, d je razredčevalni faktor vzorca in A_S je povprečje absorbanc za glicinsko standardno raztopino.

POGLAVJE 5: KONTINUIRNA FERMENTACIJA Z UPORABO BIOREAKTORSKEGA SISTEMA S PLINSKIM VLEKOM

Bioreaktorski sistem z notranjo zanko in plinskim vlekom je bil izbran za kontinuirno fermentacijo piva, ker so bile zanj publicirane odlične snovno prenosne (tekocina – trdna snov) in mešalne lastnosti. Prenos snovi tekoče – trdno je bil še posebej pomemben, ker gre pri tem za prenos hranljivih snovi iz tekoče faze na trdni biokatalizator iz imobiliziranih celic, ki daje substrate za kapsuliran kvas. Ti bioreaktorji prav tako omogočajo dobro aeracijo, majhno porabo moči, znani pa so tudi po enostavni konstrukciji. To je napravilo bioreaktorske sisteme s plinskim vlekom za zelo atraktivne za operacije 'na veliki skali' kot so komercialne operacije čiščenja odpadnih vod (Driessen s sodelavci, 1997; Heijnen, 1993).

5.1 Opis bioreaktorja z notranjo zanko in plinskim vlekom

To poglavje podaja natančni opis bioreaktorja s plinskim vlekom, ki je bil uporabljen v tem delu.

5.1.1 Telo bioreaktorja

13 l (8 l delovnega volumna) bioreaktor z notranjo zanko in plinskim vlekom, ki je bil načrtovan za to delo, je bil trifazni reaktor s fluidiziranim slojem (tekočina/trdna

snov/plin), kjer so bile imobilizirane celice zadržane v suspenziji z ogljikovim dioksidom, ki je zagotavljal interno kroženje tekočine (Heijnen, 1996) kot je bilo prikazano na SL. 16. Fotografija bioreaktorske posode je podana na SL. 17, natančna skica z podanimi dimenzijami pa na SL. 18. Ogljikov dioksid in zrak potujeta na stožčasto dno bioreaktorja skozi sintran razpršilnik in nerjavečega jekla (CO₂ čistilna odprtina, del #9222, Hagedorn&Gannon, ZDA), 0.11 m dolžine, 0.013 m notranjega premera. Ogljikov dioksid je bil uporabljen kot fluidizirni plin in zrak je bil uporabljen kot izvor kisika za kvasne celice.

Notranja zanka, koncentrično nameščena znotraj kolonskega bioreaktorja, je imela funkcijo dvigovanja v tem sistemu s fluidiziranim slojem, medtem ko je imel zunanji obroč funkcijo spuščanja. Notranja zanka je bila obešena na cilindričen separator delcev, pri čemer je bila pritrjena na tri okovice iz nerjavečega jekla v razširjenem področju glave

bioreaktorja. S tem, ko sta bila notranja zanka in konektorji separatorja delcev v celoti znotraj reaktorja, je bil minimiziran risk mikrobiološke kontaminacije iz okolice.

V osnovi je imel bioreaktor mrežasto zaslonko, ki je ločevala imobilizirane celice od tekočine na izhodu reaktorja. Kakorkoli, ker je obstajala možnost potopitve zaslona, je bil za separacijo imobiliziranih celičnih kroglic iz tekoče faze, ko so le te potovale čez vrh notranje zanke in se nato spuščale v obroču zunaj notranje zanke, uporabljen cilinder iz nerjavečega jekla. Delci bi tako trčili v cilinder in padli nazaj v glavno maso tekoče faze, in tako ne zapustili bioreaktorja v izlivu. Tako je obstajalo majhno področje blizu izstopa iz bioreaktorja, ki je bilo brez imobiliziranih celičnih delcev. Razširjeno področje glave bioreaktorja je prav tako povečalo površino za ločitev plinastih mehurčkov.

5.1.2 Naglavna plošča bioreaktorja (angl. 'headplate')

Na SL. 19 je shematsko prikazana naglavna plošča (pokrov) bioreaktorja. Odprtine pokrova so bile zmanjšane, da bi bil tako zmanjšan riziko kontaminacije. Odprtine so bile ali zavarjene direktno na pokrov ali pa so bili uporabljeni kompresijski fitingi (Swagelok®). Na pokrovu so bili tako nastavki za inokulacijo, termočlen, termometer, septo za vzorčevanje plina in za odvzem tekočega vzorca in povratne odprtine za meritve raztopljenega kisika. Temperaturni senzor je bil vključen v termočlen, ki je bil povezan z merilnim sistemom za temperaturo. Merilnik temperature je dal povratno informacijo elektromagnetnemu ventilu, ki je odprl in zaprl dotok glikola v termični plašč bioreaktorja.

Temperatura je bila spremljana z uporabo termometra (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple thermometer, #90610-20) in sonde tipa T, ki je bila zavarjena v pokrov bioreaktorja. Raztopljen kisik je bil merjen z merilnikom raztopljenega kisika (Dr. Theidig, Digox 5), ki je terjal pretok tekoče brozge 9-11 l/h skozi merilni blok za točna odčitavanja kisika. Tekočina je bila odvzeta iz bioreaktorja za določanje kisika skozi cev z notranjim premerom 6.35 mm, ki poteka skozi pokrov v fermentacijsko tekočino. Kot je prikazano na SL. 20, je bil vrh cevi povezan s filtrom za odstranitev večjih delcev iz tekočine, ko je bila le ta črpana skozi merilnik raztopljenega kisika. Tekočina se je nato vrnila nazaj v bioreaktor skozi drugo 6.35 mm odprtino v pokrovu.

5.1.3 Sanitarni ventili in aseptično vzorčenje

Bioreaktor je bil opremljen z membranskim vzorčnim ventilom (Scandi-Brew®), ki je bil zavarjen v bioreaktorsko steno. Ventil je bil načrtovan za vzorčevanje pod aseptičnimi pogoji. Membrana je bila direktno pritrjena ob fermentacijsko tekočino in je tako omogočala, da je bil ventil lahko popolnoma steriliziran s paro in alkoholom skozi dve odprtini (SL. 18). Majhen zunanji rezervoar etanola je obkrožal membrano in tako omogočal vzdrževanje sterilnosti med vzorčevanjem. Ta ventil je bil uporabljen za celotno bioreaktorsko vzorčenje in bilo je predpostavljeno, da sestava tekočine v točki vzorčenja ni bila pomembno različna od sestave tekočine, ki je izstopala iz bioreaktorskega izhoda. Kot je bilo omenjeno v poglavju Materiali in Metode tega dela, je vzorčenje iz bioreaktorja potekalo skozi ventil nameščen na zunanji steni bioreaktorja. Da bi potrdili predpostavko, da je bila sestava tekočine, ki je izstopala iz reaktorja enaka tekočini, ki je bila v bioreaktorju, so bile izvedene študije časa pomešanja.

Metoda zasledovanja pulza (angl. 'pulse tracer method') je bila uporabljena za določanje časa pomešanja v bioreaktorju s plinskim vlekem (Chistie, 1989). 1 ml volumna 10N HCl je bil hitro vbrizgan v bioreaktorski obroč in spremembe pH v času so bile zasledovane s časom, pri čemer je bil $t = 0$ sekund ob vbrizgu. pH je bil povrnjen na začetno vrednost z vbrizgom 10N NaOH. pH elektroda (Cole-Parmer, kat. #P-05990-90) je imela dolžino 277 mm in premer 3.5 mm. Za spremljanje pH je bil uporabljen Ingold Model 2300 Process pH Transmitter. Dvotočkovna pH kalibracija je potekala z uporabo certificiranih standardnih pufrov, Beckman pH 7.0 zelenega pufra del #566002 in Beckman pH 4.0 rdečega pufra, del #566000. Podatki so bili spremljani pri frekvenci 3750 Hz 300 sekund z uporabo

softverskega programa, ki sta ga načrtovala Cheryl Hudson in John Beltrano v 1994, dopolnil pa Norm Mensour leta 1999 (University of Western Ontario, London, Ontario). pH podatki so bili nato 'glajeni' z uporabo Savitsky-Golay algoritma v TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, Labtronics, Guelph, Ontario). Savitzky-Golay algoritem je časovna metoda filtriranja pH podatkov z 'glajenjem' na osnovi lokalne polinomske regresije (Anon, 1996). Uporabljen je bil polinom druge stopnje. 'Glajeni' podatki so bili nato normalizirani in napravljen je bil graf odvisnosti ΔpH od časa. Čas pomešanja je bil zaokrožen na najbližjo minuto, ko je pH dosegel ~95% ravnotežno vrednost. Čas pomešanja je bil določen z uporabo treh različnih volumskih pretočnih hitrosti ogljikovega dioksida: 283 cm³/min, 472 cm³/min (volumska povprečna hitrost uporabljena v tem delu) in 661 cm³/min. V vseh treh primerih je vrednost pH v bioreaktorju dosegla ravnotežje

(~95% homogeniziranje) v manj kot 2 minutah, kot je prikazano v dodatku 1. Čas pomešanja je bil tako domnevno zadostno kratek za potrditev naše prvotne domneve, da je bila vsebina bioreaktorja dobro premešana. To nam je omogočalo domnevati, da sestava tekočine vzorčene ob steni bioreaktorja ni bila pomembno drugačna kot sestava tekočine, ki je pritekala skozi izhodno odprtino, s povprečnim zadrževalnim časom tekočine 24h v bioreaktorju. Na slikah v dodatku je mogoče opaziti določeno recirkulacijo tekočine vsiljeno mešanju disperzije, ki je značilna za bioreaktorje s plinskim vlekom (Chisti, 1989).

5.2 Pretočni diagram sistema za kontinuirno fermentacijo piva

Pretočni diagram za sistem kontinuirne fermentacije piva, ki je bil postavljen v Microbrewery Pilot Plant of Labatt Brewing Company Limited v Londonu, Ontario, je podan na SL. 21 z opisom posameznih delov v tabeli 5.1. V povzetku, pivovarska ječmenovka je bila zbrana iz London Labatt Plant, sterilizirana z uporabo hitrega pasterizatorja (Fisher Plate Heat Exchanger, kombinirano pretočni tip Eurocal 5FH) in shranjena v velikih shranjevalnih posodah (T-1 in T-2). Med kontinuirno fermentacijo je bila ječmenovka pretočena pri kontrolirani pretočni hitrosti do bioreaktorja s plinskim vlekom (BR-1) z imobiliziranimi kvasnimi celicami. Fermentirana tekočina je zapustila bioreaktor s prelivom na ustrezni višini in je bila nato zbrana v zbirni posodi (T-3). V nadaljnjih poglavjih je podrobno opisana operacija kontinuirnega fermentacijskega sistema za pivo prikazanega na SL. 21.

5.2.1 Zbiranje ječmenovke in njeno shranjevanje

S kisikom nenasičena ječmenovka za kontinuirno fermentacijo je bila zbrana iz Labatt London obrata po cevi v 1600 l cilindrokonično posodo za shranjevanje, preprihano z ogljikovim dioksidom, da bi bil tako minimiziran navzem kisika ječmenovke. Vse posode te vrste, vključno s posodama za shranjevanje ječmenovke, T-1 in T-2, so bile prečiščene in sanitizirane v skladu z Labatt Best Practices pred njihovo uporabo. Ječmenovka je bila nato hitro pasterizirana in transportirana pri 2°C v razpoložljivo posodo za shranjevanje, T-1 ali T-2 (prav tako preprihano z ogljikovim dioksidom). Ječmenovka je bila v teh posodah zadržana pri 2°C do največ 2 tednov, ob dovajanju tekočine kontinuirnemu fermentacijskemu bioreaktorju, BR-1. Na koncu dvotedenske periode, je bil dovod v bioreaktor preusmerjen tako, da je bila ječmenovka dovajana iz druge posode z

ječmenovko, ki je vsebovala svežo ječmenovko. Dve identični posodi za shranjevanje ječmenovke, T-1 in T-2, sta bili uporabljeni za minimiziranje časa izpada med preusmeritvijo k dovajanju sveže ječmenovke. V vseh primerih je bila ječmenovka testirana na kontaminacijo minimalno dva dni pred uvajanjem v bioreaktor (BR-1). Če je bila ječmenovka kontaminirana, je bila odstranjena in takoj je bila zbrana in pasterizirana sveža ječmenovka.

Minimiziranje koncentracije raztopljenega kisika v ječmenovki med shranjevanjem: Cilj je bil shraniti ječmenovko z minimalno konstantno vsebnostjo kisika in pri nizki temperaturi, ne da bi prišlo do zamrznjenja ječmenovke. To je bilo potrebno, da bi bile preprečene neželjene reakcije plesnjenja v ječmenovki kot posledica kemijskih reakcij s kisikom (Narziß s sodelavci, 1993), da bi bilo zagotovljeno konstantno dovajanje ječmenovke v bioreaktor in da bi bil minimiziran riziko kontaminacije ječmenovke z mikrobi med shranjevanjem. Velike 1600 l (neto) cilindrokonične posode (T-1 in T-2), ki so bile uporabljene za shranjevanje ječmenovke za kontinuirne fermentacije, so bile v osnovi načrtovane kot šaržni fermentorji in ne kot posode za shranjevanje ječmenovke. Zaradi tega hlajenje teh posod ni bilo primerno za vzdrževanje ječmenovke pri 2°C. Po treh dneh shranjevanja ječmenovke se je temperatura spreminjala tudi za 15°C od enega področja posode do drugega (tabela 5.2).

Ta segreta področja v posodi so povečala nevarnost mikrobne rasti. Tako je bilo za doseganje enakomerne nizke temperature v teh posodah potrebno mešanje.

Iz teh razlogov je bil v konično dno vsake posode za shranjevanje (T-1 in T-2) nameščen cevni razpršilec. Eksperimenti so bili izvedeni za določanje najboljšega protokola za polnjenje posode z ječmenovko in vzdrževanje konstantno nizkih vsebnosti raztopljenega kisika. V prvem eksperimentu je bila posoda za shranjevanje napolnjena z ječmenovko, ki je bila zbrana brez povečane vsebnosti kisika in hitro pasterizirana. Ko je bila posoda za shranjevanje napolnjena z 1600 l ječmenovke, je bilo na dnu posode razpršeno 0.113 m³/h ogljikovega dioksida. Med drugim eksperimentom, je bila ječmenovka ponovno zbrana brez povečane vsebnosti kisika in hitro pasterizirana. V tem primeru, je bila posoda za shranjevanje prepihana z ogljikovim dioksidom (0.85 m³/h) za tri ure pred polnjenjem in majhna količina ogljikovega dioksida (0.113 m³/h) je bila kontinuirno razpršena v posodo za shranjevanje, ko je bila ječmenovka dovedena v rezervoar. Ta nizek pretok ogljikovega dioksida se je odražal v obliki kontinuirnega potovanja mehurčkov skozi ječmenovko

shranjeno v rezervoarju, medtem ko je le ta dovajal ječmenovko v kontinuirno fermentacijo. Za oba eksperimenta je bila koncentracija raztopljenega kisika v ječmenovki redno spremljana v tednu shranjevanja.

Na sliki 5.7 je podana koncentracija raztopljenega kisika v odvisnosti od časa shranjevanja ječmenovke. Ko zadrževalna posoda ni bila preprihana z ogljikovim dioksidom, je zrak v praznem prostoru rezervoarja nad tekočino ječmenovki dovoljeval navzem kisika. Tako je bilo v primeru, ko rezervoar ni bil vnaprej preprihan, potrebno precej več časa, da bi koncentracija raztopljenega kisika v ječmenovki dosegla minimalno in konstantno vrednost. Ko je bila posoda vnaprej preprihana, je koncentracija raztopljenega kisika ostala na konstantnem nizkem nivoju med celotno periodo shranjevanja. Tako je bilo vnaprejšnje preprihanje rezervoarjev za shranjevanje ječmenovke (T-1 in T-2) in nadalnje zagotavljanje nizkega pretoka ogljikovega dioksida skozi ječmenovko med shranjevanjem, da bi tako ohranili nizek pozitivni tlak v rezervoarjih, prevzeto kot del procesa za shranjevanje ječmenovke za vse kontinuirne fermentacije.

Temperaturni profil v posodah za shranjevanje je bil primerjan ob in brez razprševanja ogljikovega dioksida s pretokom $0.113 \text{ m}^3/\text{h}$. Ta poskus je bil izveden na vodi in ne na ječmenovki z uporabo temperaturne sonde tipa T, ki je bila priključena na termometer (Cole-Parmer Waterproof Thermocouple Thermometer, kat. #90610-20). Mestna voda (1600 l) je bila zbrana v posodi za shranjevanje ječmenovke in puščena, da bi se vzpostavilo ravnotežje za tri dni. Temperatura vode je bila registrirana v različnih področjih rezervoarja za shranjevanje. Voda v rezervoarju je bila nato preprihana za 24h z $0.113 \text{ m}^3/\text{h}$ ogljikovega dioksida in temperatura je bila ponovno registrirana. Sobna temperatura je bila registrirana v vsakem primeru in temperatura nastavljena v rezervoarju za shranjevanje je bila 2°C .

Kot je razvidno iz tabele 5.2, je bila z razprševanjem ogljikovega dioksida temperatura v rezervoarjih za shranjevanje bolj enakomerna, s temperaturo v območju od 0.1 do 4.1°C v področjih merjenja, pri čemer vsebina v rezervoarjih ni zamrznila. Ta nižja temperatura je pomagala preprečiti neželjeno rast mikrobov v ječmenovki med shranjevanjem.

Plin je bil izpuščen iz rezervoarjev za shranjevanje ječmenovke skozi sterilni plinski filter, ki je bil nameščen na vrhu rezervoarja. Ječmenovka je bila nato transportirana s peristaltično črpalko različnih hitrosti (P-1) (Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, Cole-Plamer kat. #P-07523-50) v vhod v 8l bioreaktor (BR-1) z uporabo Norprene® Food Grade L/S 16 fleksibilne cevi.

5.2.2 Kontinuirna fermentacija z uporabo bioreaktorskega sistema z notranjo zanko in plinskim vlekom

Ječmenovka je bila dovedena v bližino koničnega dna bioreaktorja, BR-1, skozi 6.35 mm odprtino. Zmes skozi filter steriliziranega (Milipore, Millex®-FG₅₀, 0.2 µm filterska enota) zraka in ogljikovega dioksida (čistost 99.99%) je bila dovajanja v bioreaktor skozi sintran razprševalnik iz nerjavečega jekla. Rotameter (R-3) je bil uporabljen za kontroliranje pretočne hitrosti ogljikovega dioksida pri STP in vnaprej kalibriran merilnik masnega pretoka (M-1) je bil uporabljen za kontroliranje pretoka zraka pri STP. Fermentirana tekočina je zapustila bioreaktor s prelivom na ustrezni višini in nato potovala skozi ojačano PVC cev z notranjim premerom 2.54 cm v 30 l zbiralno posodo iz nerjavečega jekla (T-3), ki je bila ohlajana z zunanjo glikolno spiralo in je vzdrževala temperaturo 4°C.

5.2.3 Zbiranje produkta

Posoda za zbiranje produkta (T-3) je imela veliko vhodno odprtino (2.54 cm notranjega premera), ki je bila načrtovana tako, da bi fermentirana tekočina tekla navzdol po steni zbiralne posode, da bi bilo tako minimizirano penjenje. Ta posoda je imela prav tako sterilni plinski filter (Milipore, Millex®-FG₅₀, 0.2 µm filterska enota) za plin sproščen iz bioreaktorja (BR-1) in zbiralne posode (T-3). Zbiralna posoda je bila periodično praznjena z uporabo 6.53 mm ventila (V-12), ki je bil nameščen 5.08 cm nad dnom rezervoarja.

5.2.4 Glikolna hladilna zanka

Glikol je bil transportiran iz pivovarne London Brewery v pilotni obrat Microbrewery Pilot Plant pri temperaturi -23°C in pod tlakom 0.31 MPa in je krožil skozi hladilne plašče v rezervoarje za shranjevanje ječmenovke (T-1 in T-2), biorektor s plinskim vlekom (BR-1) in posodo za zbiranje produkta (T-3). Dva rezervoarja za shranjevanje ječmenovke in bioreaktor so bili opremljeni s temperaturnimi sondami za tekočo fazo, ki so podajale povratno informacijo merilnikom temperature, ki so nazaj kontrolirali pretok hladnega glikola v plaščih posod. Rezervoarji za shranjevanje ječmenovke so shranjevali ječmenovko pri 2°C, medtem ko je bila temperatura v bioreaktorju kontrolirana pri temperaturah 12°C do 22°C, odvisno od posameznega eksperimenta. Posoda za zbiranje produkta ni imela avtomatske kontrole temperature, temveč je bil pretok glikola kontroliran ročno, da bi bila tako ohranjena temperatura posode pri približno 4°C. Ni bilo

potrebno natančno kontrolirati temperature posode za zbiranje produkta (T-3), ker je bila tekočina v tej posodi enostavno odvedena in ni bila nadalje analizirana ali obdelana.

Glikol je bil prav tako uporabljen za oplašanje in hlajenje cevi, ki so vodile od rezervoarjev z ječmenovko (T-1 in T-2) v bioreaktor (BR-1). Ko je glikol krožil skozi plašč, je bil vrnjen v glavno cev v pilotnem obratu Pilot Plant Microbrewery, nato pa se je vrnil v obrat London Plant, navadno pri temperaturi -15°C in tlaku 0.27 MPa.

5.3 Protokol za sterilizacijo v bioreaktorju

Bioreaktor (BR-1) je bil napolnjen z 2% (v/v) raztopino Diversol® a CX/A (DiverseyLever, Kanada), sanitarnim detergentom, in je tako namočen ostal čez noč ob razprševanju plina. Reaktor je bil nato spraznjen in spran z mrzlo vodo. Cikel čistilne raztopine in spiranje z vodo je bil ponovljen dva krat. Da bi pripravili bioreaktor za sterilizacijo s paro, sta bili napeljavi za ječmenovko in za plin ločeni. Linija s paro je bila priključena na vstop bioreaktorja in odprti so bili naslednji ventili: bioreaktorski vstopni in prepihovalni ventil (V-7, V-6), plinski vstopni (V-17), izstopni ventili za produkt (V-9, V-11), membranski vzorčevalni ventili (V-8, V-10) in odprtina za praznjenje zbiralne posode (V12). Plinski ventil v obratu je bil nato odprt počasi in ventili bioreaktorja so bili nastavljeni tako, da je bilo kapljanje pare opaženo na izhodu vsake zunanje odprtine. Po 60 minutah izpostavljanja pari so bili zunanji ventili na bioreaktorju zaprti (V-17, V-8, V-10, V-12) razen vzporednega ventila za ječmenovko (V-6). Ko je bil ventil za paro zaprt, je bil vzporedni ventil za ječmenovko zaprt in sterilni filter je bil priključen na zbiralno posodo, da bi bila tako preprečena kontaminacija z nesterilnim zrakom, ki vstopa v sistem, ki se ohlaja. Bioreaktorska plinska cev je bila ponovno priključena na V-17, ko je bila plinska cev obrata zaprta, da bi tako vzdževali pozitivni tlak med ohlajanjem sistema.

5.4 Zagon fermentacijskega sistema

Pivovarska ječmenovka je bila zbrana iz obrata v 20 l tlačno posodo iz nerjavečega jekla in segrevana v avtoklavu za 45 minut pri 100°C . Imobilizirane celice so bile aseptično prenešene v ohlajeno ječmenovko (40% v/v). Zapečaten posoda je bila transportirana v obrat Microbrewery Pilot Plant kjer je bil bioreaktorski sistem postavljen. 20 l posoda je bila priključena na hitro priključni fitting (Cornelius Anoka, MN, USA), ki je bil trdno vpet na ojačano 0.95 cm PVC cev (Cole-Palmer, ZDA). Drugi konec PVC cevi je bil trdno pripet na vzorčni ventil z membrano (V-8) v bioreaktorski steni. Filtrsko steriliziran

ogljikov dioksid je bil uporabljen pri 0.069 MPa v 20 l posodi in membranska vzorčna odprtina je bila odprta tako, da je bila zmes imobiliziranih celic transportirana iz posode v bioreaktor, ne da bi bil inokulum izpostavljen zunanjemu zračnemu okolju. Interne komponente 'hitro priključnih' fittingov 20 l posode so bile odstranjene, da bi bila tako preprečena zamašitev z imobiliziranimi celicami po prenosu v bioreaktor. Celotna porazdelitev velikosti delcev (pod normalno velikostjo) za kapa-karagenanske gelne kroglice je prikazana na sliki 5.8.1. Aritmetična sredina premera delcev, D_{pam} je bila izračunana na 1.252 mm in Sauter srednji premer delca, P_{psms} je bil 1.17 mm. Srednji premer delca je bil 1.255 mm. Eksperimentalni podatki in izračuni srednjega premera delca so podani v dodatku 1.

Po inokulaciji z imobiliziranimi celicami je bioreaktor obratoval v šaržnem načinu dokler niso koncentracije sladkorja in diacetila dosegle ciljnih manj kot 3°P v smislu specifične teže in manj kot 100 µg/l diacetila. Sistem je bila nato pripravljen za kontinuirno operiranje. Za spiranje z vročo vodo in parno sterilizacijo cevi za prenos ječmenovke so bili odprti ventili V-2 (ali V-4 za T-2), V-5 in V-6, medtem ko so bili ventili V-1 (ali V-3 za T-2) in V-7 zaprti ob izoliranju cevi za ječmenovko. Prenosna cev za ječmenovko je

bila sprana z vročo vodo pri približno 80°C, ki je bila dovedena skozi V-2 (ali V-4 za T-2). Po spiralnem ciklu z vročo vodo je bila obratna cev za paro priključena na enakem mestu in cev za prenos ječmenovke je bila sterilizirana s paro za najmanj 30 minut. V enakem času, ko je bila zaprta cev za paro, je bil zaprt tudi vzporedni 'bypass' ventil (V-6). Ko je bil sistem ohlajen, je bil V-2 (ali V-4 za T-2) zaprt in dovod pare je bil prekinjen. Ventil rezervoarja za ječmenovko, V-1 (ali V-3 za T-2), in vzporedni 'bypass' ventil (V-6) sta bila odprta in črpalka za prenos ječmenovke (P-1) je pričela obratovati. Ječmenovka je bila poslana v odvodnik preko vzporednega 'bypass' ventila (V-6) dokler ni bil kondenzat v cevi zamenjan z svežo mrzlo ječmenovko. V tem trenutku je bil vzporedni 'bypass' ventil zaprt in bioreaktorski vstopni ventil (V-6) na reaktorju je bil odprt ob pričetku kontinuirnega fermentacijskega procesa.

Vsaka dva tedna je bil rezervoar, ki je dobavljal ječmenovko, zamenjan med shranjevalnima posodama (T-1 in T-2). Po dveh tednih napajanja ječmenovke iz T-1 je bila kontinuirna napajalna črpalka, P-1 ustavljena in ventil (V-5) pri vhodu v bioreaktor je bil zaprt. Cev za transport ječmenovke je bila priključena na drugi rezervoar za shranjevanje

(T-2) in cev je bila sprana in sterilizirana kot je bilo opisano v prejšnjem poglavju. Kontinuirna fermentacija se je nato ponovno pričela po kratki zaustavitvi manj kot eno uro.

Tabela 5.1. Podroben opis posameznih delov pretočnega diagrama prikazanega na sliki 5.6; PTFE, politetrafluoroetilen, SS, nerjaveče jeklo.

Oznaka	Opis	Velikost	Mat. Konst.
BR-1	Bioreaktor	8l neto	316 SS
T-1	Rezervoar za shranjevanje ječmenovke	1600 l neto	316 SS
T-2	Rezervoar za shranjevanje ječmenovke	1600 l neto	316 SS
T-3	Rezervoar za shranjevanje ječmenovke	30 l neto	316 SS
P-1	Črpalka (peristaltična, nastavljiva hitrost) za prenos ječmenovke iz T-1 v BR-1	< 0.08 l/min	SS valjčki (angl. 'rollers') na Norprene® Food fleksibilni cevi
F-1	Filter za plin na izhodu T-1	< 4 bar	Polipropilen, 0.2 mikrometrška PTFE membrana
F-2	Filter za plin na vhodu T-1	< 2 bar	Polipropilen, 0.2 mikrometrška PTFE membrana

Tabela 5.1 (nadaljevanje). Opis posameznih delov za pretočni diagram prikazan na SL. 21.

Oznaka	Opis	Velikost	Mat. Konst.
F-3	Filter za plin na izhodu T-2	< 4 bar	Polipropilen, 0.2 mikrometrška PTFE membrana
F-4	Filter za plin na vhodu T-2	< 2 bar	Polipropilen, 0.2 mikrometrška PTFE membrana
F-5	Filter za plin na vhodu BR-1	< 2 bar	Polipropilen, 0.2 mikrometrška PTFE membrana
F-6	Filter za plin na izhodu T-3	< 2 bar	Polipropilen, 0.2 mikrometrška PTFE membrana
M-1	Regulator masnega pretoka za zrak v smeri BR-1	< '500 sccm'	316 SS, nylon, Viton®/O'-obročki
R-1	Rotameter za ogljikov dioksid v smeri T-1	< $0.28 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ (10 scfh)	316 SS, akrilni blok
R-2	Rotameter za ogljikov dioksid v smeri T-2	< $0.28 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ (10 scfh)	316 SS, akrilni blok
R-3	Rotameter za ogljikov dioksid v smeri BR-1	< $0.07 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ (2.5 scfh)	316 SS, akrilni blok
PR-1	Regulator tlaka za ogljikov dioksid v smeri T-1 & T-2	< 0.65 Pa	316 SS
PR-2	Regulator tlaka za ogljikov dioksid v smeri BR-1	< 0.69 Pa	316 SS
PR-3	Regulator tlaka za zrak v smeri BR-1	< 0.69 Pa	316 SS
V-1	Ventil (metuljčni) za ječmenovko v T-1	2.54 cm	316 SS, Viton® ski sedež
V-2	Ventil (metuljčni) za ječmenovko v CIP zanki v T-1	2.54 cm	316 SS, Viton® ski sedež
V-3	Ventil (metuljčni) za ječmenovko v T-2	2.54 cm	316 SS, Viton® ski sedež
V-4	Ventil (metuljčni) za ječmenovko v CIP zanki v T-2	2.54 cm	316 SS, Viton® ski sedež

Tabela 5.1 (nadaljevanje). Opis posameznih delov za pretočni diagram prikazan na SL. 21.

Oznaka	Opis	Velikost	Mat. Konst.
V-5	Ventil (kroglični) za ječmenovko na zbiralni cevi 'headerju'	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-6	Ventil (kroglični) za 'bypass' na BR-1 vstopu ječmenovke	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-7	Ventil (kroglični) za BR-1 vstop ječmenovke	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-8	Ventil (membranski vzorec) na steni BR-1	12 mm	316 SS, silikonski sedež
V-9	Ventil (metuljni) pri BR-1 izhodu piva	2.54 cm	316 SS, vitonski sedež
V-10	Ventil (membranski vzorec) za BR-1 izhod ječmenovke	12 mm	316 SS, silikonski sedež
V-11	Ventil (metuljni), sekundarni, pri BR-1 izhodu piva	2.54 cm	316 SS, vitonski sedež
V-12	Ventil (kroglični) za praznjenje tekočine iz T-3	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-13	Ventil (kroglični) za ogljikovo dioksidno linijo v smeri T-1 & T-2	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-14	Ventil (metuljni) za T-1 ogljikov dioksidni vhod	1.27 cm	316 SS, silikonski sedež
V-15	Ventil (metuljni) za T-2 ogljikov dioksidni vhod	1.27 cm	316 SS, silikonski sedež
V-16	Ventil (kroglični) za ogljikovo dioksidno linijo na BR-1	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-17	Ventil (hitri spust) za BR-1 plinski vhod	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež
V-18	Ventil (kroglični) za zračno linijo v smeri BR-1	0.635 cm	316 SS, silikonski sedež

Slika 5.7 prikazuje koncentracijo raztopljenega kisika v ječmenovki v odvisnosti od zadrževalnega časa v shranjevalni posodi za ječmenovko (T-1 ali T-2) pod različnimi pogoji polnjenja posode.

Tabela 5.2 Temperaturni profil vode v posodi za shranjevanje ječmenovke (T-1 ali T-2) po vzpostavljanju ravnotežja v treh dneh brez razprševanja ogljikovega dioksida in po 24 urah razprševanja ogljikovega dioksida pri pretoku $0.113 \text{ cm}^3/\text{h}$.

Mesto merjenja v cilindrokonični posodi	Temperatura (°C)	
	Brez CO ₂ prepihanja	S CO ₂ prepihanjem
10 cm pod površino tekočine in 10 cm od stene posode	20.6	0.4
10 cm pod površino tekočine in v centru posode	20.1	0.1
Dno cilindričnega področja in 10 cm od stene posode	3.8	3.7
Dno cilindričnega področja in v centru posode	3.7	4.1
Okolica pilotnega obrata	21.4	19.8

Slika 5.8.1. prikazuje celotno distribucijo velikosti delcev kapa-karagenanskih gelnih kroglic, ki vsebujejo imobilizirane celice kvasovk ($n=5$).

POGLAVJE 6. Kapa-karagenanska gelna imobilizacija lagerskega pivovarniškega kvasa
Znanstveniki so študirali vrsto matrikov za fizično omreženje celih celic vključno s kalcijevim alginatom (Bejar s sodelavci, 1992; Curin s sodelavci, 1987; Masschelein in Ramos-Jeunehomme, 1985; Nedovic s sodelavci, 1996; Shindo s sodelavci, 1994; White in Portno, 1978), agarozo (Hooijmans s sodelavci, 1990; Lundberg in Kuchel, 1997) in karagenanskimi geli (Norton s sodelavci, 1995; Wang s sodelavci, 1982). Karagenan je material dovoljen za uporabo v prehrambeni industriji in je bil favoriziran za celično kapsuliranje zaradi boljših mehanskih lastnosti v primerjavi z drugimi geli (Büyükgüngör, 1992).

V prvem delu tega poglavja je bila celična kolonizacija v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah spremljana med remi cikli ponavljajoče se šaržne fermentacije. Preiskovana je

bila sposobnost za preživetje imobiliziranih celic in celic sproščenih v tekočo fazo. Fermentacijski parametri vključno z etanolom, maltozo, maltotriozo, fruktozo in glukozo so bili spremljani med ponavljajočimi šaržnimi fermentacijami in nato primerjani s kontrolnimi fermentacijami z uporabo samo prosto suspendiranih kvasnih celic pod enakimi pogoji hranjenja.

Do danes je bilo publiciranih zelo malo informacij o fizičnih učinkih na celice po dolgi imobilizaciji (Virkajärvi in Kronlöf, 1998) in kontinuirnem izpostavljanju zunanjim silam in fermentacijskim produktom. Drugi del tega poglavja se ukvarja s preiskovanjem sposobnosti za preživetje, distribucijo celične populacije in fizično prisotnostjo celic kvasa imobiliziranih znotraj karagenanskih gelnih kroglic v razširjeni periodi kontinuirne fermentacije v bioreaktorju s plinskim vlekom. V razširjenih časovnih periodah je bil proučevan tudi relativni procent kvasa z nepopolnim dihanjem v imobilizirani in prosto suspendirani celični populaciji bioreaktorja.

Karagenan je izdelan iz ponavljajočih 3-6 anhidrogalaktoznih enot in razporejeni karagenani se razlikujejo po številu in poziciji sulfatnih esternih skupin na ponavljajočih se galaktoznih enotah. Shema karagenanskega gelirnega mehanizma je razvidna na SL. 22. Ko je karagenan v stanju sola, so njegove polisaharidne verige v naključni spiralni konfiguraciji. Ko se tvori dovolj spiral, ki omogočajo prečno zamreženje za kontinuirno mrežo, se zgodi geliranje. Ko nastane še več spiral ali, ko spirale tvorijo agregate, gel postane bolj trden in bolj tog (Rees, 1972).

Tri pogoste vrste karagenana so lambda, jota in kapa. Kot je prikazano na sliki 6.2, se razlikujejo v vsebnosti sulfatnega estra in količina sulfatnega estra bo vplivala na topnost polisaharidne verige. Lambda-karagenan je močno sulfoniran in nima sposobnosti tvorbe gela (Marrs, 1998). Jota-karagenan tvori visoko elastičen, šibek gel v prisotnosti kalcijevih ionov in ne kaže pomembne sinereze. Sinereza se zgodi, ko je težnja gela, da se nadalje tvori spirale ali agregate tako močna, da se mreža skrči in pri tem povzroči kapljanje tekočine (Rees, 1972). Kapa-karagenan je zmerno sulfoniran in tako tvori bolj trden in bolj tog gel v prisotnosti kalijevih ionov in bo nekoliko podvržen sinerezi. Povečana trdnost gela dosežena s kapa-karagenanom vodi do njegove primernosti za imobiliziranje celih celic kvasovk.

Slika 6.2 prikazuje kemijske strukture lambda, jota in kapa-karagenanov.

Pomembna značilnost karagenana so njegove reverzibilne termogelirne lastnosti. Karagenanska raztopina je ohlajena, viskoznost naraste in geliranje se zgodi. Ko je raztopina segreta, viskoznost pade in karagenan se pretvori nazaj v solno fazo. S kontroliranjem sestave gelirne kationske raztopine se temperatura, pri kateri se karagenan pretvori iz sola v gel, lahko spremeni. Kapa-karagenanska gelirna temperatura naraste z naraščanjem koncentracije kalijevega klorida v raztopini. Ta fenomen je bil uporabljen za projektiranje procesa za celično imobilizacijo, ker se je mogoče tako izogniti velikim temperaturnim fluktuacijam (Neufeld s sodelavci, 1996). Gelirna temperatura karagenana je lahko kontrolirana tako, da je dovolj visoka za gel pod fermentacijskimi pogoji, pa še vedno dovolj nizka, da bi lahko bile celice kvasa pomešane s karagenanom v njegovi sol fazi brez škodljivih učinkov na sposobnost za preživetje pred geliranjem kroglic.

Kljub temu obstajajo številni faktorji, ki nakazujejo potrebo po nadaljnem študiju učinkov imobilizacije znotraj gelnega matriksa na metabolizem in fiziologijo kvasne celice.

Imobilizirane celice niso izpostavljene enakemu mikro-okolju kot proste celice v tekoči fazi, ker so tukaj dodatne ovire iz gelnega matriksa in drugih omreženih kvasnih celic, ki morajo biti presežene, preden so lahko substrati transportirani na njihove površine (SL. 23). Obstajajo številne študije hitrosti snovnega prenosa znotraj gelnih matriksov (Etapé s sodelavci, 1992; Hannoun in Stephanopoulos, 1986; Korgel s sodelavci, 1992; Kurosawa s sodelavci, 1989; Merchant s sodelavci, 1987, Øyaas s sodelavci, 1995; Venâncio in Tiexiera, 1997) za boljše razumevanje potencialnih negativnih učinkov, ki jih omejitve hranjenja imobiliziranih celic lahko povzročajo na fermentacijske značilnosti. Učinkovite difuzivnosti majhnih molekul znotraj karagenanskega gela so primerljive z difuzivnostmi enakih molekul v vodi sami in gel dovoljuje molekularno difuzijo majhnih molekul, kot sta glukoza in etanol. Kakorkoli, v značilni imobilizirani celični fermentaciji so bili nutrienti hitro transportirani k imobiliziranim celičnim kroglicam pretežno s konvektivnim transportom poleg molekularne difuzije (Hannoun in Stephanopoulos, 1986). Enkrat ko hranljiva vstopijo v kroglice, je transport relativno počasen, ker dominira molekularna difuzija. To pomeni, da imajo kvasne celice na periferiji gelnih kroglic izrazito nutritivsko prednost pred tistimi v središču kroglic.

Starost imobiliziranega kvasa mora biti prav tako upoštevana. Omrežene celice se starajo, ko poteka kontinuirna fermentacija nekaj mesecev in fermentirajo pod določenimi psevdoravnotežnimi pogoji. Kakorkoli, med šaržno fermentacijo so celice kvasa izpostavljene

okolju, ki se spreminja s časom in celice so ponovno uporabljene samo za omejeno število fermentacij pred odstranitvijo. Več raziskovanja je potrebnega za študij dolgotrajnih učinkov kontinuirne fermentacije na sposobnost preživetja kvasnih celic v povezavi s fermentacijskimi značilnostmi. V delu A tega poglavja je bila proučevana kinetika kolonizacije kvasa v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah med tremi cikli ponavljajoče se šaržne fermentacije. Sposobnost za preživetje in celične koncentracije imobiliziranih in prosto suspendiranih celic so bile spremljane, skupaj z etanolom, stopinjami Platona in koncentracijo sladkorja.

V delu B so bili proučevani učinki časa fermentacije na celično pozicijo in distribucijo znotraj gelne kroglice ter morfologija kvasnih celic. Elektronska mikroskopija (SEM) je bila uporabljena za proučevanje kapa-karagenanskih imobiliziranih kvasnih celic v različnih področjih gelne kroglice pri štirih različnih časih: 1) takoj po nastanku kroglice; 2) po dveh dneh šaržne fermentacije; 3) po dveh mesecih kontinuirne fermentacije v pilotnem bioreaktorju s plinskim vlekem; 4) po šestih mesecih kontinuirne fermentacije v pilotnem bioreaktorju s plinskim vlekem. Sposobnost za preživetje kvasa in koncentracija v obeh imobilizirani in celicah v tekoči fazi so bile izmerjene. Prav tako je bil proučevan relativni procent kvasa z nepopolnim dihanjem (imobilizirane in proste celice v tekoči fazi) po petih mesecih kontinuirne fermentacije v bioreaktorju s plinskim vlekem in to je bilo primerjano s procenti najdenimi v tradicionalnih šaržnih fermentacijah piva. Proizvodnja lagerskega kvasa je bila uporabljena med celotno študijo.

6.1 Eksperimentalni postopek

Proizvodnja kapa-karagenanske gelne kroglice: kapa-karagenanski gel X-0909 je podarila firma Copenhagen Pectin A/S. Kapa-karagenanske gelne kroglice, ki vsebujejo omrežene lagerske kvasne celice, so bile proizvedene z uporabo statičnega mešalnega procesa z začetno koncentracijo celic 2.6×10^7 celic/ml gela (patentna prijava 2133789 (Neufeld s sodelavci, 1996)) in krogličnim premerom 0.5 do 2.0 mm.

Fermentacijski medij: Labatt Breweries iz Kanade je dobavil pivovarsko ječmenovko s specifično težo 17.5°P kot je podrobneje opisano v poglavju Materiali in metode.

Del A: Ponovljena šaržna kinetika imobiliziranega kvasa v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah

Fermentacije so bile izvedene v 2 l erlenmajericah pri 21°C, ob mešanju pri 150 obratih na minuto. Vsebnost nosilca je bila 40% (v/v) imobiliziranih celičnih kroglic v celotnem

fermentacijskem volumnu, ki je bil 1 l. Vsaka fermentacija je trajala 7 dni. V R1 so bile sveže imobilizirane celične kroglice cepljene v ječmenovko in na koncu fermentacije so bile te kroglice ločene iz fermentirane tekočine s prehodom mešanice skozi sterilno mrežo iz nerjevečega jekla (velikost odprtine v mreži 500 μm). Kroglice so bile nato ponovno cepljene v enakem razmerju v svežo, sterilno ječmenovko za drugo (R2) in nato za tretjo (R3) šaržno fermentacijo. Vzorčenje je potekalo dvakrat na dan prve tri dni, in nato enkrat na dan četrty in peti dan vsake fermentacije. Fermentacije so bile izvedene v dveh ali treh serijah. Vse fermentacije so bile izvedene s prosto suspendiranimi celičnimi kontrolnimi fermentacijami, ki so bile izvedene pod enakimi pogoji, razen tega, da so bile samo proste celice cepljene v fermentacije pri hitrosti 4 g/l. Vzorci so bili analizirani na sposobnost za preživetje in celično koncentracijo prostih in imobiliziranih celic ter na koncentracije ogljikovih hidratov in etanola v tekoči fazi.

Dobitni faktorji, $Y_{P/S}$ produkta etanola iz v celoti fermentirajoče glukoze substrata, so bili izračunani z uporabo enačbe 3.20 za tri imobilizirane celično fermentacijske cikle in prosto celično kontrolo. Za vse fermentacije so bili dobitni faktorji izračunani od začetka fermentacije do časa, ko je bila poraba maltoze popolna.

Produktivnost etanola, V_{etanola} , količina etanola proizvedena na celotni delovni volumen bioreaktorja na enoto fermentacijskega časa, je bila izračunana z uporabo enačb 3.25 za R1, R2 in R3 in prosto celično kontrolo od začetka fermentacije do časa, ko je bila poraba maltoze kompletna. V primeru dobitnih faktorjev in produktivnosti etanola, prispevki imobiliziranih in prosto suspendiranih celic niso bili medseboj razločeni.

Lokalna maksimalna specifična hitrost rasti, μ_{max} in čas za podvojitev celice so bili izračunani za povprečno kontrolo prostih celic z uporabo enačb 3.3 in 3.4.

Del B: Preživelost in morfološke karakteristike imobiliziranega kvasa v razširjenem fermentacijskem času pri pogojih šaržne fermentacije: Šaržne fermentacije so bile izvedene v 2 l erlenmajericah pri 21°C ob mešanju pri 150 obratih na minuto. Vsebnost nosilca je bila 40% (v/v) v celotnem fermentacijskem volumnu 1 l.

Kontinuirni fermentacijski pogoji: Pilotni bioreaktorji z notranjo zanko in plinskim vlekom so bili uporabljeni za kontinuirne fermentacije. Vsi podatki zbrani iz bioreaktorja z delovnim volumnom 8 l, razen 2 mesečnih slikovnih elektronskih mikrografov, so bili zbrani za 50 l bioreaktor z uporabo istega fermentacijskega medija in imobilizacijske metode. Imobilizirane celične kroglice pri 40% (v/v) so bile fluidizirane v bioreaktorjih z

uporabo zmesi zraka in ogljikovega dioksida. Bioreaktorji so obratovali pod spremenljivimi pogoji s fermentacijskimi temperaturami kontroliranimi pri 12, 17 in 22°C in zadrževalnimi časi med 0.9 in 1.8 dnevi. Reaktor s plinskim vlekrom je dosegel maksimalno koncentracijo etanola 73 kg/m³ med šest-mesečnim eksperimentom, s povprečno koncentracijo 58 kg/m³.

Mikrobiološke analize: vzorci so bili odvzeti iz tekoče faze bioreaktorja s plinskim vlekrom najmanj enkrat na teden, da bi bili testirani na kontaminante vključno z divjim kvasom, nelagerskim kvasom in aerobnimi in anaerobnimi bakterijami, ki pokvarijo pivo. Po petih mesecih so bile kvasne celice v tekoči fazi analizirane in podvojene za nepopolno dihalno mutacijo.

Elektronska mikroskopija (SEM): Kapa-karagenanske gelne kroglice (1.0 – 1.5 mm premera) z imobiliziranimi lagerskimi kvasnimi celicami so bile vzorčene za SEM preiskavo v štirih različnih časih: 1) po nastanku imobilizirane celične kroglice in pred inokulacijo kroglic v fermentacijski medij; 2) po 2 dneh šaržne fermentacije; 3) po dveh mesecih kontinuirne fermentacije v pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom; 4) po 6 mesecih kontinuirne fermentacije v pilotnem bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekrom. Metodologija uporabljena za SEM in podobno pripravo vzorcev je opisana v poglavju 4.7.

Z uporabo metod opisanih v poglavju 4.6, je bila celična koncentracija in preživelost (imobiliziranih in prosto suspendiranih) določena v enakem času kot SEM.

6.2 Rezultati in Diskusija

Del A: Ponovljene šaržne kinetike imobiliziranega kvasa v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah

Fermentacijski čas je bil precej znižan vsakič, ko so bile imobilizirane celice ponovno cepljene v svežo ječmenovko, kot je razvidno iz slik 6.4 (a), (b) in (c), ki prikazujejo odvisnost maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola od fermentacijskega časa za tri ponavljane šaržne fermentacijske cikle. Iz teh slik je razvidno, da je bil čas za popolno porabo sladkorja 64 ur za R1, 44 ur za R2 in 26 ur za R3. Kontrola fermentacije prosto suspendiranih celic, ki ni vsebovala imobiliziranih celičnih kroglic, prikazana na sliki 6.5, je potrebovala 82 ur za popolno porabo sladkorja. Iz grafov na sliki 6.4 je prav tako razvidno, da so bile najvišje končne koncentracije etanola v tretji od treh ponovljenih

etanola bilo vseeno navzetega v kroglice, ko so bile ponovno cepljene v svežo ječmenovko. Posledično je bilo pri času nič za R2 in R3 nekaj etanola prisotnega v fermentacijski tekočini in začetna koncentracija glukoze, maltoze, maltotrioze in fruktoze je bila nižja v imobiliziranih celičnih fermentacijah (slika 6.4) v primerjavi s kontrolno prosto celično fermentacijo, kot je prikazano na sliki 6.5. Tako so bili dobitni faktorji izračunani za fermentacije tako, da je lahko dobiček, g etanolne produkcije na g porabljenega sladkorja, obravnavan na primerljivi osnovi.

Opis slik:

Slika 6.4. a) R1; koncentracije maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

Slika 6.4. b) R2; koncentracije maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

Slika 6.4. c) R3; koncentracije maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

Slika 6.5. Koncentracija maltoze, maltotrioze, glukoze, fruktoze in etanola v odvisnosti od časa fermentacije za kontrolne fermentacije s prosto suspendiranim lagerskim kvasom (brez imobiliziranih celic).

Sliki 6.6 (a) in (b) primerjata koncentraciji maltoze oz. etanola v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3. Med ponavljanjem R1 je bila maltoza navzeta na kvasne celice skoraj v trenutku po cepljenju v svežo ječmenovko. Etanolne koncentracije so dosegle njihov vrh prej v ponovljeni R1 in so prav tako dosegle višje koncentracije kot prvi dve šaržni fermentaciji. Kot je prikazano na sliki 6.6 (b), je bila začetna lag faza v proizvodnji etanola v R1 drastično znižana, ko so bile te imobilizirane celice ponovno cepljene v R2 in nadalje reducirane po ponovnem cepljenju za R3.

Opis slik:

Slika 6.6. a) Koncentracija maltoze v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije R1, R2 in R3 ob uporabi lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

Slika 6.6. b) Koncentracija etanola v odvisnosti od časa fermentacije za ponovljene šaržne fermentacije, R1, R2 in R3 ob uporabi lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

Slika 6.7 (a) prikazuje koncentracijo imobiliziranih celic v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3. Proste celice, ki so bile sproščene iz imobiliziranega celičnega matriksa v glavno maso tekoče faze v teh fermentacijah v odvisnosti od časa, so prikazane na sliki 6.7 (b). Na sliki 6.7 (c) so prikazane celotne imobilizirane in proste kvasne celice v volumnu reaktorja za tri šarže. Slika 6.7 (a) prikazuje, da je koncentracija imobiliziranih celic v kapa-karagenanskem gelu še nadalje naraščala po njeni začetni inokulaciji v ječmenovki za R1. Ko so bile kroglice ponovno cepljene v svežo ječmenovko za ponovljen R2, se je rast nadaljevala v gelnih kroglicah. Tretjič, ko so bile kapsulirane celice ponovno cepljene v svežo ječmenovko, se je hitrost povečevanja v imobilizirani celični koncentraciji upočasnila. Koncentracijski profil prostih celic sproščenih iz kapa-karagenanskega gelnega matriksa v glavno maso tekoče faze imobiliziranih celic in celotnih celic v fermentaciji za R1 je prikazan na sliki 6.8.

Opis slik:

Slika 6.7. a) Povprečna koncentracija imobiliziranih lagerskih kvasnih celic v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za fermentacije R1, R2 in R3. Odkloni prikazujejo zgornje in spodnje limitne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 6.7. b) Koncentracija lagerskih kvasnih celic sproščenih v glavno maso tekoče faze v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije. Odkloni prikazujejo zgornje in spodnje limitne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 6.7. c) Celotna koncentracija (imobiliziranih in v tekoči fazi) lagerskih kvasnih celic v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije. Odkloni prikazujejo zgornje in spodnje limitne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 6.8. Profil imobilizirane, v tekoči fazi in celotne (imobilizirane in v tekoči fazi) celične koncentracije v odvisnosti od časa fermentacije za R1, prvo od treh ponovljenih šaržnih fermentacij z uporabo lagerskih kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah.

V R1 je koncentracija imobiliziranih celic v kapa-karagenanski gelni krogeljci naraščala s podobno hitrostjo kot v kontrolni fermentaciji, ki je vsebovala samo celice v tekoči fazi. To je bilo potrjeno s primerjanjem krivulje povprečne rasti prostih celic v kontrolnih fermentacijah na sliki 6.9 s podobno rasno krivuljo celic imobiliziranih v karagenanu v R1 na sliki 6.10. Med R1 gelne krogeljce še niso bile popolnoma kolonizirane in gelni matriks ni kazal inhibirajočega učinka na rast celic v krogljicah. Pri R2 je matriks že kazal zaviralno vlogo pri rasti celic v gelni krogeljci, kar se je odražalo v počasnejšem naraščanju števila celic med tem fermentacijskim ciklom. To bi lahko bilo posledica narave gela ali kopičenja gelnih celic v krogljicah ali nezadostne preskrbe celic s hranljivom.

Opis slik:

Slika 6.9. Povprečna koncentracija ($n=3$) prosto suspendiranih lagerskih kvasnih celic v kontrolni fermentaciji v celotnem volumnu bioreaktorja v odvisnosti od časa fermentacije. Med to fermentacijo ni bilo prisotnih imobiliziranih celic.

Slika 6.10. Koncentracija imobiliziranega lagerskega kvasa na ml gelnih krogeljic v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije. Odkloni prikazujejo zgornje in spodnje limitne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

V tabeli 6.1 so prikazani dobitki etanola iz substratnih fermentirajočih sladkorjev, $Y_{P/S}$ za tri šaržne generacije in kontrolo. V tabeli 6.2 so bile prav tako podane bioreaktorske volumske produktivnosti etanola izračunane z uporabo podatkov podanih v tabeli 6.1. Dobitki etanola iz sladkorjev za fermentacije niso bili pomembno različni medseboj ali od kontrole. Dobitki so bili vsi nad 90% teoretičnega dobitka 0.51, predvidevanega na osnovi enačbe Guy-Lussaca. Kot je bilo omenjeno predhodno, proizvodnja biomase in drugih stranskih produktov nastalih poleg kvasnih celic preprečuje učinkovitosti višje od teoretičnih 95% (Hardwick, 1995). Volumetrična bioreaktorska produktivnost etanola v treh ponovljenih šaržnih fermentacijah se je pomembno razlikovala od šarže do ponovljene šarže. Produktivnost etanola je narasla z vsakim ciklom ponovljene šaržne fermentacije in, pri R3 so bile imobilizirane celice bolj produktivne kot kontrolna fermentacija. Celotna količina etanola proizvedenega v R2 ni bila pomembno višja kot količina proizvedena med R1, vendar je bil čas fermentacije manj kot polovica časa za R1 in kontrolne fermentacije.

Tukaj je veliko faktorjev, ki bi lahko prispevali k tej povišani fermentacijski hitrosti imobiliziranih celic z vsako ponovitvijo šarže, kot je adaptacija kvasnih celic na

fermentacijske pogoje in progresivno naraščanje celične koncentracije. Celotno število celic na volumen bioreaktorja postane pomembno višje kot število celic kontrole pri R3. Na sliki 6.7 (b) je graf koncentracije prosto suspendiranih celic (sproščenih iz gelnega matriksa) v glavni masi tekočine v odvisnosti od časa fermentacije pokazal, da je število celic sproščenih iz gelnih kroglic naraslo z vsako naslednjo šaržno generacijo. Ko postanejo kroglice bolj polno napolnjene s celicami, le te sprostijo več celic v glavno maso tekočine. Hüskens s sodelavci (1996) je izvedel študije, ki obravnavajo razširitev bakterijske celične kolonije in izbruh/sprostitev iz kapa-karagenanskih gelnih delov. Vives s sodelavci (1993) je poročal, da je bila maksimalna koncentracija kvasnih celic, ki so jo dosegli v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah, 10^9 celic na gram gela, to je koncentracija, ki je bila dosežena v gelnih delcih pri R2. Podobne maksimalne celične koncentracije so bile najdene med kontinuirnimi fermentacijami v delu B. Kakorkoli, maksimalne vsebnosti celic v gelnem matriksu bodo odvisne od začetne vsebnosti celic, sestave gela in drugih faktorjev.

Tabela 6.1. Dobitek, $Y_{P/S}$ produkta, P, etanol iz substratov, glukoza (Glc), fruktoza (Frc), maltoza (Mal) in maltotrioza (DP3) za R1, R2, R3 in kontrolno fermentacijo prosto suspendiranih celic.

Šaržna fermentacija	t_f^* (h)	t_o	Glc _f (kg/m ³)	Frc _f	Mal _f	DP3 _f	P _f	Glc _o	Frc _o	Mal _o	DP3 _o	P _o	$Y_{P/S}$
R1	64.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	50.1	13.0	3.0	60.0	17.4	0.0	0.5
R2	44.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	49.0	9.7	2.0	54.3	15.7	11.0	0.5
R3	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	54.0	8.9	2.8	52.0	16.0	14.0	0.5
Prosto celična 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

*Simbol t_f je čas v urah potreben za popolni navzem maltoze in podpis f se nanaša na koncentracijo danega analita pri času $t = t_f$.

Tabela 6.2. Bioreaktorska produktivnost etanola [$V_{\text{etanol}} = (\text{kg proizvedenega etanola})/(\text{m}^3 \text{ bioreaktorskega volumna} \cdot \text{h})$] za imobilizirane celične fermentacije v šarži (R1, R2 in R3) v primerjavi s prosto suspendiranimi celičnimi šaržnimi fermentacijami.

Fermentacija	V_{etanol} (kg/m ³ h)*
R1	0.470
R2	0.668
R3	1.246
Prosto celična kontrola	0.805

*izračunano, ko je navzem maltoze kompleten.

Naslednji faktor, ki je vplival na povečano bioreaktorsko volumetrično produktivnost in, ki je bil opažen pri vsaki ponovljeni šaržni fermentaciji, vključuje adaptacijo oz. prilagoditev kvasnih celic. Ob koncu prve fermentacije so celice kvasa vzpostavile njihov metabolni mehanizem v danih fermentacijskih pogojih. To lahko vodi do zmanjšane lag faze na začetku naslednjih šaržnih fermentacij, ob povečani hitrosti fermentacije. Med to študijo so bile vse kontrolne fermentacije izvedene s sveže pripravljenim lagerskim kvasom. Bilo bi zanimivo ponovno cepiti prosto suspendiran kontrolni kvas ob ponovnem cepljenju

imobiliziranih celic za nadalnje proučevanje tega učinka relativno na učinke celične koncentracije.

Slika 6.11 kaže, da je bila sposobnost za preživetje imobiliziranih celic, z uporabo metilensko modre metode kot indikatorja, nizka ($<50\%$), ko so bile imobilizirane celice na začetku cepljene v ječmenovko v primeru R1, sposobnost za preživetje imobiliziranih celic pa je bila nad 90% po 48 urah fermentacije. Celice kvasa hitro koloniziranih kroglic, in sposobnost za preživetje je ostala visoka med R3. Kakorkoli, pri ponovljenem R3, je sposobnost za preživetje ponehaval po časi proti koncu fermentacije. Kakorkoli, med vsemi tremi ponovljenimi šaržnimi fermentacijami, so imele proste celice, ki so bile sproščene v glavno maso tekočega medija višjo sposobnost za preživetje kot njihovi imobilizirani nasprotniki. Imobilizacijski matriks lahko ima negativni učinek na sposobnost za preživetje kvasnih celic (omejitve prenosa snovi in/ali prostorske omejitve), ali žive kvasne celice so lahko preferenčno sproščene iz imobilizacijskega matriksa v glavno maso tekočega medija v primerjavi z ne-živimi celicami.

Z uporabo povprečnih podatkov treh ločenih kontrolnih fermentacij prosto suspendiranega kvasa, ki se nahajajo v dodatku 1, je na sliki 6.12 podana odvisnost $\ln(X/X_0)$ od časa fermentacije. Naklon je identičen lokalni maksimalni specifični hitrosti rasti celic pri 21°C v pivovarski ječmenovki, ob mešanju pri 150 obratih na minuto. Ugotovljena lokalna maksimalna specifična hitrost rasti kvasa je bila 0.096 h^{-1} in čas podvojitve celice je bil 7.22 ure. $\mu_{\max}$ ugotovljen v tem delu je bil definiran kot lokalna $\mu_{\max}$, ker, kot je bilo omenjeno v poglavju o teoriji, je bilo mogoče dejansko $\mu_{\max}$ uporabljeno v Monodovi enačbi doseči samo, ko je bil S pomembno večji kot Monodova konstanta K_S . Za določitev Monodove konstante K_S limitnega substrata v teh fermentacijah je potrebnega več dela, da bi tako potrdili, da je bila izračunana lokalna $\mu_{\max}$ resnični maksimum, kot je definirano z Monodovo enačbo.

Opis slik:

Slika 6.11. Preživelost (metilensko modro) imobiliziranih lagerskih kvasnih celic v odvisnosti od časa fermentacije za R1, R2 in R3 fermentacije.

Slika 6.12. $\ln(X/X_0)$ v odvisnosti od časa šaržne fermentacije med eksponentno fazo rasti povprečnih kontrolnih fermentacij prosto suspendiranega kvasa, kjer je X celična koncentracija pri času t in X_0 , celična koncentracija pri času $t=0$ ($n = 3$).

Del B: Preživelost in morfološke karakteristike imobiliziranega kvasa v razširjenem fermentacijskem času. Preden so bile gelne kroglice izpostavljene fermentacijskemu mediju in po produkciji imobiliziranih celičnih kroglic z uporabo statičnega mešalnega procesa je bila koncentracija 2.6×10^7 celic/ml gelnih kroglic (tabela 6.3 kjer so vrednosti povprečne vrednosti dveh vzorcev). SEM kaže, da so celice individualno in enakomerno porazdeljene v gelni kroglici (SL. 24).

Tabela 6.3. Preživelost (metilensko modra) in koncentracija prosto suspendiranih in imobiliziranih lagerskih kvasnih celic omreženih v kapa-karagenanske gelne kroglice v času fermentacije.

Čas	Fermentacijski način	Prosto suspendiran kvas v tekoči fazi		Imobiliziran kvas v gelni fazi	
		Preživelost (%)	Celična koncentracija (celice/ml v tekočini)	Preživelost (%)	Celična koncentracija (celice/ml v tekočini)
0	n/a	n/a	n/a	n/a	$2.6E+07$
2 dni	Šaržni	98	$5.5E+07$	92	$2.35E+08$
2 meseca	Kontinuirni	93	$2.35E+08$	76	$8.60E+08$
6 mesecev	Kontinuirni	92	$2.11E+08$	<50*	$1.40E+09^*$

*Na osnovi posameznega vzorca.

Preživelost je bila >90% 2 dni po šaržni fermentaciji in celična koncentracija v gelni kroglici se je povečala za deset-krat (tabela 6.3). Celice (>90% žive) so se prav tako pričele sproščati iz gela v glavno maso tekoče faze fermentacije, kar je dalo koncentracijo 10^7 celic /ml tekočine. Majhne kolonije kvasa so se tvorile znotraj gelnih kroglic s številnimi klicami prisotnimi na individualnih celicah, kot je mogoče videti na SL. 25.

Preživelost imobiliziranih kvasnih celic se je zmanjšala po 2 mesecih kontinuirne fermentacije v bioreaktorju s plinskim vlekem (tabela 6.3), ampak celice v glavni masi tekoče faze so ostale še vedno zelo žive (>90%) in to odkritje je bilo potrjeno med številnimi različnimi kontinuirnimi fermentacijami v pilotnih bioreaktorjih s plinskim

vlekom. SEM na SL. 26 je pokazala, da so pri dveh mesecih nastale velike kolonije kvasa v smeri periferije kroglice, kar potrjuje rezultate drugih raziskovalcev (Bancel in Hu, 1996; Gòdia s sodelavci, 1987; Wada s sodelavci, 1979; Wang s sodelavci, 1982). Primerjava morfologije kvasa pozicioniranega v smeri zunanjega roba imobilizirane celične kroglice s kvasom pozicioniranim v centru gelne kroglice je bila napravljena na številnih vzorcih z uporabo SEM snemanja. Celice, ki so se nahajale v smeri periferije kroglic so bile jajčaste in gladke s številnimi klicami (SL. 27), kar nakazuje multiplikacijo kvasa (Smart, 1995). Celice, ki so bile posnete v centru kroglice (SL. 28) so se zdele slabo oblikovane in so kazale majhno jasnost tvorbe klic. Pomanjkanje klic je lahko pokazatelj pomanjkanja hranljiv, kot je kisik, v centru kroglic. Površinske nepravilnosti opažene na površini kvasa na SL. 28, so lahko prav tako pokazatelj celičnega staranja (Barker in Smart, 1996; Smart, 1999).

Preživelost kvasa imobiliziranega v karagenanskem gelu je padla pod 50% po šestih mesecih kontinuirne fermentacije v bioreaktorju s plinskim vlekom (tabela 6.3). Omenjeno mora biti da, medtem ko je bila samo ena podatkovna točka za koncentracijo imobiliziranih celic in preživelost zbrana pri šestih mesecih, je bil podatek pri petih-mesecih podoben, s koncentracijo imobiliziranih celic 1.14×10^9 celic/ml gela in preživelostjo <50%. Medtem ko je bilo opaženo postopno znižanje preživelosti imobiliziranih celic v času, je ostala preživelost celic v glavni masi tekoče faze relativno visoka. Nadalje, čeprav so bile preživelosti imobiliziranih celic nizke v kroglicah kot celotah, pa je bioreaktor proizvedel popolnoma fermentirano pivo v šestih mesecih kontinuirnega obratovanja. Mogoči razlogi za to ugotovitev vključujejo pomemben prispevek zelo živih prosto suspendiranih kvasnih celic k fermentaciji. Prav tako gre za potencialni prispevek živih imobiliziranih celic lociranih na periferiji gelne kroglice, kjer je manj omejitev prenosa snovi v primerjavi s celicami lociranimi v centru kroglice. Še vedno je nejasno, ali so imele imobilizirane celice sposobnost prerazporediti same sebe v gelnem matriksu ali so ostale te celice stacionarno tam kjer so bila najprej nameščene. Koncentracija 10^9 celic/ml v gelni kroglici je bil maksimum dosežen v teh kroglicah v šest-mesečni periodi kontinuirne fermentacije. Na SL. 29 je bila cela kroglica posneta z uporabo SEM. Ta kroglica je imela prazen center in od številnih kroglic, ki so bile proučevane, jih je približno polovica kazala to strukturo. Prazna votlina bi bila lahko rezultat degradacije karagenanske gelne strukture in bi bila lahko nadalje pospešena s SEM pripravo. Ta prazna votlina ni bila opažena v svežih

krogličnih pripravkih. Predhodno delo drugih (Bancel s sodelavci, 1996) je pokazalo, da so rastoče celice povzročile slabljenje gelne mreže. Audet s sodelavci (1988) je poročal, da je dodatek lepila rozičevega zrna (angl. 'locust bean gum') h kapakaragenanu spremenil mehansko moč gelnih kroglic za imobilizacijo bakterij.

V celih šestih mesecih eksperimenta fermentacije piva, je bil bioreaktor s plinskim vlekcom testiran najmanj enkrat na teden na kontaminacijo. Med celotnim potekom eksperimenta, bakterijski kontaminanti niso bili detektirani. V zadnjih dveh mesecih poskusa je bil detektiran kontaminacijski kvas v koncentracijah, ki so se spreminjale med 1 in 5 cfu/ml. Ta kvas je bil sposoben rasti na PYN mediju pri 37°C, vendar pa ni rasel na aerobno ali anaerobno na DUBA mediju (selektivnem za bakterije), ni fermentiral dekstrinov in ni kazal rasti na CuSO₄ mediju (selektivnost na divji kvas).

Po petih mesecih je bil povprečen procent kvasnih celic z 'nepopolnim dihanjem' 7%, kar je višje kot je običajno ob uporabi te vrste med industrijskimi šaržnimi fermentacijami (2% povprečno). Drugi raziskovalci so poročali o podobnih odkritjih (Norton in D'Amore, 1995). Kvas z nepopolnim dihanjem izhaja iz mutacije, ki povzroča, da je le ta nesposoben presnavljati glukozo v ogljikov dioksid in vodo. Takšne kvasovke imajo mitohondrije z neprestano oslABLJENO aktivnostjo, ki se pojavi navadno zaradi mutacije mitohondrialne DNA (Hrdwick, 1995).

Artifakti iz SEM priprave vzorca lahko povzročajo zmedo. Tehnologiji, kot je nuklearna magnetna resonančna (NMR) spektroskopija (Fernandez, 1996) in konfokalna mikroskopija (Bancel in Hu, 1996) sta bili uporabljeni za nenasilno proučevanje imobiliziranih celic. NMR snemalne tehnike so omogočale raziskovalcem študij transporta, pretoka in porazdelitve v prostoru celic in biokemikalij v biofilmih. Raziskovalci (Bancel in Hu, 1996) so prav tako pokazali, da je lahko konfokalna laserska snemalna mikroskopija uporabna za opazovanje celic imobiliziranih v poroznih gelnih mikronosilcih skozi serijsko optično 'rezanje'.

Čeprav je bilo metilensko modro uporabljeno kot standardni indikator preživetja celic v pivovarski industriji, ima metoda številne pomanjkljivosti (Mochaba s sodelavci, 1998). Meri ali je populacija kvasovk živa ali ne-živa osnovi sposobnosti živih celic, da oksidirajo barvilo v brezbarvno obliko. Ne-žive celice nimajo sposobnosti oksidiranja barvila in zato ostaja modro (O'Connor-Cox s sodelavci, 1997). Tehnike na osnovi mikroskopskih preparatov za štetje in plošč s kulturami temeljijo na sposobnosti celic, da rastejo in

proizvajajo makrokolonije na agarnih ploščah ali mikrokolonije na medijih pokritih z mikroskopskimi ploščami (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Neprestano proučevanje preživetja kvasovk v imobiliziranih matriksih v daljših časovnih periodah v Labattu, sedaj ne temelji samo na metodi z metilensko modrim, ampak tudi prej omenjenih metodah kot tudi na razvijajoči konfokalno mikroskopski tehniki z uporabo potrebnega barvanja. Poleg merjenja preživelosti celic, je potrebno v prihodnjem delu povdariti tudi vprašanje vitalnosti (angl. 'vitability') imobiliziranih celic. Kjer je bilo preživetje uporabljeno za opis sposobnosti celic za rast in reprodukcijo, je vitalnost merilo za fermentacijske lastnosti kvasovk, aktivnost ali sposobnost kvasovk, da si opomorejo od stresa (Smart s sodelavci, 1999).

POGLAVJE 7. PROIZVODNJA AROME V KONTINUIRNEM FERMENTACIJSKEM SISTEMU ZA PIVO S PLINSKIM VLEKOM

7.1 Eksperimentalni postopek

Uporaba kontinuirne fermentacije za proizvodnjo piva se zelo razlikuje od drugih postopkov z uporabo imobiliziranih celic, ker nastali produkt ni merjen v smislu ene komponente, ki nas zanima, kot je etanol. Prej je pomembno ravnatežje številnih kemijskih spojin, ki morajo biti v ravnatežju, da bi dale kvaliteten končni produkt. Proučevani so bili učinki kisika na kvasne metabolite z aromo med kontinuirno primarno fermentacijo in med drugo šaržno zadrževalno periodo. Učinek zadrževalnega časa na metabolite z aromo je bil prav tako proučevan na dveh nivojih. Končno, komercialni encimatski pripravek alfa-acetolaktatne dekarboksilaze je bil dodan kontinuirni fermentaciji ječmenovke in spremljana je bila celotna diacetilna koncentracija v tekoči fazi.

7.1.1 Učinek relativnih količin zraka v biorektorskem fluidizirnem plinu na kvasne metabolite med primarno kontinuirno fermentacijo

Količina zraka in zato kisika v biorektorskem fluidizirnem plinu se je spreminjala z zadrževalnim časom, temperaturo, medtem ko so bile druge kontrolirajoče procesne spremenljivke konstantne. Celotna volumska pretočna hitrost plina je bila držana konstantno 472 ml/min pri STP, temperatura je bila 15°C, in kapa-karagenanske gelne kroglice, ki so vsebovale imobilizirane LCC3021 kvasovke, so bile uporabljene med poskusom z začetno celično vsebnostjo 1×10^8 celic/ml gela. Med poskusom so bile v

sistemu uporabljene štiri različne volumnske pretočne hitrosti zraka (tabela 7.1) in povprečni zadrževalni čas v bioreaktorju, R_t , je bil 1.18 dni.

Tabela 7.1 Zračne volumnske pretočne hitrosti dovedene v bioreaktor z razpršilnikom med kontinuirno fermentacijo. Celotna volumnska pretočna hitrost dovedena bioreaktorju je bila 472 ml/min pri STP, pri čemer je ogljikov dioksid nadomeščal preostanek zraka.

Volumnska pretočna hitrost zraka (ml/min)	Procent zraka v fluidizirnem plinu (%v/v)	Pričetek (dan)	Konec (dan)	Celotni čas (dnevi)
94	19.9	10	26	17
354	75.0	27	40	14
34	7.2	41	58	18
0	0	59	66	8

Naslednje analize so bile izvajanjem s ponavljanjem med eksperimentom: prosti amino dušik (FAN), celotni fermentabilni ogljikovi hidrati (kot glukoza), etanol, celotni diacetil, hlapne spojine v pivu (izbrani estri in alkoholi), koncentracija kvasnih celic v tekoči fazi in preživelost. Bioreaktor je bil prav tako testiran na kontaminacijo minimalno enkrat na teden.

Koncentracija raztopljenega kisika v glavni masi tekoče faze bioreaktorja je bila izmerjena, ko je bilo predpostavljeno, da je kontinuirna fermentacija v psevdo-ravnotežnem stanju pri vsaki volumnski pretočni hitrosti zraka (minimalno tri čase potrebne za predelavo reaktorjevega volumna reaktantov).

7.1.2 Pofermentacijska šaržna zadrževalna perioda: Učinki izpostavitve kisiku na kvasne metabolite

Celo, ko je bila količina kisika v bioreaktorjevem fluidizirnem plinu relativno nizka (34 ml/min pri STP), so bile koncentracije acetaldehida in celotnega diacetila ugotovljene med eksperimentom izvedenem v poglavju 7.1.2, nesprejemljivo visoke za severno ameriški trg lagerskega piva. Zato je bil vpeljan nov način, kjer je bila tekočina odvzeta iz kontinuirnega primarnega bioreaktorja zadržana v šarži za 48 ur pri nekoliko povišani temperaturi 21°C, da bi bila tako reducirana koncentracija teh dveh spojin. Prav tako, so rezultati iz prejšnjega poglavja 7.1.2 nakazali pomemben učinek, ki ga je imela količina

zraka v fluidizirnem plinu na izmerjene spojine z aromo. Zato je bil proučevan učinek aerobnih v primerjavi z sledečimi anaerobnimi pogoji primarne fermentacije, ko je potekalo sekundarno šaržno zadrževanje, na kvasne metabolite z aromo.

Kontinuirna primarna fermentacija je bila izvedena v 50 l bioreaktorju s plinskim vlekem z uporabo visoko kosmičaste vrste LCC3021 kvasovk, ker je bil zahtevan volumen za ta študij prevelik glede 8 l volumen bioreaktorja. Pogoji obratovanja so bili 1180 ml/min CO₂ in 189 ml/min zraka pri STP v fluidizirnem plinu, povprečni zadrževalni čas v bioreaktorju, R_t je bil 1.0 dan, temperatura 15°C in visoka teža 17.5°P lagerske pivovarske ječmenovke.

Skupno so bili odvzeti 4 vzorci (100 ml 'nagubane' kivete), pri čemer sta bili dve izpostavljeni anaerobnim pogojem in druge dve aerobnim pogojem.

Anaerobni postopek vzorčevanja je bil naslednji: dve 100 ml 'nagubani' kiveti in šest 25 ml 'nagubanih' kivet je bilo izpostavljenih postopku v avtoklavu in nato postavljenih v anaerobni 'boks' (Labmaster 100, mbraun, ZDA) z argonom kot preprihovalnim plinom. 100 ml kivete so bile nato prepuščene, da bi bilo vzpostavljeno ravnotežje za 45 minut in nato so bile trdno zaprte z aluminijastimi pokrovčki in Teflon®skimi septami. 50 ml brizgalka, opremljena s 7.62 cm , '16 gauge' iglo, sanitizirana s 70% (v/v) etanolno raztopino, je bila uporabljena za odvzem vzorca iz bioreaktorja s prebodom septe membrane vzorčevalnega ventila in vzorec je bil vbrizgan v 100 ml predčiščene anaerobne kivete. Potrebno je bilo priskrbeti odprtino v 'nagubani' kiveti, z dodatno sterilno vbrizgalno iglo, ki je dovoljevala spuščanje tlaka v kiveti med polnjenjem. Aerobni vzorci so bili izpostavljeni atmosferi, ko so bili potegnjeni iz bioreaktorja s polnim odprtjem membranskega vzorčnega ventila v 100 ml nezatesnjenih vzorčnih kivetah, brez uporabe brizgalke in igle.

Vzorčna tekočina je bila počivala pri sobni temperaturi za 2 uri z namenom, da bi se tako kvasovke izločile iz raztopine, pri čemer bi ostala koncentracija celic v glavni masi tekoče faze 10⁶ celic/ml. Po usedanju, je bila tekočina iz vsake 100 ml kivete oddekanirana v tri 25 ml kivete. Anaerobni vzorci so bili obdelovani v anaerobnem 'boku' z namenom minimiziranja navzema kisika, medtem ko so bili aerobni vzorci obdelani v laminarnem pretočnem prostoru (angl. 'laminar flow hood'). Vsak izmed vzorcev v 100 ml kiveti je bil razdeljen na 3 manjše 25 ml kivete, tako da so bile vzorčne analize lahko izvedene brez spreminjanja poteka fermentacije zaradi odvzema vzorca. Ko so bili aerobni vzorci prenešeni v manjše kivete, so bile le te inkubirane, nepokrite pri 21°C. Anaerobni vzorci so

bili prenešeni v tri manjše kivete in pokriti z uporabo aluminijevega pokrova in Teflon®-ske septe. Da bi se izognili povišanju tlaka zaradi nastanka ogljikovega dioksida v kivetah, ob preprečevanju izpostavitve vzorcev aerobnemu eksternemu okolju, je bila septa prebodena z iglo. Konec igle, ki je bil izpostavljen zunanjemu okolju, je bil potopljen v etanol (manj kot 1 cm tlačne glave), da bi bil tako preprečen kakršenkoli povratni tok zraka v vzorec. Vzorci so bili zbrani za analizo pri 2, 24 in 48 urah. Vzorec je bil prav tako direktno odvzet iz bioreaktorja in analiziran takoj, da bi bilo tako določeno stanje fermentacije v bioreaktorju in takoj analiziran, da bi bilo določeno stanje fermentacije v bioreaktorju v času protokola. Vzorci so bili analizirani na vsebnost celotnih fermentabilnih ogljikovih hidratov (kot glukoza), etanol, celotni diacetil in hlapne snovi v pivu (izbrani estri in alkoholi).

7.1.3 Učinek zadrževalnega časa tekočine na kvasne metabolite med kontinuirno primarno fermentacijo piva

Da bi proučevali učinek zadrževalnega časa tekočine na kvasno presnovno aktivnost, je bil izveden eksperiment v katerem je bila vsiljena sprememba volumetrične pretočne hitrosti v bioreaktorju med kontinuirno primarno fermentacijo piva z uporabo LCC3021 kvasnih celic imobiliziranih v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah. Temperatura bioreaktorja je bila konstantno 17°C med poskusom. Plinska volumska pretočna hitrost v bioreaktorju je bila prav tako konstantno 472 ml/min pri STP. Plin je bil zmes zraka (11 ml/min pri STP) in ogljikovega dioksida (461 ml/min pri STP). Začetna koncentracija kvasnih celic v kapa-karagenanskem gelu je bila 2.6×10^7 celic/ml gelne kroglice in reaktor je vseboval 40% (v/v) kroglic.

Med poskusom so bile ponavljane naslednje analize: ogljikovi hidrati, prosti amino dušik (FAN), celotni fermentabilni ogljikov hidrat (kot glukoza), etanol, celotni diacetil, hlapne spojine piva (izbrani estri in alkoholi) in koncentracija kvasnih celic v tekoči fazi ter preživelost. Bioreaktor je bil prav tako testiran na kontaminacijo, in sicer minimalno enkrat na teden.

7.1.4 Uporaba komercialnega preparata alfa-acetolaktat dekarboksilaze za znižanje celotnega diacetila med kontinuirno primarno fermentacijo piva

Visoke koncentracije diacetila so pri večini pivovarjev Severne Amerike smatrane kot nezaželeni defekti arome v njihovem pivu. V kontinuirnih primarnih fermentacijah

izvedenih do danes, so bile koncentracije celotnega diacetila dosledno nad pragom za tradicionalne šaržne fermentacije (70 – 150 µg/l) v severnoameriškem lagerju. Med šaržno fermentacijo, je bil diacetil znižan med zadnjimi fazami fermentacije, ko kisik ni bil več prisoten in ko dodatni sladkoriji niso bili uvedeni. V kontinuirnem fermentacijskem sistemu je bil bioreaktorju dovajan konstanten nižji nivo kisika skozi razpršilec, in sveža ječmenovka je bila kontinuirano dovajana v bioreaktor. Zato je bila preiskovana nova strategija z uporabo komercialne encimske preparacije za kontrolo koncentracije diacetila v kontinuirnem bioreaktorju.

Pri fermentaciji ječmenovke se diacetil tvori, ko je alfa-acetolaktat, intermediat v sintezi valina, oksidativno dekarboksiliran zunaj kvasne celice. Kvasne celice nato reabsorbirajo diacetil in ga pretvorijo v manj aroma aktiven acetoin. Oksidativna dekarboksilacija alfa-acetolaktata v diacetil je proces, ki določa hitrost šaržnih fermentacij ječmenovke. Med kontinuirnimi fermentacijami, je celoten diacetil zapustil bioreaktor pri nesprejemljivo visokih koncentracijah (300-400 µg/l). Komercialni encim alfa-acetolaktatna dekarboksilaza (ALDC) iz Novo-Nordisk A/S lahko pretvori alfa-acetolaktat direktno v acetoin, tako da se pri tem ne tvori neželjeni diacetilni intermediat (slika 7.1) (Jepsen, 1993).

Slika 7.1 prikazuje delovanje alfa-acetolaktat dekarboksilaze (ALDC).

Alfa-acetolaktat dekarboksilaza je bila dodana dotoku ječmenovke v bioreaktor z namenom proučevanja njenega čistega učinka na celotno koncentracijo diacetila. Druge strategije za znižanje diacetila, ki vključujejo šaržno toplo zadrževalno periodo 48 ur po fermentaciji in imobilizirani sekundarni fermentacijski sistemi, tehnologija Alpha-Laval (Anon, 1997) so bili prav tako proučevani. Obe ti drugi strategiji sta pokazali uspeh v zniževanju diacetilnih vsebnosti med po-fermentacijo, nobena pa se ne nanaša na vsebnost diacetila na izvoru (tj. na izhodu iz bioreaktorja). Z uporabo ALDC v ječmenovki za zniževanje diacetilne koncentracije iz bioreaktorja, bi lahko bile post-fermentacijske obdelovalne periode minimizirane ali eliminirane.

ALDC aktivnost je optimalna pri pH 6.0 v lagerski ječmenovki pri 10°C. Pri pH 5.0, značilnem za industrijske ječmenovke, je bila ALDC aktivnost maksimizirana pri temperaturi 35°C (Anon, 1994). Tako je pod značilnimi pogoji fermentacije piva, pri znižani temperaturi in pH, ALDC aktivnost manj optimalna.

Health Canada v 1997 je izboljšala regulativo kanadske Food and Drug Regulations (SOR/97-81) v smislu dovoljenja uporabe ALDC v alkoholnih pijačah, kar je odprlo vrata kanadskim pivovarnam. *Bacillus subtilis*, z gensko kodo za ALDC (E.C. 4.1.1.5) iz *Bacillus brevis* proizvaja encim ALDC. Ker je ALDC encim, ki je proizveden z genetsko modificiranim organizmom (GMO), je potrebno nasloviti javno mnenje pred uporabo takšnega encima v komercialnem produktu.

Lagerski kvas LCC3021 je bil uporabljen v teh eksperimentih. Lagersko pivovarsko ječmenovko z visoko težo, 17.5°P je dobavila Labatt London pivovarna. Spremljani so bili etanol, celotni fermentabilni ogljikov hidrat (kot glikoza), celotni diacetil in koncentracija celic v tekoči fazi. Kvasne celice so bile imobilizirane v kapa-karagenanske kroglice, kot je opisano v poglavju 4. Bioreaktor je omogočal tri čase potrebne za predelavo reaktorjevega volumna preden je bilo predpostavljeno, da je bilo doseženo psevdo ravnotežno stanje. Kot je bilo prej omenjeno, se uporabljena diacetilna metoda v tem tekstu nanaša na 'celotni diacetil', ker metoda meri količino diacetila in njegovega prekursorja, alfa-acetolaktata. Tako opažena redukcija celotnega diacetila med tem eksperimentom bi bila posledica kombiniranega učinka encima pri pretvorbi alfa-acetolaktata direktno v acetoin and kasnejšega znižanja koncentracije njegovega derivata, diacetila.

Alfa-acetolaktat dekarboksilaza (ALDC) je bila dobavljena kot darilo za laboratorijske namene od Novo Nordisk A/S, Danska kot Maturex®L. Aktivnost encima je bila 1500 ADU/g, kjer je ADU količina encima, ki pod standardnimi pogoji, z dekarboksilacijo alfa-acetolaktata, proizvede 1 μ mol acetoina na minuto, kot je opisano v Novo Nordisk Method AF27 (Anon, 1994).

Kontinuirni fermentacijski pogoji: Kontinuirne fermentacije so bile izvedene v 8l bioreaktorju z notranjo zanko in plinskim vlekem cepljene pri 40% (v/v) s kapa-karagenanskimi gelnimi kroglicami, ki so vsebovale imobilizirane lagerske kvasne celice. Bioreaktor je bil prepihan z zmesjo ogljikovega dioksida (438 ml/min pri STP) in zraka (34 ml/min pri STP). Fermentacijska temperatura je bila vzdrževana pri 15°C med eksperimenti in zadrževalni čas bioreaktorja, R_t , je bil 1.5 dni. Koncentracija celotnega diacetila je bila spremljana pod temi pogoji in dosežena je bila povprečna kontrolna koncentracija diacetila v psevdo ravnotežnem stanju. ALDC je bil nato dodan ječmenovki v koncentraciji 72 μ g/l (108 ADU/l) in koncentracija celotnega diacetila je bila spremljana.

Eksperiment 1: Ječmenovka je bila zbrana iz pivovarne v 20 l posodi iz nerjavečega jekla, in segrevana v avtoklavu 45 minut pri 100°C. Ječmenovka je bila med polnjenjem

reaktorja vzdrževana pri 2°C v vodni kopeli s kontrolirano temperaturo. Ko je bilo doseženo psevdo-ravnotežno stanje koncentracije celotnega diacetila v bioreaktorju, je bilo dodanega 72 µg/l (108 ADU/l) ALDC v ječmenovko v 20 l posodi. Začetna vsebnost biomase v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah je bila 3×10^7 celic/ml gela.

Eksperiment 2: Z namenom, da bi bil minimizirana nevarnost kontaminacije, je bil sistem na vhodu zaprta zanka prav tako pa so bile v sistemu opisanem v poglavju 4 napravljene druge izboljšave. Kot med eksperimentom 1, je bila ječmenovka zbrana iz pivovarne v 20l posodo iz nerjavečega jekla in obdelana v avtoklavu za 45 minut pri 100°C. Ječmenovka je bila med polnjenjem reaktorja vzdrževana pri 2°C v vodni kopeli s kontrolirano temperaturo. Začetna vsebnost biomase v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah je bila 3×10^7 celic/ml gela. Ko je bilo enkrat doseženo psevdo-ravnotežno stanje koncentracije celotnega diacetila v bioreaktorju, je bilo v ječmenovko v 20 l posodi dodanega 72 µg/l (108 ADU/l) ALDC.

Eksperiment 3: Neoksidirana 17.5°P pivovarska ječmenovka (14 hl) je bila zbrana v večjo posodo za shranjevanje ječmenovke (T-1) v pilotni napravi. Nato je bila hitro pasterizirana in shranjena z ogljikovodioksidnim prepihanjem za vzdrževanje konstantne koncentracije raztopljenega kisika <0.10 mg/l, kot je bilo opisano v poglavju 5. Ječmenovka iz tega rezervoarja je bila nato polnjena v bioreaktor dokler ni bilo doseženo psevdo ravnotežno stanje koncentracije celotnega diacetila. ALDC (72µg/l) je bil nato aseptično dodan v ječmenovko za preostali eksperiment. Dodatek ALDC je bil izveden ob merjenju količine ječmenovke preostale v posodi za shranjevanje ob izračunavanju količine ALDC potrebne za dvig koncentracije encima do željene koncentracije 72µg/L (108 ADU/l). Primerna količina encima je bila nato raztopljena v 10l sterilne ječmenovke. Ta raztopina je bila prenešena v 20l posodo iz nerjavečega jekla, ki je bila priključena preko sterilnega cevja na vzorčno odprtino posode z ječmenovko (T-1). ALCD raztopina je bila nato potisnjena z uporabo sterilnega ogljikovega dioksida pod pritiskom v posodo z ječmenovko. Z namenom, da bi bila ALDC raztopina primerno mešana z ječmenovko v zadrževalni posodi, je bila pretočna hitrost ogljikovega dioksida prepihanega v posodo povečana na 4720 ml/min pri STP za 1 uro in nato povrnjena v normalno pretočno hitrost. Rezervoar za shranjevanje je vseboval dovolj ječmenovke z odmerkom ALCD za zaključek eksperimenta. Začetna vsebnost biomase v kapa-karagenanskih gelnih kroglicah je bila 10^8 celic/ml gela.

7.2 Rezultati in diskusija

7.2.1 Učinek relativne količine zraka v bioreaktorskem fluidizirnem plinu na kvasne metabolite med primarno kontinuirno fermentacijo

Na slikah 7.2 – 7.11 so preživelost kvasovk v tekoči fazi in celična koncentracija, koncentracije prostega amino dušika (FAN), celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoza), etanola, celotnega diacetila, acetaldehida, etil acetata, 1 – propanola, izobutanola, izoamil acetata, izoamil alkohola, etil heksanoata in etil oktanoata, prikazane v odvisnosti od kontinuirnega fermentacijskega časa. Vsi obratovalni pogoji bioreaktorski so bili konstantni med protokolom, razen procent kisika v bioreaktorskem prepihovalnem plinu, kar je označeno direktno na slikah. V tabeli 7.2 so zbrana povprečja za vsak analit v psevdo-ravnotežnem stanju (po minimalno treh časih potrebnih za predelavo reaktorjevega volumna reaktantov).

Tabela 7.2 Zbirna tabela učinka volumske pretočne hitrosti zraka skozi razpršilec v bioreaktor na koncentracije tekoče faze kvasa in ključnih metabolitov v bioreaktorju pri zadrževalnem času R_t 1.18 dni, povprečja v psevdo ravnotežnem stanju.

Povprečna* analita	koncentracija	Volumska pretočna hitrost zraka (ml/min)		
		94	354	34
Konc. celic (celice/ml)		3.87E+08	2.98E+08	4.73E+08
Celotna ferm. glukoza (g/100 ml)		1.36	1.25	2.07
FAN (mg/l)		196.9	171.7	162.8
Etanol (g/100 ml)		6.14	5.46	5.74
Celotni diacetil (μg/l)		346	1417	389
Acetaldehid (mg/l)		75.62	329.48	28.63
Etil acetat (mg/l)		22.38	21.13	18.01
1-propanol (mg/l)		44.74	50.89	53.04
Izobutanol (mg/l)		8.73	16.09	8.05
Izoamil acetat (mg/l)		0.38	0.21	0.30
Izoamil alkohol (mg/l)		58.62	61.64	59.16
Etil heksanoat (mg/l)		0.060	0.030	0.053
Etil oktanoat (mg/l)		0.031	0.013	0.025

*povprečje zadnjih štirih dni vsakega izmed obratovalnih pogojev

Sliki 7.2 in 7.3 kažeta, da populacija kvasovk v tekoči fazi ni dosegla nič med tem eksperimentom. Spojine, ki dajejo aromo in ki so bile proučevane v tem delu, so nastale s kombinacijo prostih in imobiliziranih celic kvasovk, pri čemer relativni prispevki vsakega izmed teh virov niso bili določeni. V tem delu je bilo več kot en izvor prosto suspendiranih celic kvasovk: rast biomase in celice, ki so bile sproščene iz gelnih kroglic v glavno maso tekočega medija. Raziskava z modelnimi spojinami celičnega sproščanja in rasti je pokazala, da so bile ob sproščanju celic iz biofilmov le te še vedno prisotne v izstopni tekočini kljub visokim stopnjam redčenja, pri katerih je obratoval reaktor. (Karamanov, 1991).

Opis slik:

Slika 7.2. Koncentracija kvasnih celic v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP, dovajana v bioreaktor skozi razpršilec, je prikazana na grafu. Preostanek plina je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Slika 7.3. Preživelost kvasovk v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP, dovedena v bioreaktor skozi razpršilec, je prikazana na grafu. Preostanek plina je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost je bila 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Na sliki 7.4 je bila zasledovana koncentracija prostega amino dušika (FAN) v tekoči fazi. Bilo je zanimivo omeniti, da se je zgodil minimum FAN koncentracije pri 34 ml/min pri STP zraka. To ni sovpadalo z maksimalno etanolno koncentracijo ali minimalnimi koncentracijami fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze). Etanolna koncentracija v tekoči fazi bioreaktorja se je znižala, medtem ko je celotni fermentabilni ogljikov hidrat (kot glukoza) narasel, ko je volumska pretočna hitrost zraka v razpršilecu porasla od 94 do 354 ml/min, kot je razvidno iz slike 7.5. To lahko nakazuje, da je šlo bolj za celično dihanje kot za fermentacijo zaradi povečanja razpoložljivega kisika. Ko je bila volumska pretočna hitrost ponovno znižana iz 354 ml/min na 34 ml/min pri STP, je koncentracija etanola ponovno narasla, kakorkoli, le ta ni dosegla koncentracije zaznane pri pretočni hitrosti 94 ml/min pri STP. Težko je natančno primerjati koncentracije etanola pri 34 ml/min s koncentracijo pri 94 ml/min pri STP, ker so tudi drugi faktorji vplivali na sistem, in sicer izhajajoči iz staranja celic, učinkov kontinuirne izpostavitve relativno visoki količini kisika v času pri 354 ml/min pri STP in sprememb v imobilizirani celični populaciji. Na sliki 2.4 sta White in Portno (1978) označila spremembe v koncentracijah kvasnih metabolitov z aromo v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih v njunem stolpnem fermentorju.

Opis slik:

Slika 7.4. Koncentracija prisotnega amino dušika v ječmenovki v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP skozi razpršilec je označena na grafu. Preostanek plina je bil ogljikov dioksid in celotna

volumska pretočna hitrost zraka je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Slika 7.5. Koncentraciji etanola v tekoči fazi in celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glikoza) v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovedena v bioreaktor skozi razpršilec je označena na grafu. Preostanek plina je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Na sliki 7.6 je viden izrazit učinek kisika na proizvodnjo celotnega diacetila. Ker je diacetil na splošno smatran kot spojina z nezaželeno aromo v pivu, je eden izmed glavnih razlogov optimiziranja količine kisika v bioreaktorju kontrolirati vsebnost te spojine. Po 354 ml/min zračne faze je pretočna hitrost padla na 34 ml/min pri STP in celotni diacetil je padel. Med šaržno fermentacijo je znano, da povečan kisik vodi do povečanja tvorbe alfa-acetolaktata, prekursorja diacetila (Kunze, 1996).

Iz slike 7.7 je izhajala jasna odvisnost med količino zraka v razpršilnem plinu in koncentracijo acetaldehida. Ko je procent zraka v razpršilnem plinu narastel, je količina acetaldehida prav tako narasla. Acetaldehid vsili pivu karakter zelenega jabolka in je normalno prisoten v komercialnem pivu pri vsebnostih manj kot 20 mg/l.

Opis slik:

Slika 7.6. Koncentracija celotnega diacetila v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovedena v bioreaktor skozi razpršilec je prikazana na grafu. Preostali plin je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Slika 7.7. Koncentracija acetaldehida v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovedena v bioreaktor skozi razpršilec je prikazana na grafu. Preostali plin je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

V tabeli 7.2 in slikah 7.8 – 7.9 so podane psevdo ravnotežne koncentracije etil acetata, izoamil acetata, etil heksanoata in etil oktanoata, v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Za vse izmerjene estre je korak spremembe v aeracijski hitrosti od 94

do 354 ml/min pri STP vodil v znižanje koncentracije. Ko je bila aeracijska hitrost zmanjšana od 354 ml/min do 34 ml/min pri STP, je koncentracija izoamil acetata, etil heksanoata in etil oktanoata narasla. Kakorkoli, vrednosti niso narasle do vrednosti, ki so bile opažene pri 94 ml/min hitrosti aeriranja. Vzorec odziva teh spojin je zelo podoben, pri čemer etil heksanoat in etil oktanoat kažeta več odstopanj kot izoamil acetat. Koncentracija etil acetata je dejansko nadalje padala, ko je bila volumska pretočna hitrost zraka znižana na 34 ml/min pri STP. Za vse estre izmerjene v tej študiji, se je koncentracija povečala, ko je bil zrak popolnoma odstranjen iz fluidizirnega plina. Koncentracija vsakega estra je narasla in se nato polagoma umirila, ko je celična koncentracija v tekoči fazi hitro padla v bioreaktorju.

Opis slik:

Slika 7.8. Koncentracija etil acetata v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnih pogojih. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovajana v bioreaktor skozi razpršilec je prikazana na grafu. Preostali plin je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Slika 7.9. Koncentracije izoamil acetata, etil heksanoata in etil oktanoata v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovajanega v bioreaktor skozi razpršilec je prikazana na grafu. Preostanek plina je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Višji alkoholi izoamil alkohol, izobutanol in 1- propanol v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju so prikazani na sliki 7.10 in 7.11. Za izmerjene alkohole je koncentracija narasla kot rezultat postopnega povečanja aeracije od 94 do 354 ml/min pri STP. Izobutanol je pokazal najvišje relativne fluktuacije ob spremembi hitrosti aeriranja.

Koncentracije 1- propanola so bile precej pod mejnimi vrednostmi za spojine z aromo 600-800 mg/l, kakorkoli, med kontinuirnim fermentacijskim eksperimentom je bila koncentracija precej nad koncentracijo najdeno v običajnih komercialnih šaržno proizvedenih pivih, kjer so koncentracije navadno pod 16 mg/l. To ni bil primer za izoamil alkohol ali izobutanol, ki sta bila v normalnih mejah. Spojina 1-propanol je verjetno narasla zaradi redukcije kislega propionata (Gee in Ramirez, 1994). Drugi (Hough in sodelavci, 1982; Yamauchi in sodelavci, 1995) so prav tako povezovali tvorbo 1-propanola

s presnovo amino kislin α -aminomaslene kisline in treonina, z odgovarjajočo okso-kislino in aldehydom kot α -oksomasleno kislino oz. propionaldehydom.

Opis slik:

Slika 7.10 Koncentracija izoamil alkohola in izobutanola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovedena v bioreaktor skozi razpršilec je prikazana na grafu. Preostali plin je bil ogljikov dioksid in celotna pretočna hitrost plina je bila konstantna pri 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Slika 7.11. Koncentracija 1-propanola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju. Volumska pretočna hitrost zraka pri STP dovajana v bioreaktor skozi razpršilec je prikazana na grafu. Preostali plin je bil ogljikov dioksid in celotna volumska pretočna hitrost plina je bila konstantno 472 ml/min pri STP med eksperimentom.

Ker je bil presežek diacetila, acetaldehida in 'fuzilnih' alkoholov nezaželen v pivu, je bila kontrola kisika za omejevanje njihovega nastanka zelo pomembna. Kot je bilo razpravljano v literaturnem pregledu, pride ob povečanem dovodu kisika celicam kvasovk do povečane anabolne tvorbe amino kislinskih prekurzorjev in tako do presežka višjih alkoholov, oksikislin in diacetila. Za koncentracijo estrov je znano, da se zniža s povišano razpoložljivostjo kisika, ker je esterna tvorba katalizirana z acetil transferazo. Acetil transferaza je inhibirana z nenasičenimi maščobnimi kislinami in ergosterolom, ki bo posledično narasel v prisotnosti kisika (Norton in D'Amore, 1994).

Za bioreaktorske pogoje uporabljene v tem eksperimentu so bile psevdo ravnotežne koncentracije (po minimalno treh časih potrebnih za predelavo reaktorjevega volumna reaktantov) raztopljenega kisika izmerjene v tekoči fazi bioreaktorja blizu nič (manj kot 0.03 mg/l).

Ta eksperiment ni omogočal direktne primerjave podatkov za 94 ml/min in 34 ml/min zraka pri STP v fluidizirnem plinu, ker so bili pogoji ločeni z najvišjo pretočno hitrostjo zraka (354 ml/min). To je, ker bi fiziološko stanje kvasovk, kot posledica izpostavitve prejšnjim pogojem bioreaktorja, imobilizacijski matriks in čas kontinuirne fermentacije lahko prav tako povzročilo druge spremembe v nastanku arome.

Med eksperimentom v bioreaktorju nikoli ni bila detektirana kontaminacija.

Da bi uravnotežili zahtevo kvasovk po kisiku za vzdrževanje preživelosti in potrebo po minimiziranju kisika, da bi tako dobili pivo z željenim profilom arome, so lahko preiskane druge strategije, kot je dodatek nutrientov kot je cink, magnezij, ali priskrbljenje drugih ekzogenih spojin, ki so zahtevane za vzdrževanje preživelosti kvasovk. Takšni dodatki bi omogočali nadaljnje zmanjšanje potrebe kvasovk po kisiku. Druga možnost bi bila obratovanje pri zelo nizkih koncentracijah kisika večino časa, s periodičnim pulznim dovajanjem kisika kvasovkam na regularni osnovi za vzdrževanje celične preživelosti.

7.2.2 Pofermentacijska zadrževalna perioda v šarži: Učinki izpostavitve kisiku na metabolite kvasovk

Ker celotni diacetil ni bil znotraj normalnih mej za komercialno pivo na koncu primarne fermentacije, so bili izvedeni številni posegi za znižanje koncentracije te spojine na sprejemljive vsebnosti. Eden izmed takšnih posegov je bila uporaba tople zadrževalne periode takoj po kontinuirni primarni fermentaciji. Na slikah 7.12 – 7.21 so bile koncentracije celotnih fermentabilnih ogljikovih hidratov (kot glukoza), etanola, celotnega diacetila, acetaldehida, etilacetata, 1-propanola, izobutanola, izoamilacetata, izoamilalkohola in etilheksanoata prikazane v odvisnosti od pofermentacijskega zadrževalnega časa. Vzorci, ki so bili zbrani iz kontinuirnega primarnega fermentorja pri psevdo ravnotežnem stanju, so bili zadržani pod aerobnimi ali anaerobnimi pogoji, kot je prikazano na legendi vsake slike.

Na sliki 7.12 je koncentracija celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) padla hitro v prvih dveh urah in nato padala z nižjo hitrostjo med preostalo zadrževalno periodo v obeh, aerobnih in anaerobnih vzorcih. Mogoči razlogi za to ugotovitev so bili, da je bilo v prvih dveh urah prisotnih več kvasovk pred dekantacijo, in da so bile koncentracije sladkorjev višje na začetku zadrževalne periode. Tukaj ni bilo pomembne razlike v navzemanju fermentabilne glukoze med aerobnimi in anaerobnimi vzorci, čeprav so bile na začetku zaznane nekatere razlike.

Koncentracija etanola na sliki 7.13 je porasla hitro na začetku zadrževalne periode, nato je etanolna koncentracija v anaerobnih in aerobnih vzorcih narasla s časom na skoraj vzporeden način. Začetno povišanje etanola za anaerobne vzorce se je ujemale s periodo

glavnega navzemanja sladkorja. Na koncu zadrževalne periode je bila etanolna koncentracija višja v anaerobno obdelanih vzorcih.

Opis slik:

Slika 7.12. Srednja koncentracija fermentabilne glukoze v odvisnosti od pofermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekrom. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje limitne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 7.13. Srednja koncentracija etanola v odvisnosti od pofermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekrom. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje limitne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Na sliki 7.14 so aerobni vzorci pokazali zgodnje povečanje acetaldehida po izpostavljanju aerobnim pogojem zunaj bioreaktorja. Kombinacija aerobnih pogojev s porabo sladkorja in proizvodnjo etanola lahko šteje za ta rezultat. Ob koncu 48 urne zadrževalne periode je koncentracija acetaldehida padla iz 17 mg/l na 9 mg/l v anaerobnem vzorcu, kar je pomenilo, da je koncentracija v tekoči fazi znotraj specifikacij za kvaliteto severnoameriškega lagerja (manj kot 10 mg/l).

Koncentracija celotnega diacetila v odvisnosti od zadrževalnega časa je podana na sliki 7.15. Rezultati kažejo, da eliminacija kisika iz sistema med to zadrževalno periodo omogoča bolj ugodne pogoje za diacetilno redukcijo. Oblika krivulje celotnega diacetila je lahko povezana z zginevanjem prostega amino dušika in kasnejše intracelularno produkcijo valina, katerega stranski produkt je diacetil (Nakatani s sodelavci, 1984a; Nakatani s sodelavci, 1984b). Koncentracija celotnega diacetila na koncu primarne kontinuirne fermentacije je bila 326 $\mu\text{g/l}$ in na koncu anaerobne zadrževalne periode koncentracija 33 $\mu\text{g/l}$, kar je precej pod pragom okusa v komercialnih pivih.

Opis slik:

Slika 7.14. Srednja koncentracija acetaldehida v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekrom. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 7.15. Srednja koncentracija celotnega diacetila v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni

fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekem. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Na slikah 7.16. – 7.18 so grafično prikazane koncentracije estrov etil acetata, izoamil acetata in etil heksanoata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa. Enak vzorec za aerobne in anaerobne vzorce je bil opazovan za vse estre. Koncentracija estrov se ni razlikovala med anaerobnimi in aerobnimi vzorci do kasnejše faze v zadrževalni periodi, ko je koncentracija estrov v aerobnih vzorcih padla in je koncentracija v anaerobnih vzorcih narasla. Ker je koncentracija estrov v kontinuirnih fermentacijah nekoliko nizka v primerjavi s koncentracijami estrov v komercialnem pivu, je željeno izbrati pogoje, ki favorizirajo produkcijo estra.

Opis slik:

Slika 7.16. Srednja koncentracija etil acetata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekem. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 7.17. Srednja koncentracija izoamil acetata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekem. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 7.18. Srednja koncentracija etil heksanoata v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekem. Oznake odstopanja kažejo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slike 7.19. – 7.21 kažejo koncentracijo izoamil alkohola, 1-propanola in izobutanola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa. Po koncu 48 urne zadrževalne periode niso bile opažene pomembne razlike v teh alkoholih med aerobnimi in anaerobnimi postopki. Kakorkoli, 24-urni vzorci so pokazali višjo koncentracijo v vseh primerih za aerobne postopke.

Opis slik:

Slika 7.19. Srednja koncentracija izoamil alkohola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom. Oznake odstopanja kažejo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 7.20. Srednja koncentracija 1-propanola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom. Oznake odstopanja predstavljajo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Slika 7.21. Srednja koncentracija izobutanola v odvisnosti od postfermentacijskega zadrževalnega časa za aerobno in anaerobno obdelane vzorce po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom. Oznake odstopanja kažejo zgornje in spodnje mejne vrednosti eksperimentalnih podatkov ($n=2$).

Na sliki 7.22 je podan radarski graf, ki omogoča primerjavo številnih spojin z aromo po 48 urni aerobni in anaerobni zadrževalni periodi s profilom komercialnega piva. Radarski grafi so na splošno pogosto uporabni v pivovarni industriji za preiskovanje in primerjanje vrste različnih značilnosti piva skupaj na enem grafu (Sharpe, 1988). Iz te slike je lahko razvidno, da se anaerobno zadržano kontinuirano pivo najbolj ujema z značilnim tržnim pivom. Iz dodatka 6 je lahko razvidno, da je bila anaerobna tekočina v normalnih območjih za tržno pivo, razen v primeru 1-propanola, ki je bil pomembno višje za šaržno fermentirana piva. Ta od normalnega višji 1-propanol je bil opažen v vseh kontinuirno fermentiranih produktih v tem delu.

Tvorba 1-propanola je potekala med kontinuirno primarno fermentacijsko fazo in se ni pomembno znižala med zadrževalno periodo, ne glede na to, ali so bili pogoji aerobni ali anaerobni. Kunze (1996) trdi, da bodo naslednji faktorji povečali vsebnost višjih alkoholov, kot je 1-propanol med šaržno fermentacijo: mešanje, intenzivna aeracija ječmenovke in ponovljeno dodajanje sveže ječmenovke k obstoječi kvasovki.

Končno, idealni scenarij bo popolnoma eliminirati sekundarno zadrževalno periodo z optimiranjem pogojev v primarnem kontinuirnem bioreaktorju. Kakorkoli, nadaljnji pozitivni rezultati so lahko dobljeni z uporabo zadrževalne periode, z optimiranjem zadrževalne temperature (odstranjevanje diacetila s kvasovkami je zelo temperaturno odvisno), količino fermentabilnih sladkorjev preostalih v tekočini na začetku zadrževalne periode, optimiziranjem koncentracije prisotnih kvasovk, hidrodinamskimi značilnostmi

zadrževalne posode (odstranjevanje diacetila bi lahko bilo izboljšano z izboljšanjem kontakta med kvasovkami in pivom) in nadaljnjimi merami za eliminiranje kisika iz te faze.

Izračuni volumske produktivnosti piva so podani v dodatku 3. Proces opisan v tem poglavju s kontinuirnim biorektorskim obratovanjem s 24 urnim zadrževalnim časom, ki mu sledi 48 urna šaržna zadrževalna perioda, je 1.8 krat bolj produktiven kot sedanji industrijski šaržni proces. Relativno hiter industrijski šaržni proces z 7.5 dnevnim časovnim ciklom ima volumsko produktivnost piva 0.093 m^3 proizvedenega piva / (m^3 volumna posode x dan), medtem ko ima kontinuirni postopek opisan tukaj produktivnost 0.165 m^3 proizvedenega piva / (m^3 volumna posode x dan). Če je nadaljnja raziskava omogočala, da je bila šaržna zadrževalna perioda skrajšana na 24 ur, bi proizvodnja piva postala 2.3 krat bolj produktivna kot industrijski šaržni standard. Če bi bil dosežen idealni scenarij 24 urnega kontinuirnega procesa brez šaržnega zadrževanja, bi volumska produktivnost piva postala 7.5 krat le te po šaržnem standardu. Poleg povečane volumske produktivnosti morajo biti dodatne ugodnosti, ki so posledica premika od šaržnega v kontinuirni postopek, kot so krajši čas za trženje, zmanjšanje velikosti pivovarne in manj pogosto razmnoževanje kvasovk, v ravnotežju z natančno analizo relativnih obratovalnih stroškov.

Drugi raziskovalci (Kronlöf in Virkajärvi, 1996; Nakanishi s sodelavci, 1993; Yamauchi s sodelavci, 1995) so se osredotočili na razvoj večfaznih kontinuirnih fermentacij, v katerih prva faza kontinuirne fermentacije (aerobna) vodi v samo delno porabo fermentabilnih sladkorjev prisotnih v ječmenovki. Medtem ko je ta strategija pokazala uspeh v smislu proizvodnje arome, so ti sistemi zelo kompleksni. Nadalje, prva aerobna faza takšnih sistemov tvori okolje, ki je bolj dovzetno za mikrobiološko kontaminacijo (npr. visoka koncentracija sladkorjev, temperatura in kisik z nizko koncentracijo etanola). V biorektorskem sistemu s plinskim vlekom predstavljenim v tem delu, ima bioreaktor nižjo koncentracijo fermentabilnega sladkorja, nizek pH, visoko koncentracijo etanola, in nizke koncentracije kisika, ki tvorijo okolje neprijetno za potencialne kontaminante.

Slika 7.22. prikazuje radarski graf normaliziranih koncentracijskih podatkov dobljenih po 48 urah aerobnega in anaerobnega zadrževanja, po kontinuirni primarni fermentaciji v bioreaktorju s plinskim vlekom. Normalizirani podatki temeljijo na povprečju dveh

vzorcev in podatki komercialnega piva so bili vzeti kot srednja vrednost podatkov navedenih v dodatku 6.

7.2.3 Učinek zadrževalnega časa na ključne kvasne metabolite med kontinuirno primarno fermentacijo piva.

Slike 7.23 – 7.28 kažejo analizne rezultate dobljene iz tekoče faze bioreaktorja. Na tabeli 7.3 so podane povprečne koncentracije in pretočne hitrosti izmerjenih analitov v psevdo ravnotežnem stanju (po minimalno treh časih potrebnih za predelavo reaktorjevega volumna reaktantov) pri dveh zadrževalnih časih tekočine uporabljene med temi eksperimenti. Medtem ko se preživelost kvasovk v tekoči fazi ni pomembno spremenila s povišanjem pretočne hitrosti ječmenovke v bioreaktor, se je koncentracija kvasnih celic spremenila kot je razvidno iz slike 7.23.

Tabela 7.3. (a) Pregledna tabela učinka zadrževalnega časa bioreaktorja na kvasovke v tekoči fazi in povprečne koncentracije ključnih kvasnih metabolitov v psevdo ravnotežnem stanju; (b) Pregledna tabela učinka zadrževalnega časa v bioreaktorju na kvasovke v tekoči fazi in povprečne pretočne hitrosti ključnih kvasnih metabolitov v izstopu iz bioreaktorja v psevdo ravnotežnem stanju.

(a)

Povprečna koncentracija analita	Zadrževalni čas v bioreaktorju	
	1.8 dni	0.9 dni
Celična koncentracija (celice/ml)	2.38E+08	1.32E+08
Celotna ferm. glukoza (g/100 ml)	0.29	6.09
FAN (mg/l)	106.3	246.4
Etanol (g/100 ml)	5.16	4.80
Celotni diacetil (μg/l)	292	460
Acetaldehid (mg/l)	19.47	37.07
Etil acetat (mg/l)	41.00	38.29
1-propanol (mg/l)	44.95	13.53
Izobutanol (mg/l)	22.78	9.13
Izoamil acetat (mg/l)	0.90	1.28
Izoamil alkohol (mg/l)	76.67	51.39

(b)

Povprečna pretočna hitrost analita	Zadrževalni čas v bioreaktorju	
	1.8 dni	0.9 dni
Celična koncentracija (celice/ml)	7.38E+08	8.22E+08
Celotna ferm. glukoza (g/min)	8.93E-03	3.72E-01
FAN (g/min)	3.65E-04	1.50E-03
Etanol (g/min)	1.60E-01	2.93E-01
Celotni diacetil (g/min)	9.06E-07	2.81E-06
Acetaldehid (g/min)	6.04E-05	2.26E-04
Etil acetat (g/min)	1.27E-04	2.34E-04
1-propanol (g/min)	1.39E-04	8.25E-05
Izobutanol (g/min)	7.06E-05	5.57E-05
Izoamil acetat (g/min)	2.80E-06	7.30E-06
Izoamil alkohol (g/min)	2.38E-04	3.13E-04

Slika 7.23. prikazuje koncentracijo kvasnih celic v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.

Na slikah 7.24 in 7.25 sta koncentraciji prostega amino dušika substratov ječmenovke (FAN) in celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) obe narasli, ko je zadrževalni čas tekočine padel iz 1.8 na 0.9 dni. Iz masne bilance v tabeli 7.4 je hitrost porabe celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) narasla, medtem ko je hitrost porabe prostega amino dušika padla, s padajočim zadrževalnim časom v bioreaktorju. Faktor dobitka, $Y_{P/S}$, fermentacijskega produkta etanola iz fermentabilnega glukoznega substrata, je narasel iz 0.3 na 0.5 z redukcijo v zadrževalnem času tekočine. Ker je bil sistem prepihan z zrakom in ogljikovim dioksidom, so bile tukaj verjetno minimalne izgube etanola v plinski fazi, ki bi lahko imele vpliv na faktor dobitka, $Y_{P/S}$, z vplivanjem na ravnotežje etanola. Raziskava izvedena v sodelovanju z Budac in Margaritis (1999) z uporabo plinsko kromatografsko-masne spektroskopske tehnike (GC-MS), je kvalitativno pokazala, da so hlapne arome v pivu, vključno z etanolom, acetaldehidom, etilacetatom in izoamilacetatom detektirane na vrhu bioreaktorja s plinskim vlekem med kontinuirno fermentacijo.

Opis slik:

Slika 7.24. Koncentraciji etanola in fermentabilne glukoze v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega zadrževalnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.

Slika 7.25. Koncentraciji prostega amino dušika in 1-propanola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa kontinuirne fermentacije, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.

Tabela 7.4. Masna bilanca prostega amino dušika in celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) na osnovi povprečnih podatkov v tabeli 7.3, učinek zadrževalnega časa.

Zadrževalni čas	1.8 dni	0.9 dni	1.8 dni	0.9 dni
	Prosti amino dušik (g/min)		Celotna ferm. glukoza (g/min)	
Vstop*	8.84E-04	1.74E-03	4.71E-01	9.26E-01
Izstop	3.65E-04	1.50E-03	8.93E-03	3.72E-01
Poraba (ΔS)	5.18E-04	2.35E-04	4.62E-01	5.54E-01
Faktor dobitka ($Y_{P/S}$)			0.3	0.5

*vstopne koncentracije iz dodatka 1

Koncentracija fermentacijskega produkta etanola v tekoči fazi je padla s korakom spremembe v zadrževalnem času tekočine. Kakorkoli, sistem kot celota je proizvajal več

etanola na osnovi masne pretočne hitrosti pri nizkem zadrževalnem času tekočine. Ker predmet tega dela ni bil samo proizvesti etanol v izolaciji ampak predvsem pivo z ravnotežjem številnih spojin, mora biti maksimiziranje produktivnosti etanola uravnoteženo z drugimi faktorji. Na koncu komercialne primarne fermentacije piva mora biti porabljena glavna fermentabilnega glukoznega substrata.

Na sliki 7.26 je podan odziv koncentracije acetaldehida in celotnega diacetila na korak spremembe v pretočni hitrosti ječmenovke. Koncentracija obeh analitov, kot tudi njuna hitrost nastajanja je porasla, ko je bil zadrževalni čas tekočine zmanjšan. Med šaržnimi fermentacijami piva je bil acetaldehid izločen s kvasovkami med prvimi dnevi fermentacije (Kunze, 1996).

Slika 7.26. prikazuje koncentraciji celotnega diacetila in acetaldehida v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije med kontinuirnim obratovanjem učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v dnevih.

Sliki 7.25 in 7.27 kažeta učinek zmanjšane zadrževalnega časa v bioreaktorju na koncentracije višjih alkoholov 1-propanola, izobutanola in azoamil alkohola v tekoči fazi. Koncentracija vseh treh višjih alkoholov je padla, ko je padel zadrževalni čas bioreaktorja.

Slika 7.27. prikazuje koncentracijo izobutanola in izoamil alkohola v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.

Masne pretočne hitrosti etil acetata in izoamil acetata, podane v tabeli 7.3 (b) sta obe narasli kot odziv na zmanjšanje zadrževalnega časa tekočine. Na sliki 7.28 je koncentracija etilacetata v tekoči fazi padla, medtem ko je koncentracija izoamil acetata narasla. Ker je ta eksperiment omogočal povečanje celične rasti v tekoči fazi brez povišanja kisika dovedenega v sistem, so pogoji v bioreaktorju pospešili nastajanje estra. Hough s sodelavci (1982) trdi, da povečana rast in znižani kisikovi pogoji spodbujajo tvorbo estra.

Slika 7.28. prikazuje koncentracijo etilacetata in izoamilacetata v tekoči fazi v odvisnosti od relativnega časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka zadrževalnega časa tekočine v bioreaktorju. R_t je zadrževalni čas tekočine v bioreaktorju v dnevih.

7.2.4 Uporaba komercialnega pripravka alfa-acetolaktat dekarboksilaze za znižanje celotnega diacetila med kontinuirno primarno fermentacijo piva

Eksperiment 1: Bioreaktor je bil onesnažen z aerobno rastočimi gram pozitivnimi koki preden bi lahko bil eksperiment zaključen. Določeno je bilo, da je bil bioreaktor sam onesnažen, ker mikrobiološko testiranje dobavljene ječmenovke ni kazalo kontaminacije. To je vodilo k potrebi po nadgradnji bioreaktorja z izboljšanjem varnosti pred kontaminacijo. Kakorkoli, preden je bil sistem ustavljen, je bil opažen padec koncentracije celotnega diacetila, ko je bil k dovedeni ječmenovki dodan ALDC. Na žalost ni bilo mogoče potegniti nobenih zaključkov na osnovi teh podatkov zaradi zbeganih učinkov kontaminacije bioreaktorja.

Ekspерiment 2: Kot rezultat številnih izboljšav bioreaktorja je sistem obratoval brez kontaminacije med trajanjem eksperimenta 2. Podatki za ta eksperiment so podani na slikah 7.29 – 7.31. V tabeli 7.5 so povzete povprečne psevdo-ravnotežne koncentracije celotnega diacetila pred in po dodatku ALDC v ječmenovko. Koncentracija celotnega diacetila je padla za 47% z dodatkom ALDC k ječmenovki, kar kaže na uporabo tega encima kot obetajočo v prihodnosti (povprečja vzeta po treh časih potrebnih za predelavo reaktorjevaga volumna reaktantov). Kot je razvidno iz slik 7.30 in 7.31, se je koncentracija celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) in koncentracija celic nekoliko spreminjala med tem poskusom, kar je bilo verjetno posledica majhnih razlik v ječmenovki dovedeni v bioreaktor pred in po dodatku ALDC.

Opis slik:

Slika 7.29. Koncentracija celotnega diacetila v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinek dodatka ALDC na fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 2.

Slika 7.30. Koncentracija fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) in koncentracija etanola v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinek dodatka ALDC na fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 2.

Slika 7.31. Celična koncentracija v tekoči fazi v odvisnosti od časa kontinuirne fermentacije, učinek dodatka ALDC k fermentacijskemu mediju ječmenovke, eksperiment 2.

Da bi eliminirali potencialni učinek 'zbeganosti' zaradi spremenljive ječmenovke med eksperimentom 3, je bila zbrana velika količina ječmenovke iz pivovarne (14 hl) in ALDC je bil dodan direktno v ječmenovko v tej zadrževalni posodi, ko je bila dosežena psevdo ravnotežna bazna linija. Tako so bile nadalje eliminirane kakršne koli potencialne nekonsistentnosti ječmenovke, ki bi lahko vplivale na fermentacijsko značilnost v eksperimentu 2. Ta posoda za shranjevanje ječmenovke je bila prav tako opremljena z razprševanjem ogljikovega dioksida, tako da so bile vsebnosti raztopljenega kisika v dovodu ječmenovke vzdrževane pri dosledno nizkem nivoju.

Ekspерiment 3: Slike 7.32 – 7.34 prikazujejo učinek dodatka ALDC k dovodu ječmenovke, na koncentracijo celotnega diacetila, celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze), etanola in koncentracije prosto suspendiranih celic med kontinuirno fermentacijo piva. Tabela 7.6 prav tako daje povprečno psevdo ravnotežno koncentracijo celotnega diacetila pred in po dodatku ALDC k dovodu ječmenovke (povprečja vzeta po

treh časih potrebnih za predelavo reaktorjevega volumna reaktantov). Pri katerikoli točki med tem eksperimentom kontaminacija ni bila detektirana. Koncentracija celotnega diacetila je bila reducirana za 45% po dodatku ALDC. V koncentracijah etanola, celotnega fermentabilnega ogljikovega hidrata (kot glukoze) ali prosto suspendiranih celic niso bile opažene pomembne razlike, kar je v skladu z odkritji Aschengreena in Jepsena (1992) za šaržni sistem.

Opis slik:

Slika 7.32. Koncentracija celotnega diacetila v tekoči fazi v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka dodatka ALDC v fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 3.

Slika 7.33. Koncentracija etanola in celotnega fermentabilnega sladkorja (kot glukoze) v tekoči fazi v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka dodatka ALDC k fermentacijskemu mediju ječmenovke, eksperiment 3.

Slika 7.34. Celična koncentracija tekoče faze v odvisnosti od časa fermentacije pri kontinuirnem obratovanju, učinka dodatka ALDC na fermentacijski medij ječmenovke, eksperiment 3.

Rezultati eksperimentov 2 in 3 nakazujejo, da ALDC ni imel pomembnega učinka na koncentracijo celotnega diacetila med kontinuirno fermentacijo v bioreaktorjih s plinskim vlekrom ob povprečni 46% redukciji koncentracije celotnega diacetila. S tem je nakazana možnost za znižanje ali eliminiranje sekundarne obdelave za redukcijo diacetila v kontinuirnih sistemih s plinskim vlekrom. Relativno visoke doze ALDC so bile uporabljene za te začetne eksperimente, in potrebno bi bilo optimizirati količino, metodo in čas doziranja ALDC v ječmenovko, če bi naj bil encim privzet za ta proces. Nadalnji prihranki bi lahko bili realizirani, če postane dosegljiv encim z višjo aktivnostjo pod fermentacijskimi pogoji pivovarne ali, če je bil encim sam imobiliziran in ga je tako mogoče ponovno uporabiti (Dulieu s sodelavci, 1996). Naslednji premislek gre v smeri javnega odobravanja oz. sprejetja encimskih dodatkov, ki so bili proizvedeni z uporabo genetsko modificiranih organizmov. Pri priporočeni dozi dobavitelja 2 kg/1000hl in ob stroških komercialne priprave encima \$131.05/kg bi bilo k materialnim stroškom fermentacije dodanih \$0.26/hl. Kot uporabljeno v izvedenih eksperimentih, je bila encimska doza 72 $\mu\text{g/l}$ (108 ADU/l) ali 7.2 kg/1000hl ALDC in je tako predstavljala dodatne materialne stroške \$ 0.94/hl. Ekonomika uporabe ALDC za redukcijo diacetila

med kontinuirnimi fermentacijami s plinskim vlekrom bo odvisne od optimalnega doziranja encimov pod bioreaktorskimi pogoji in časa prihranjenega z njegovo uporabo.

Tabela 7.5. Povzetek povprečnega psevdo-ravnotežnega učinka dodatka ALDC k fermentacijskemu mediju ječmenovke na celotno koncentracijo diacetila med kontinuirno fermentacijo piva v bioreaktorju s plinskim vlekrom.

Eksperiment	Povprečna koncentracija celotnega diacetila ($\mu\text{g/l}$)		Procent diacetilne redukcije
	(ALDC ni prisoten)	(ALDC, $60\mu\text{l/l}$)	
Eksperiment II	495	260	47
Eksperiment III	445	245	45

*povprečja na osnovi psevdo ravnotežnih vrednosti po treh časih potrebnih za predelavo reaktorjevega volumna reaktantov

Prej omenjena odobravanja predloga, da je kontinuirna fermentacija z uporabo imobiliziranega kvasa in združenih prostih celic v bioreaktorskem sistemu z notranjo zanko in plinskim vlekrom realna alternativa šaržni fermentaciji za proizvodnjo piva, so osnovana na naslednjih kriterijih:

- dosežena je ustrezna aroma
- višja volumska produktivnost bioreaktorja
- minimalna kompleksnost
- demonstrirano dolgoročno kontinuirno obratovanje
- kontrola zraka (kisika) v fluidizirnem plinu za kontrolo arome
- ev. dodatek encima α -acetolaktat dekarboksilaze za diacetilno kontrolo
- bakterijska nekontaminacija
- finančne koristi.

Tukaj je še vedno veliko področij, ki bi morale biti nadalje študirane, vendar je tehnologija že pripravljena za testiranje v večjem obsegu. Bioreaktorji s plinskim vlekrom so že uporabni na industrijski skali za čiščenje odpadnih voda, kar daje obete za tehnično

izvedljivost kontinuirnega fermentacijskega sistema za pivo v realnem industrijskem okolju. Pivovarna Grolsch na Nizozemskem je poročala o uporabi 230m³ bioreaktorja s plinskim vlekom za čiščenje njihove odpadne vode (Driessen s sodelavci, 1997). Ena izmed največjih omejitev kontinuirne fermentacije v komercialnem merilu v pivovarni industriji je lahko sprejemljivost novega procesa med pivovarnarji, v industriji, ki je močno vezana na tradicijo.

Podatki, zbrani na sekundarnih metabolitih kvasovk, dobljeni med kontinuirnimi fermentacijami piva, ki so bile izvedene med tem delom, so poudarili pomembnost kontroliranja kisika v fluidizirnem plinu za tvorbo arome piva. Ugotovitve so pokazale, da je pod danimi obratovalnimi pogoji, povišan zrak v fluidizirnem plinu bioreaktorja povzročil povišanje acetaldehida, diacetila in višjih alkoholov (izoamil alkohola in izobutanola), medtem ko so bile koncentracije estrov (izoamil acetata, etil heksanoata, etil oktanoata) in etanola reducirane. Ti podatki namigujejo, da je tako mogoče kontrolirati aromo piva preko sestave fluidizirnega plina bioreaktorja in s tem proizvodnjo edinstvenih proizvodov.

Z izjemo slučaja, ko je bil zrak eliminiran iz fluidizirnega plina, je bila v tekoči fazi bioreaktorja vzdrževana koncentracija prosto suspendiranih celic večja kot 10⁸ celic/ml.

Sistem ima tako več kot eno populacijo celic kvasovk, ki obstajajo skupaj v reaktorju, imobilizirane kvasovke in suspendirane kvasovke v tekoči fazi. Zaradi velike količine živih celic, ki rastejo v tekoči fazi bioreaktorja, obstaja možnost uporabe kontinuirnega bioreaktorja kot razmnoževalca celic.

Ko je bila dodana sekundarna 48-urna zadrževalna perioda, ki je sledila kontinuirni primarni fermentaciji, je bil dobljen profil arome v mejah piv na trgu. Temperatura te zadrževalne periode je bila 21°C in pomembnost minimiziranja izpostavitve tekočine kisiku med zadrževalno periodo za tvorbo arome je bila demonstrirana eksperimentalno. Dodatek zadrževalne periode doda 2 dni k procesu kot tudi dodatno kompleksnost; kakorkoli tak proces je še vedno pomembno hitrejši kot komercialne šaržne fermentacije, ki trajajo med sedem in štirinajstimi dnevi.

Končno, idealni scenarij bi bil popolna eliminacija sekundarne zadrževalne periode z optimiziranjem pogojev primarnega kontinuirnega bioreaktorja. Kakorkoli, nadaljnje redukcije sekundarnega zadrževalnega časa so lahko dosežene v kratkem času z vzdrževanjem temperature (odstranitev diacetila s kvasovkami je zelo temperaturno

odvisna), količino fermentabilnih sladkorjev, ki ostanejo v tekočini na začetku zadrževalne periode, koncentracijo prisotnih kvasovk, hidrodinamskimi značilnostmi zadrževalne posode (odstranitev diacetila bi lahko bila izboljšana z izboljšanjem kontakta med kvasovkami in pivom) in z nadaljnji merami za eliminiranje kisika iz te stopnje.

Drugi raziskovalci (Kronlof in Virkajavri, 1996; Nakanishi s sodelavci, 1993; Yamauchi s sodelavci, 1995) so bili osredotočeni na razvoj večstopenjskih kontinuirnih fermentacij v katerih prva faza kontinuirne fermentacije (aerobna) vodi v samo delno porabo fermentabilnih sladkorjev prisotnih v ječmenovki. Medtem ko je ta strategija pokazala nekaj uspeha v smislu proizvodnje arome, so ti sistemi kompleksni. Prav tako prva aerobna faza teh sistemov tvori okolje, ki je bolj občutljivo za mikrobiološko kontaminacijo (tj. višja koncentracija sladkorja, temperatura, in kisik, z nizkimi koncentracijami etanola). V bioreaktorju s plinskim vlekem predstavljenim v tem delu, ima bioreaktor nizko ravnotežno koncentracijo fermentabilnega sladkorja, nizek pH, visoko koncentracijo etanola in nizke koncentracije kisika, kar dela okolje neprijazno za potencialne kontaminante. V manj razviti pivovarni je minimiziranje kompleksnosti in razvijanje robustnega, na kontaminacijo odpornega procesa, pomemben faktor uspeha.

Dodatek komercialnega pripravka alfa-acetolaktat dekarboksilaze (ALDC) k ječmenovki, ki napaja kontinuirno fermentacijo, je pokazal 46% povprečno redukcijo diacetila. Kakorkoli, ker je ALDC encim, ki je proizveden z genetsko modificiranim organizmom (GMO), je pomembno javno mnenje pred uporabo teh encimov v komercialnem produktu. Poleg tega komercialno razpoložljivi encimi za kontrolo diacetila nimajo optimalne aktivnosti pod pogoji fermentacije.

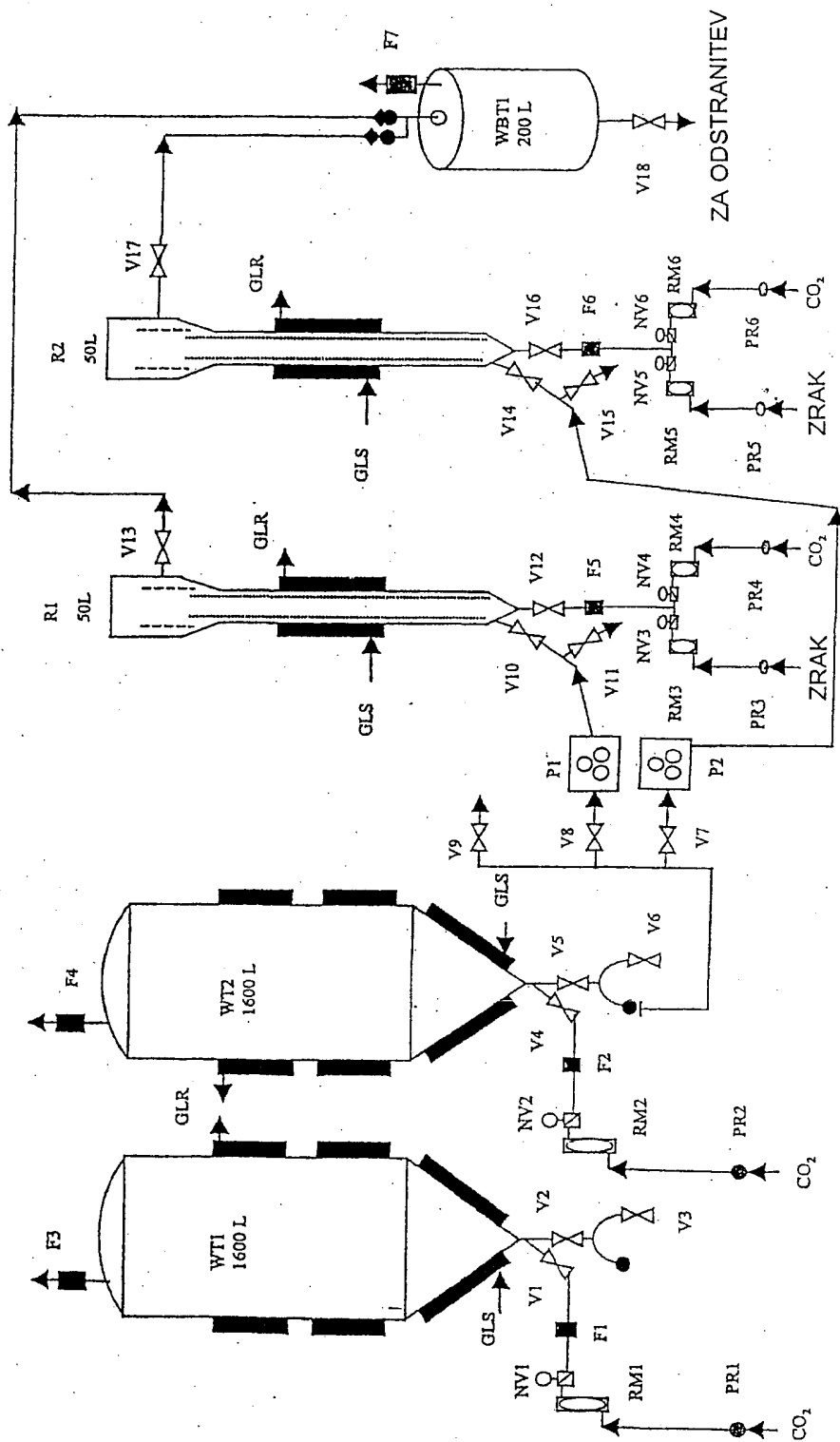
V šestih mesecih kontinuirne fermentacije z uporabo kapa-karagenanske gelne imobilizacije so prosto suspendirane celice v tekoči fazi zadržale stopnje preživetja višje kot 90%, medtem ko je preživelost imobiliziranih celic padla na manj kot 60%. Elektronski mikrofotografije kažejo, da so imele celice, ki so se nahajale v bližini obrobja gelne kroglice, številne brstične izbokline in regularno morfologijo, medtem ko imele tiste blizu skorje kroglice neregularno obliko in manj brstičnih izboklin, ki bi napeljevale na vsiljeno rast. Mikrofotografije so prav tako namigovali na to, da so kazale kvasovke, ki so bile locirane blizu skorje kroglice, znake staranja. Kot je bilo diskutirano v poglavju 5, ima kapa-karagenanski gel številne značilnosti zaradi katerih je le ta željen kot imobilizacijski

matriks za kvasovke. Kakorkoli, trenutno ni razpoložljiva nobena metoda za proizvodnjo kroglic in, ker je omreženje kvasa v matriks del procesa za izdelavo kroglic, ravnanje s kroglicami v komercialnem obratu poveča kompleksnost in stroške. Druge imobilizacijske metode, kot je samoagregacija ali flokulacija bi morale biti proučene v prihodnje. To bi eliminiralo kompleksnost ravnanja s kroglicami v obratnem okolju in, če so bili kosmi (flokule) kvasovk raztrgani na regularni osnovi, bi lahko zagotovili regularno odstranjevanje postaranih celic iz bioreaktorja.

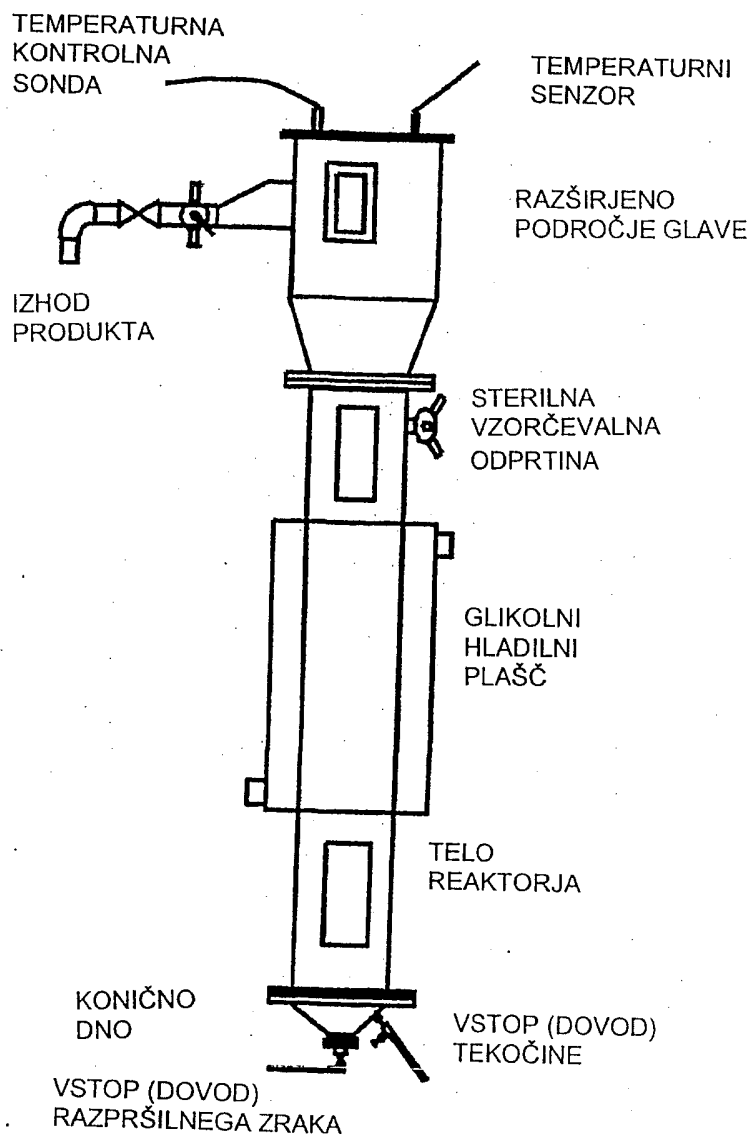
PATENTNI ZAHTEVKI

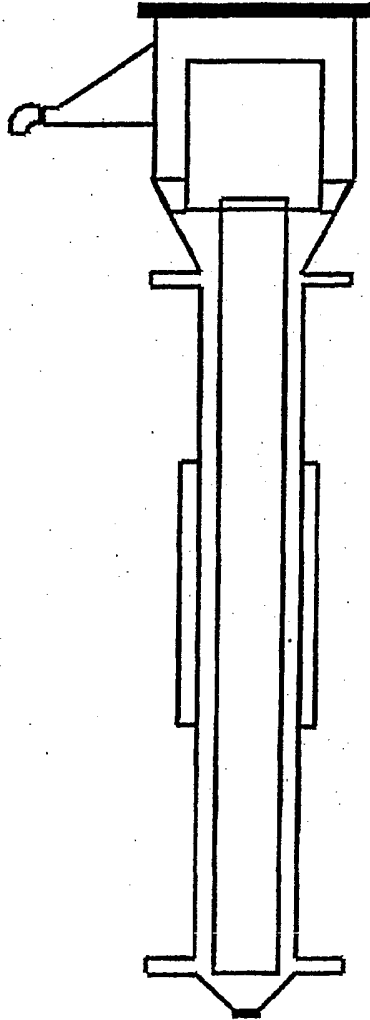
1. V postopku za proizvodnjo namiznih alkoholov je kontinuirna fermentacijska faza uporabljena za začetno fermentacijo ječmenovke, ki vsebuje fermentabilne sladkorje, kateri sledi izpust 'najmanj delno fermentirane ječmenovke' iz kontinuirnega procesa v šaržno procesno fazo za končno obdelavo.
2. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer je omenjeni namizni alkohol pivo.
3. Postopek po patentnem zahtevku 2, kjer je pivo svetla vrsta piva.
4. Postopek po patentnem zahtevku 3, kjer je omenjeno pivo lagersko pivo.
5. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer je omenjeno pivo severnoameriška vrsta piva.
6. Postopek za kontinuirno fermentacijo piva, kjer je ječmenovka najmanj delno fermentirana v bioreaktorju s plinskim vlekrom ob uporabi kosmičastega kvasa z omejenim dovajanjem kisika.
7. Postopek po patentnem zahtevku 6, kjer je omenjena fermentacija primarna fermentacija.
8. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer poteka kontinuirna faza v bioreaktorju s plinskim vlekrom.
9. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer omenjena kontinuirna fermentacijska faza uporablja imobilizirane celice izbrane iz ene od skupin, ki sestoji iz v nosilcu imobiliziranega kvasa ali kosmičastih (flokulacijskih) kvasov.
10. Postopek po patentnem zahtevku 9, kjer so kosmičasti kvasi izbrani za uporabo.

11. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer je zaključek primarne fermentacije izveden v šaržni zadrževalni fazi.
12. Postopek po patentnem zahtevku 11, kjer poteka zniževanje koncentracije diacetila.
13. Postopek po patentnem zahtevku 11, kjer poteka zniževanje koncentracije acetaldehida.
14. Postopek po patentnem zahtevku 11, kjer ostane koncentracija višjih 'fuzilnih' alkoholov dejansko nespremenjena v šaržni zadrževalni procesni fazi.
15. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer je iztok iz kontinuirne faze fermentacije razdeljen skozi razdelilnik v eno od mnogih šaržnih zadrževalnih posod kjer poteka omenjen šaržni zadrževalni proces.
16. Postopek po patentnem zahtevku 1, kjer je omenjen kontinuirni proces proces za pričetek nadaljnjih šaržnih fermentacij v šaržni zadrževalni fazi.

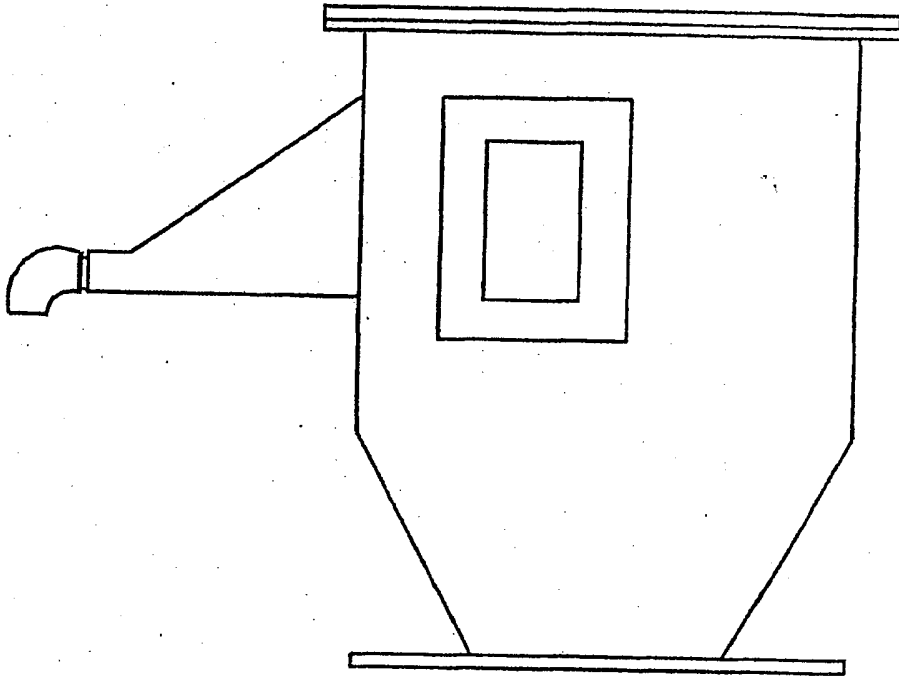


SL. 1



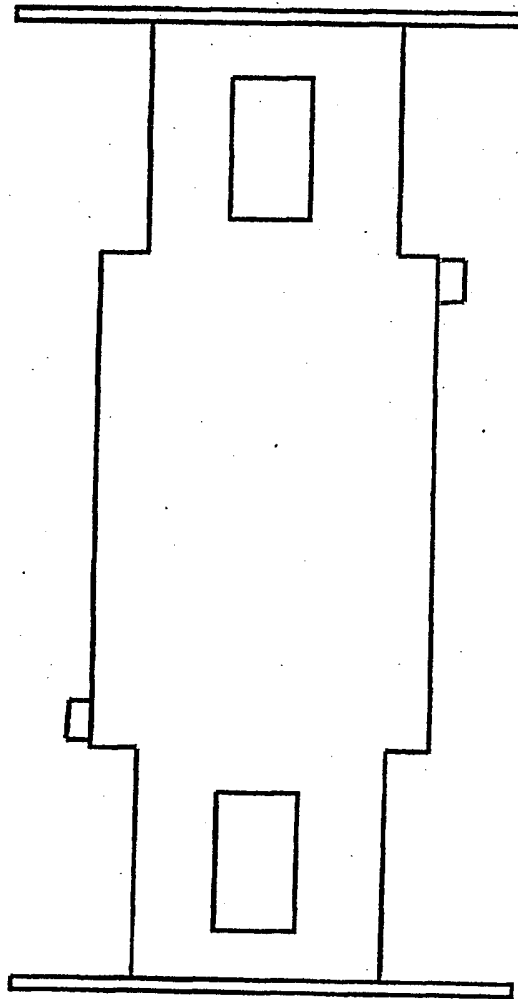


SL. 3

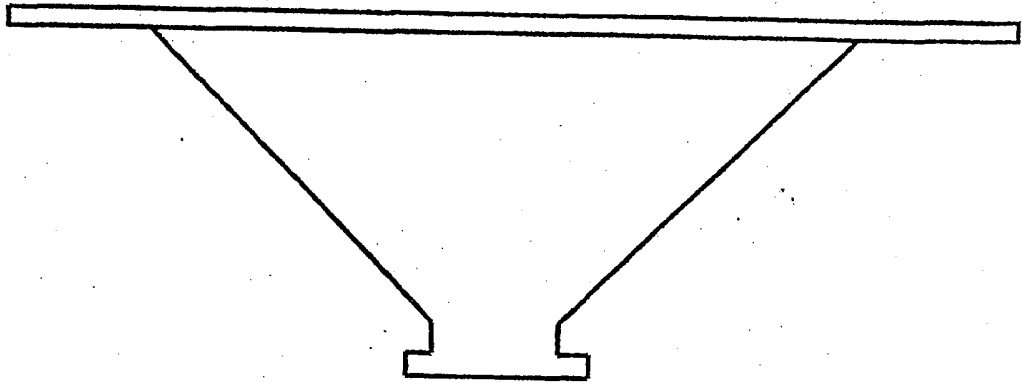


SL. 4

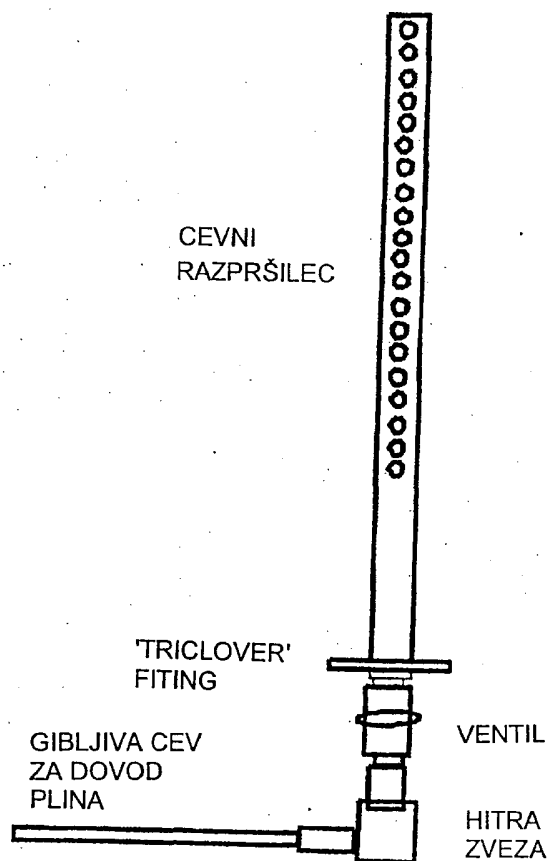
5/88



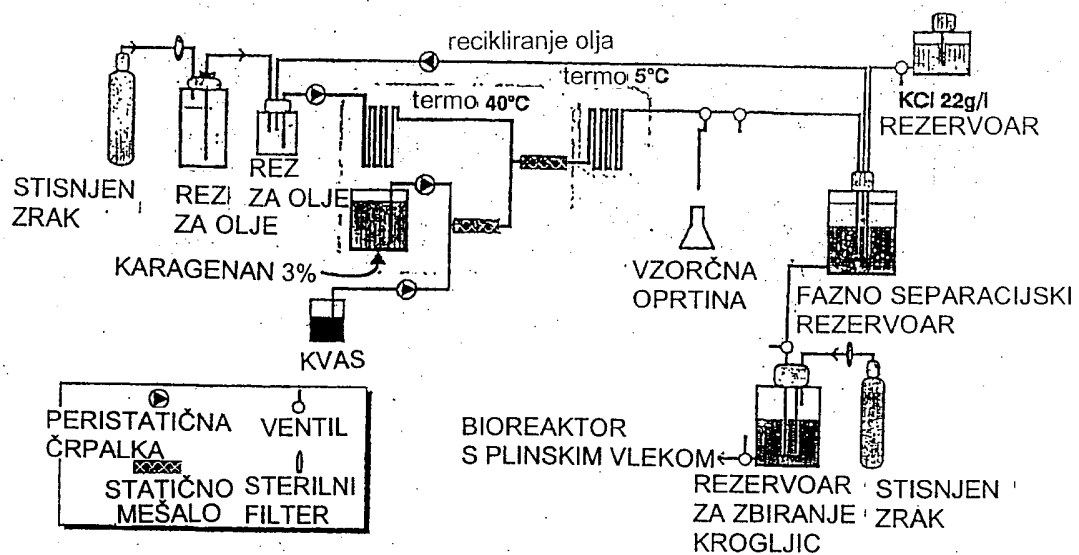
SL. 5



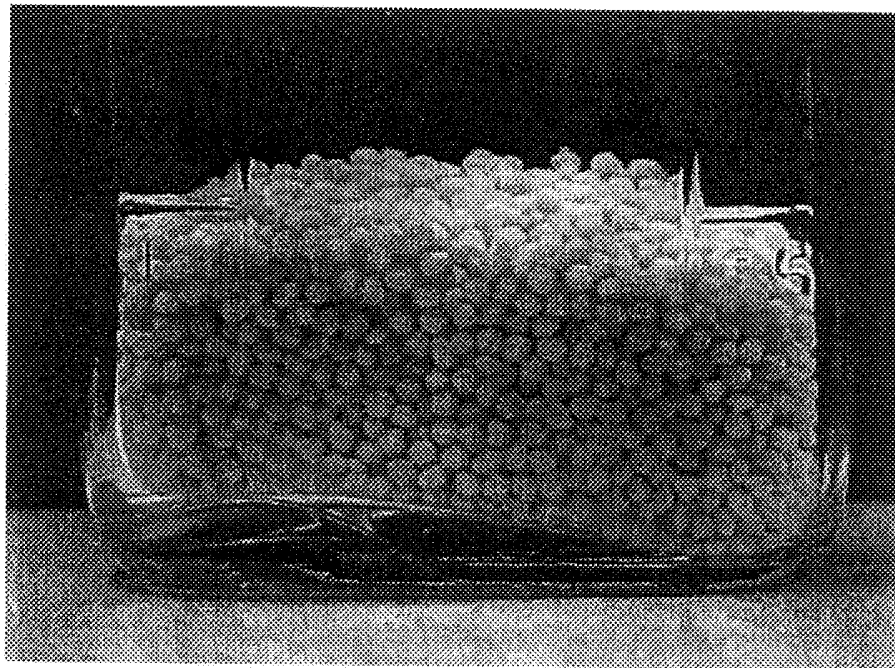
SL. 6



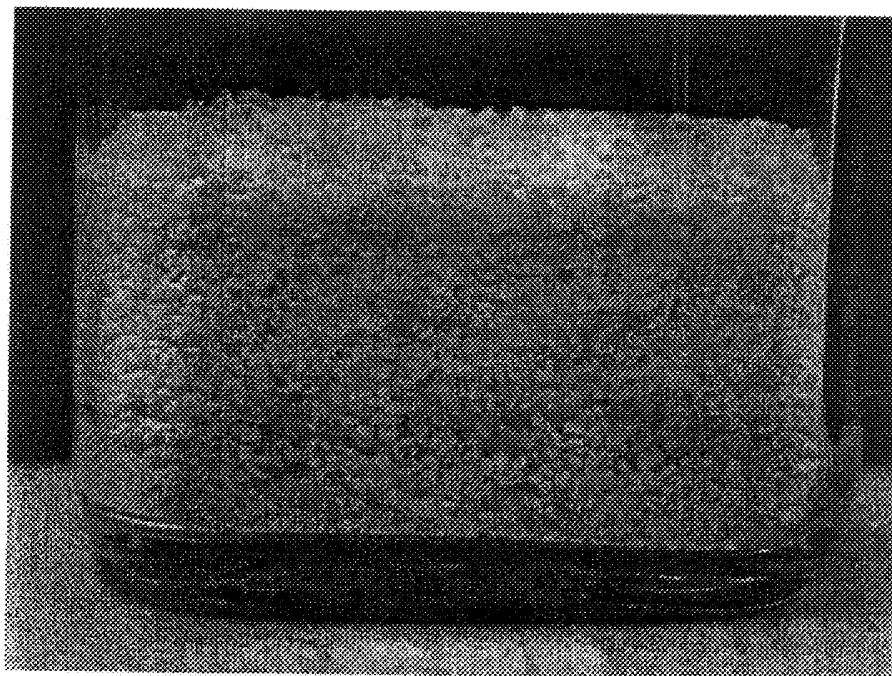
SL. 7



9/88

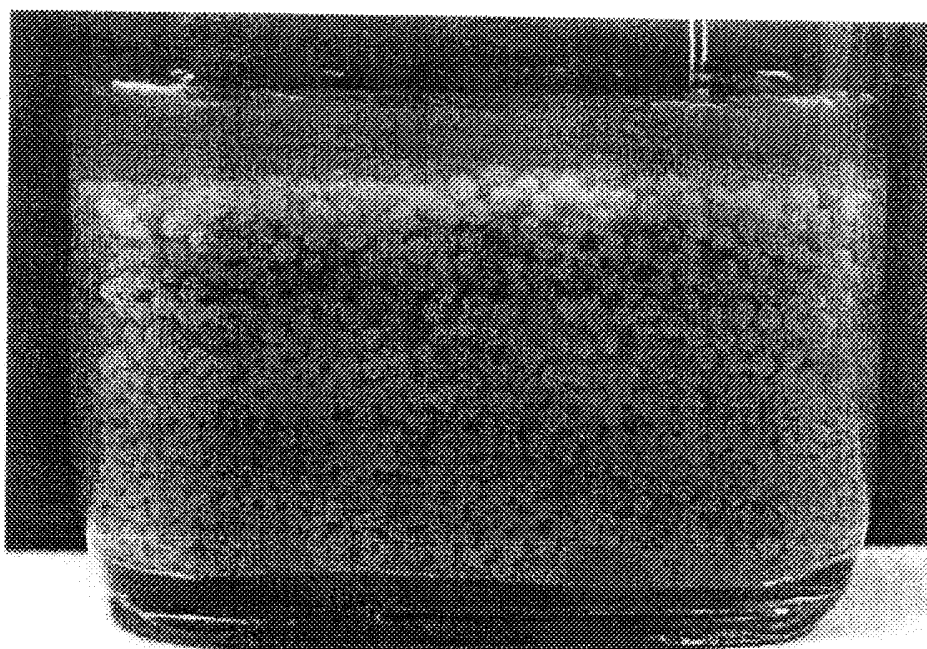


SL. 9



SL. 10

10/88

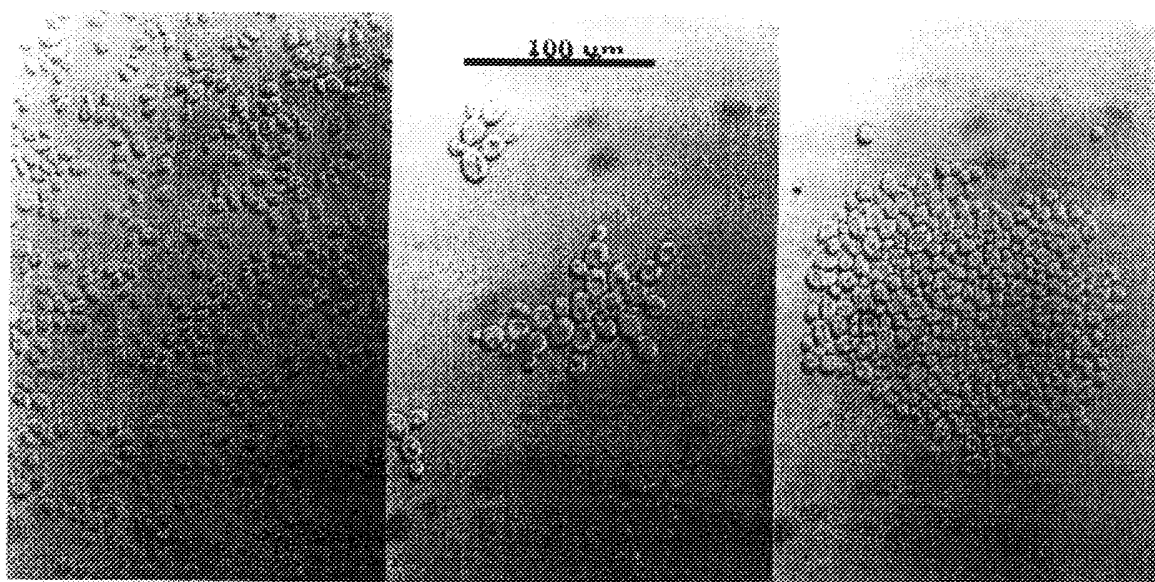


SL. 11

Non-flocculent

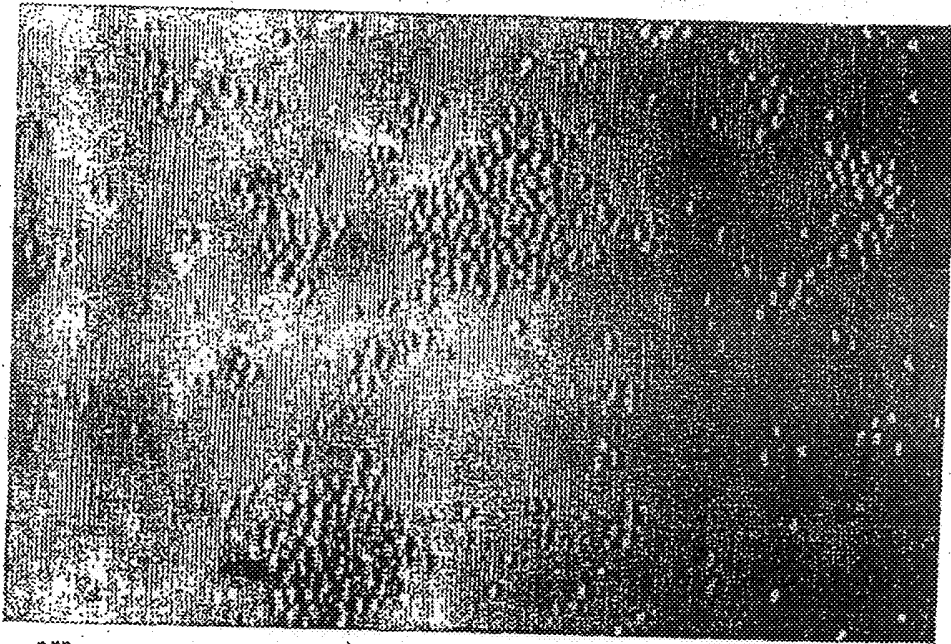
Chain Former

Flocculent

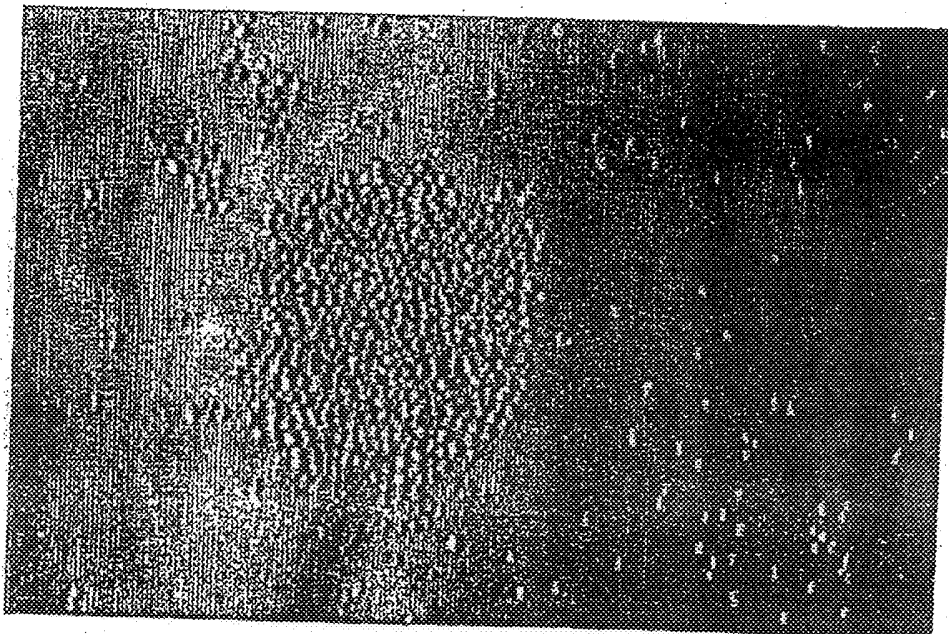


SL. 12

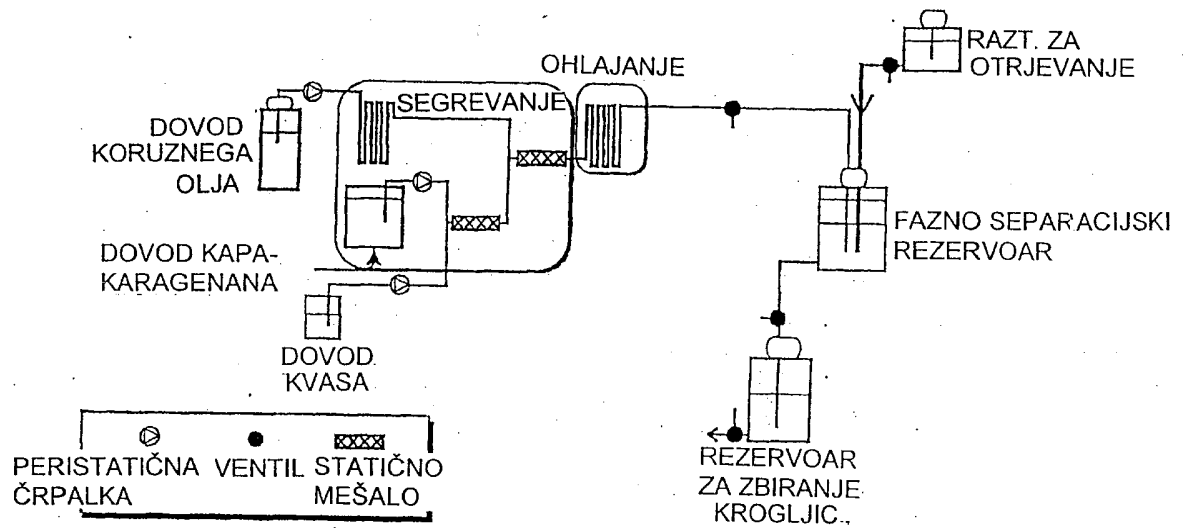
11/88



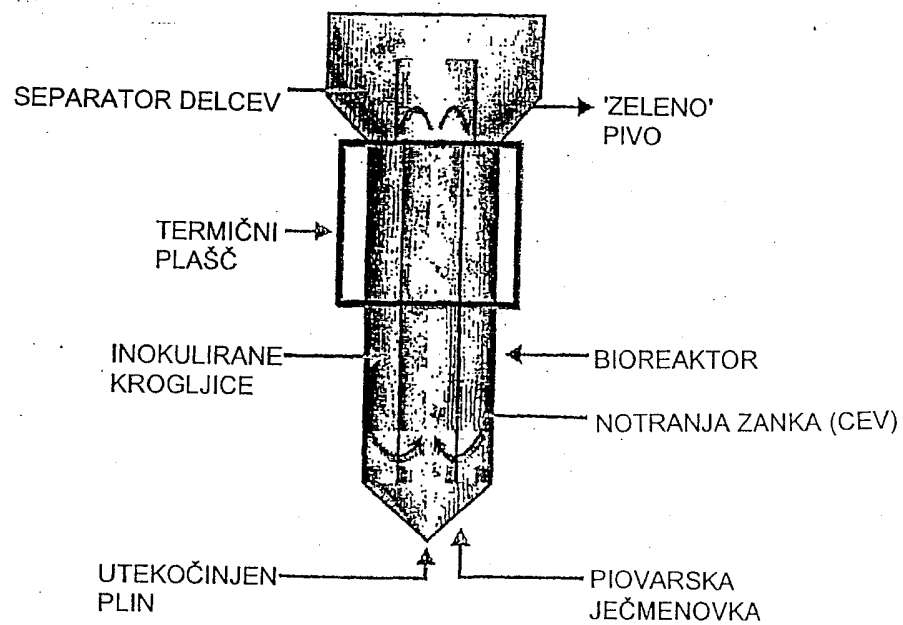
SL. 13



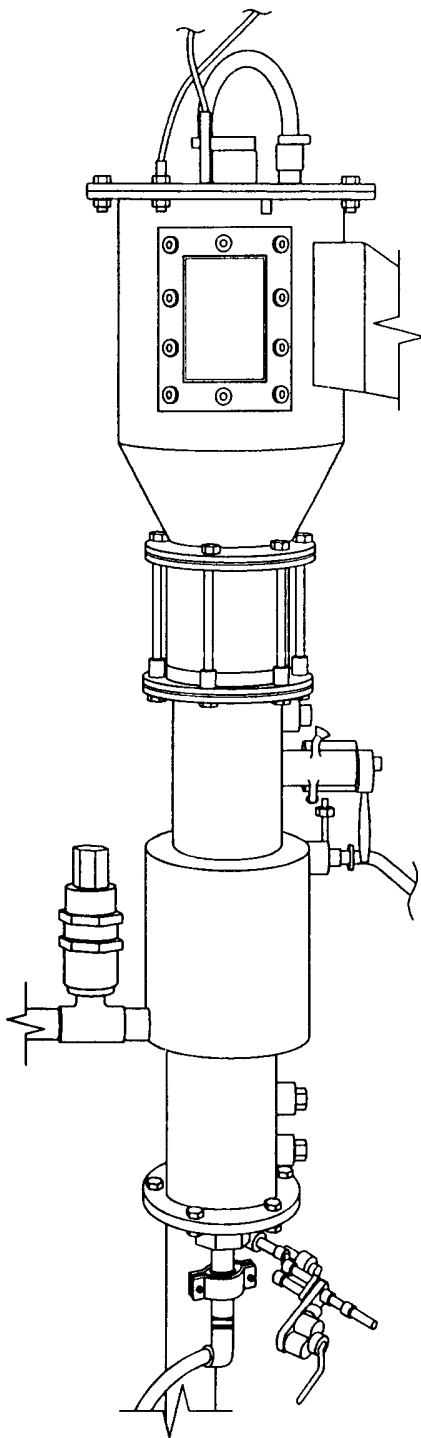
SL. 14



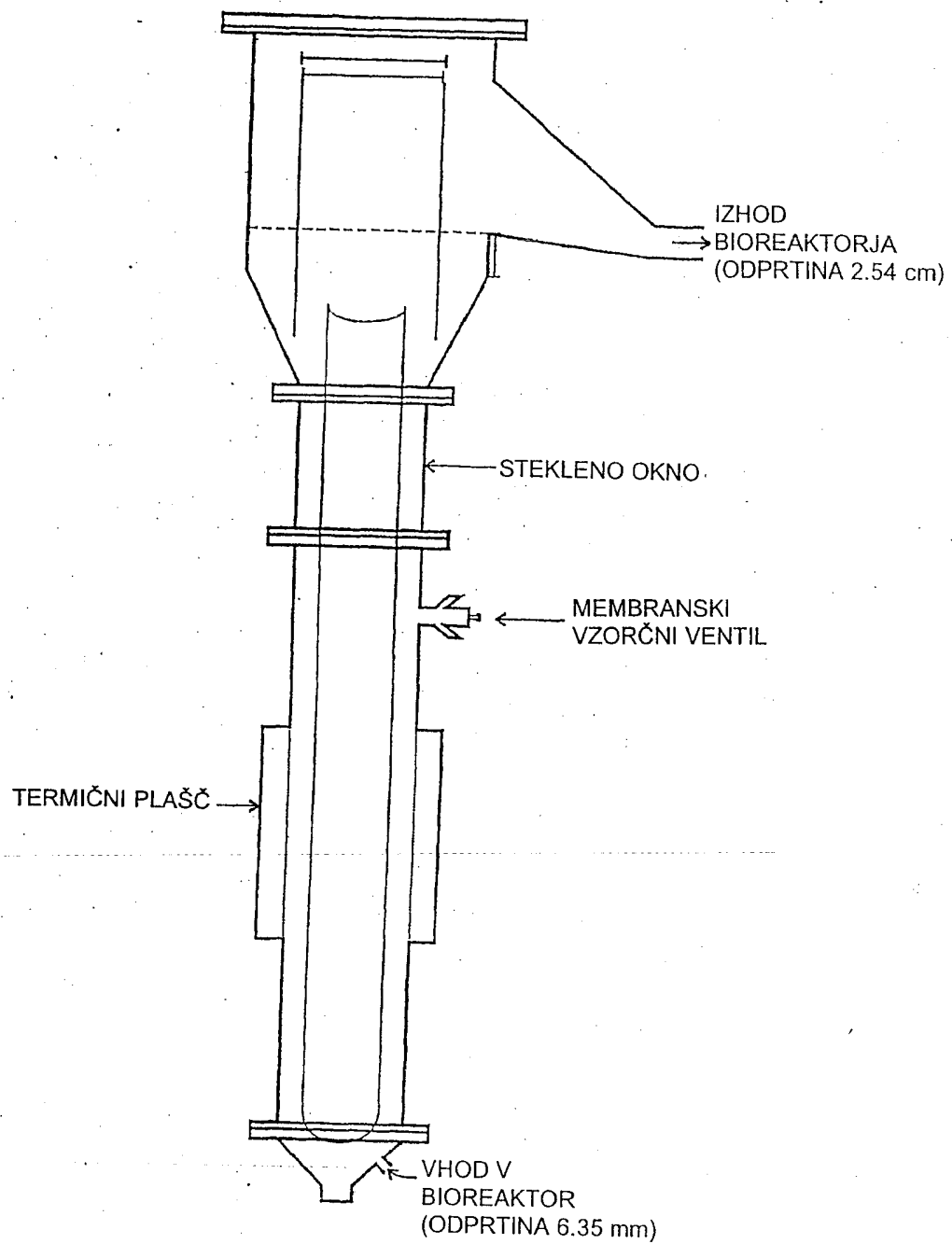
SL. 15



SL. 16

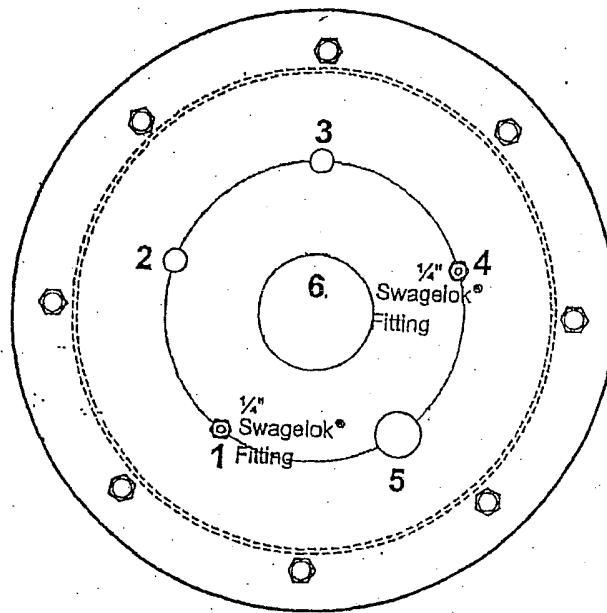


14/88

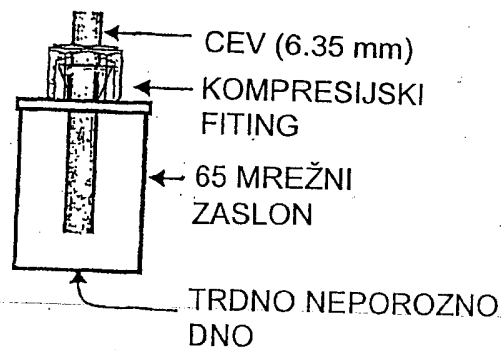


SL. 18

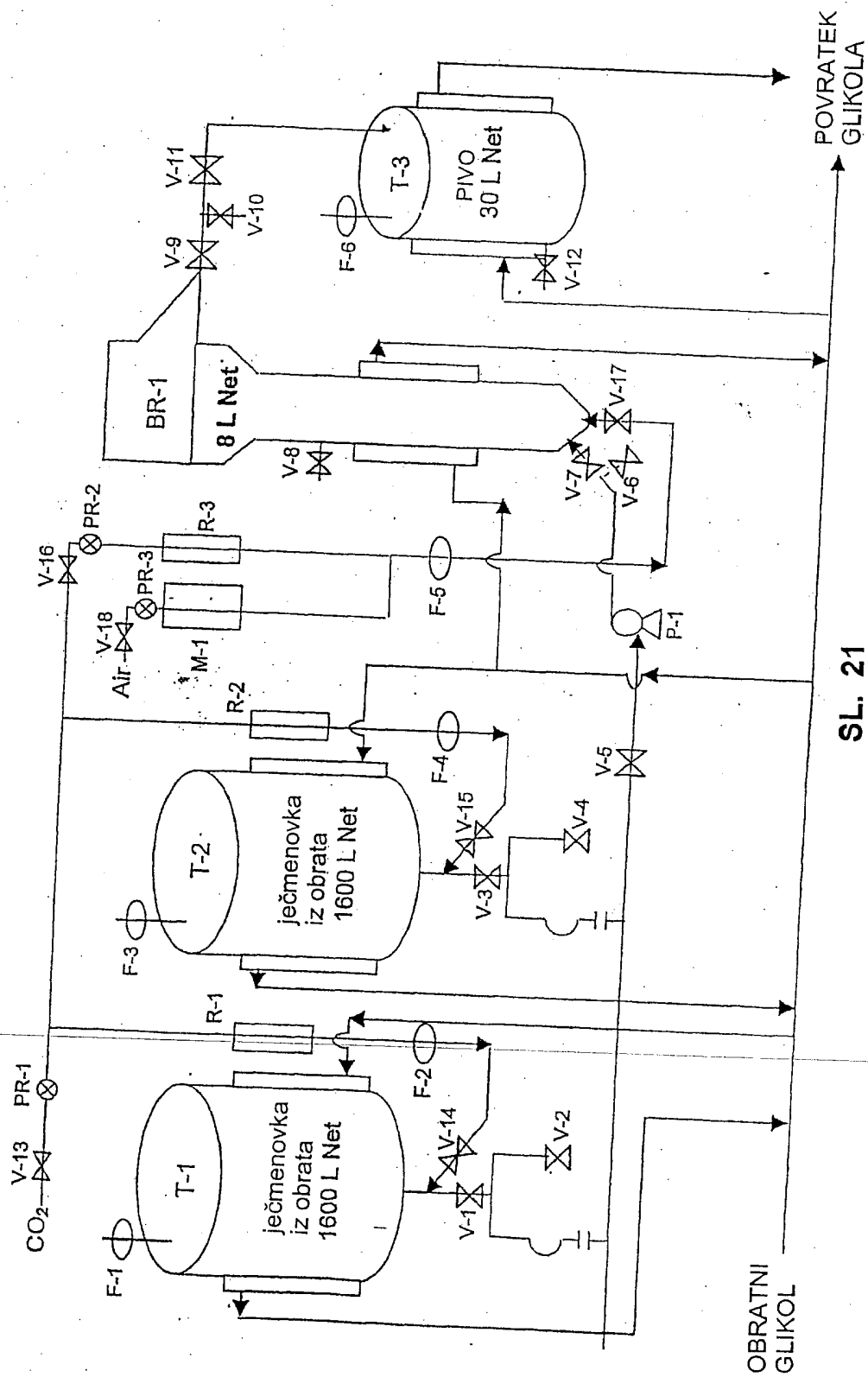
15/88



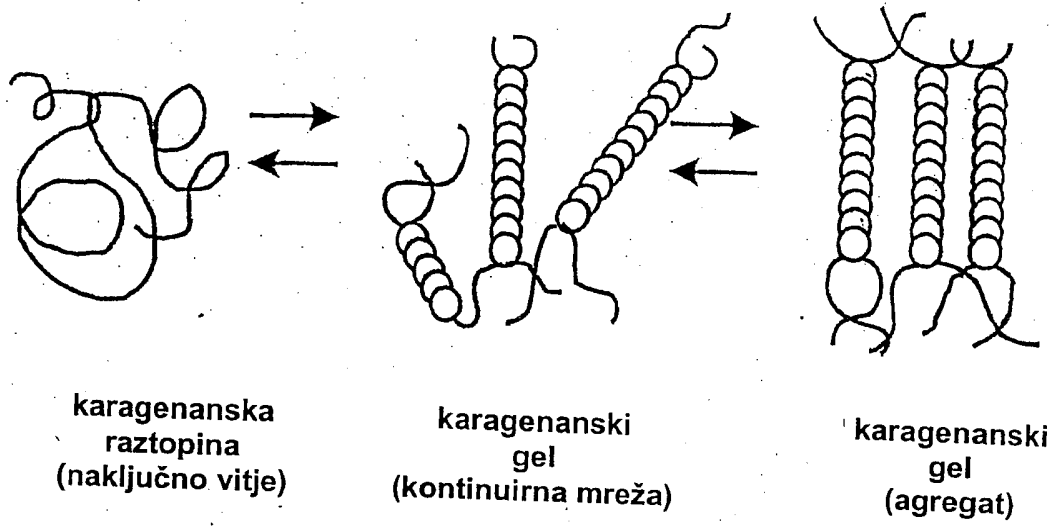
SL. 19



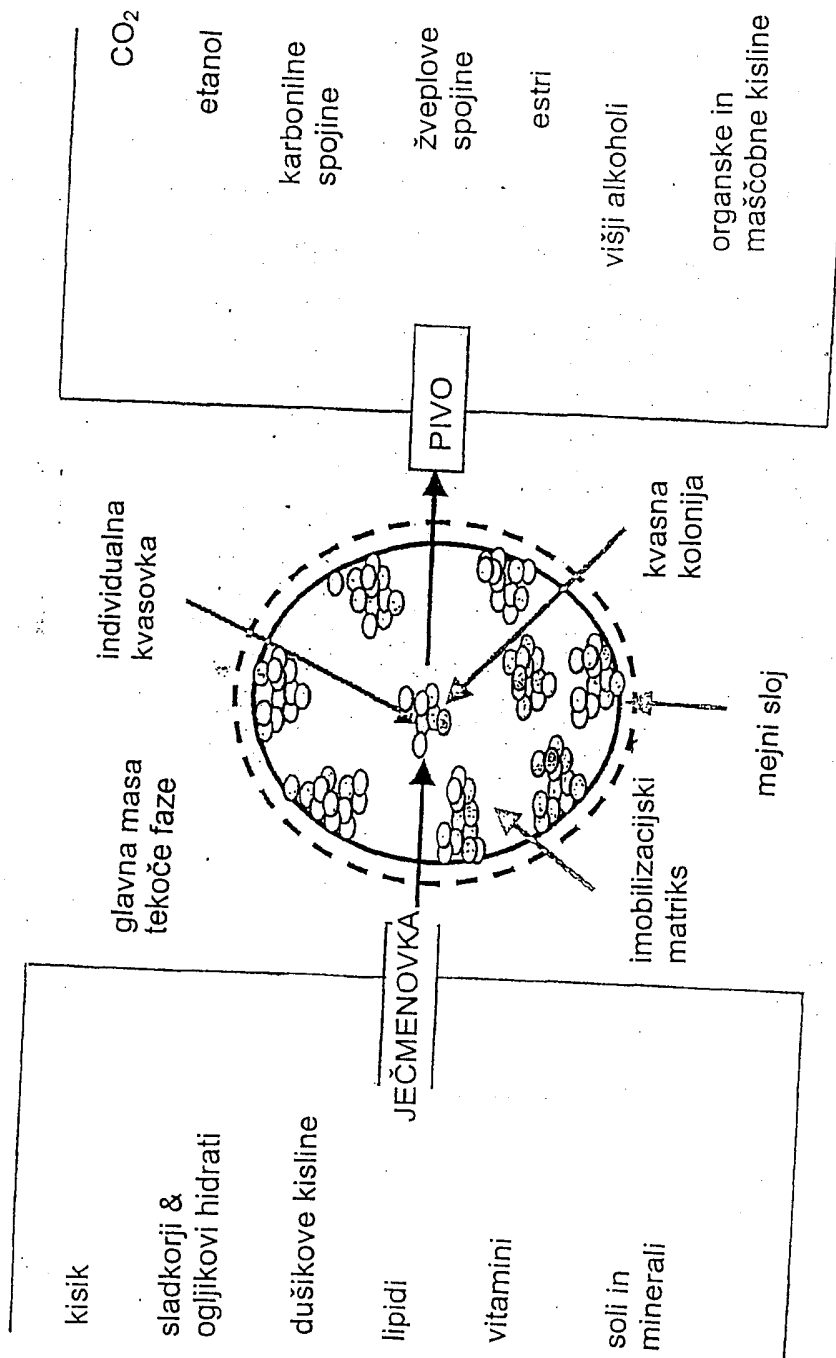
SL. 20



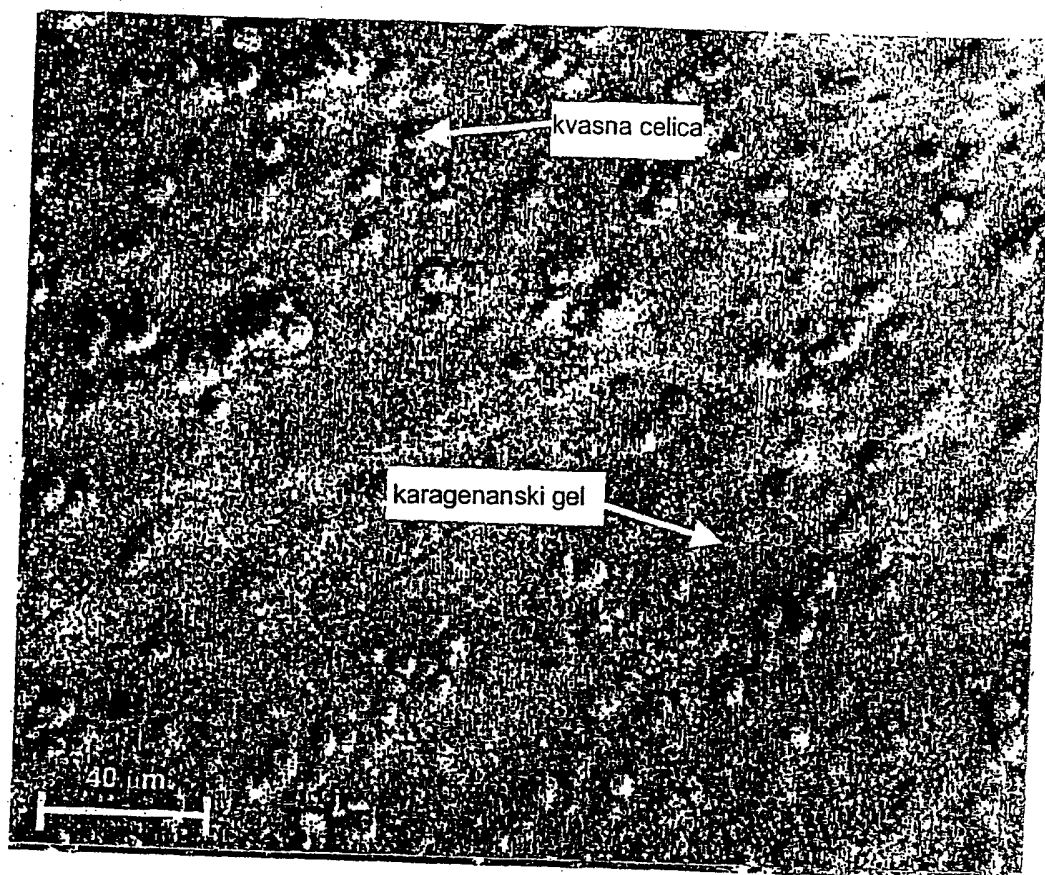
SL. 21



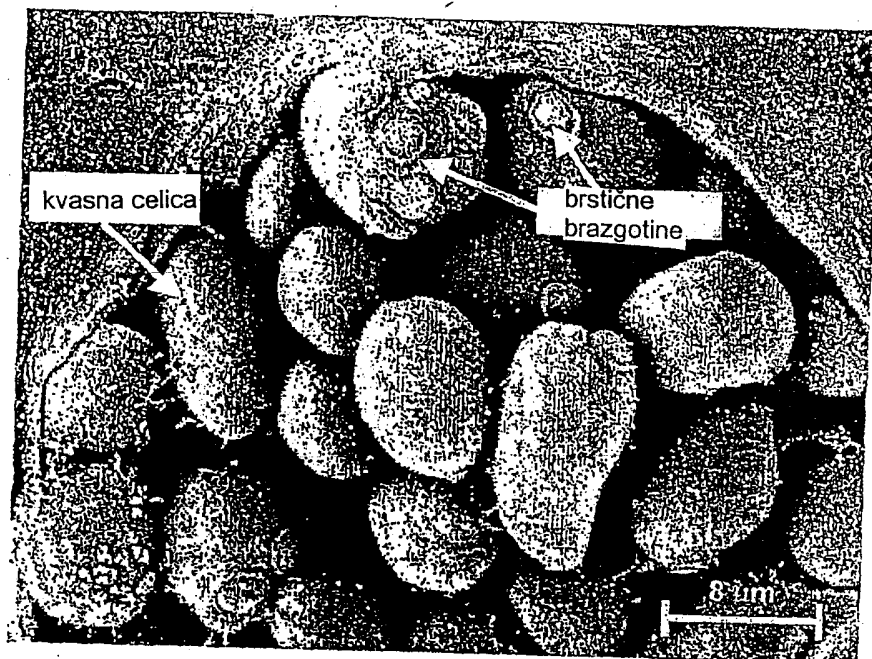
SL. 22



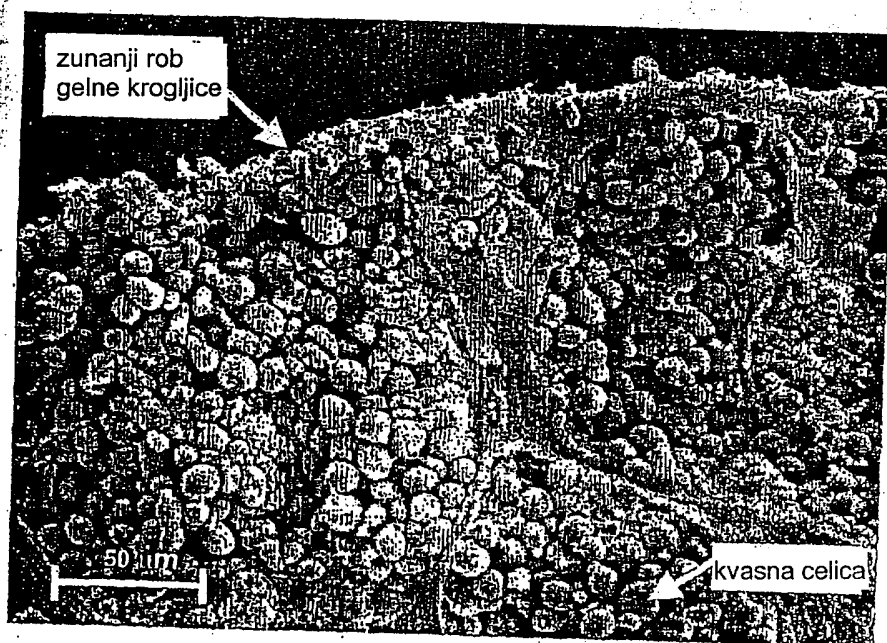
SL. 23



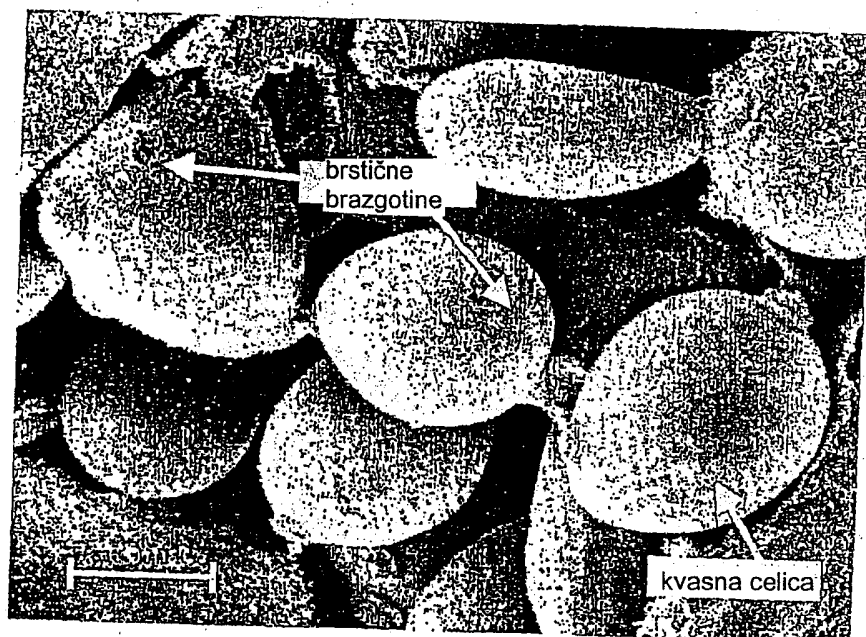
SL. 24



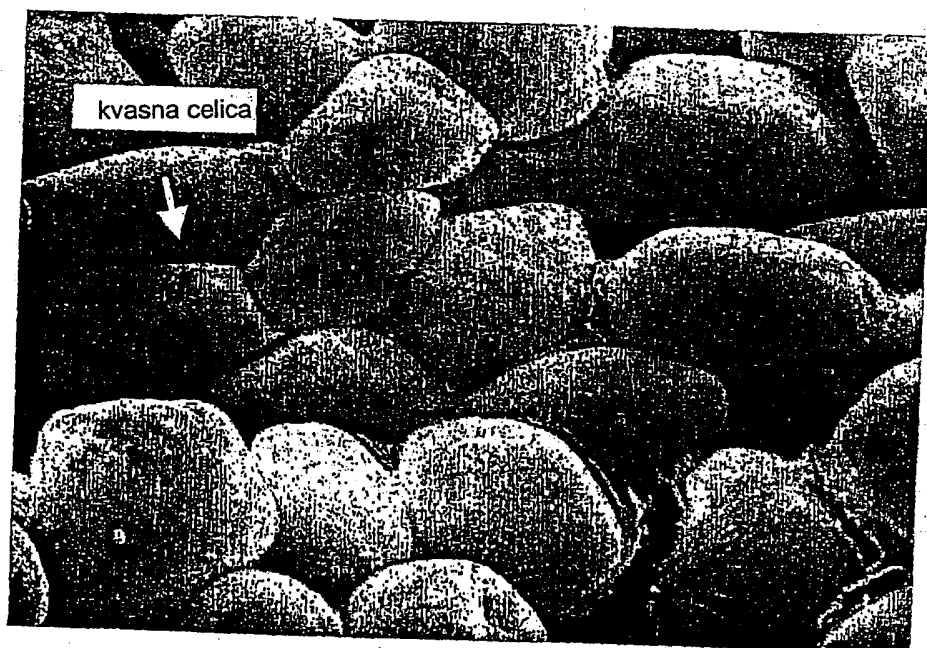
SL. 25



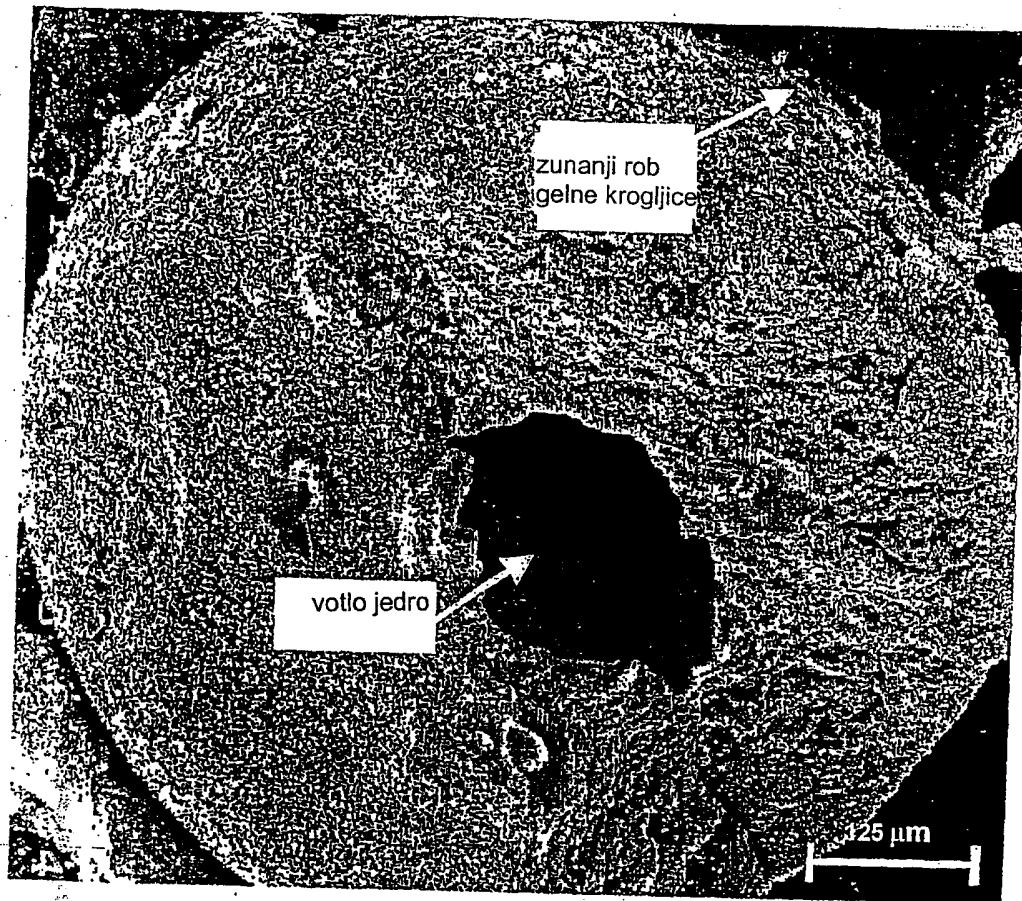
SL. 26



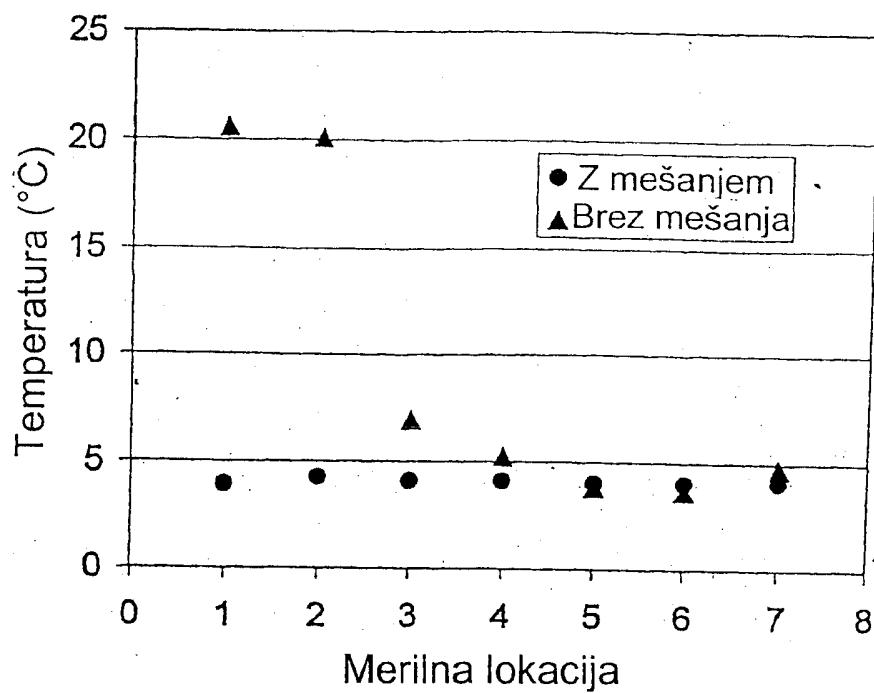
SL. 27



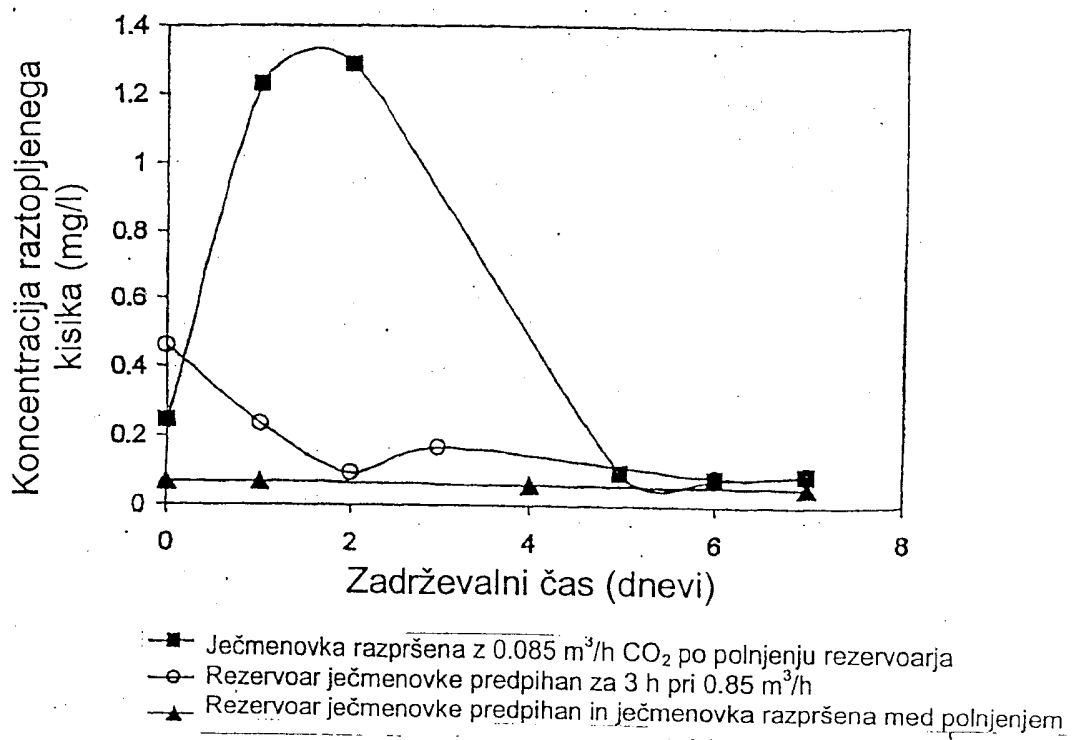
SL. 28



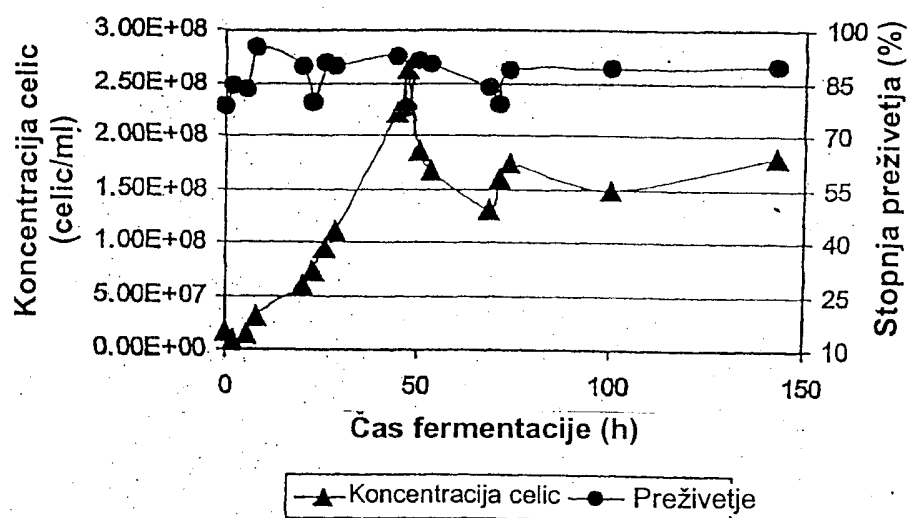
SL. 29



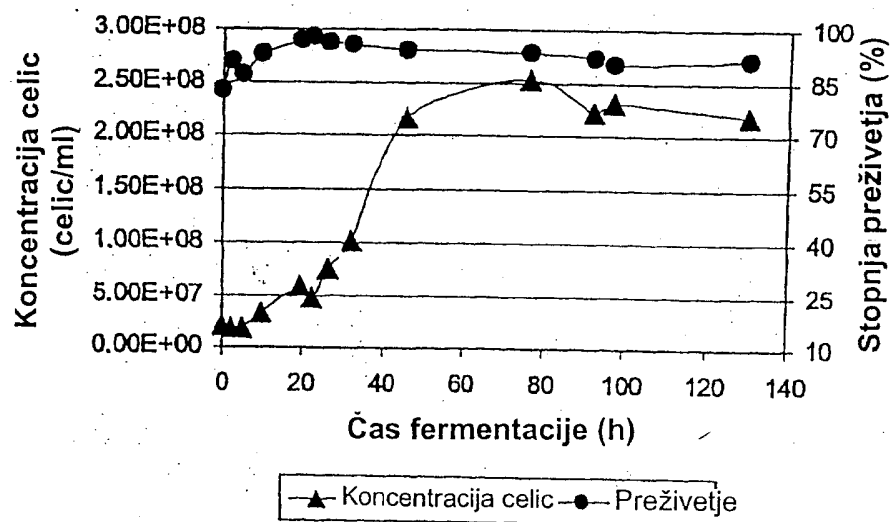
SL. 5.8



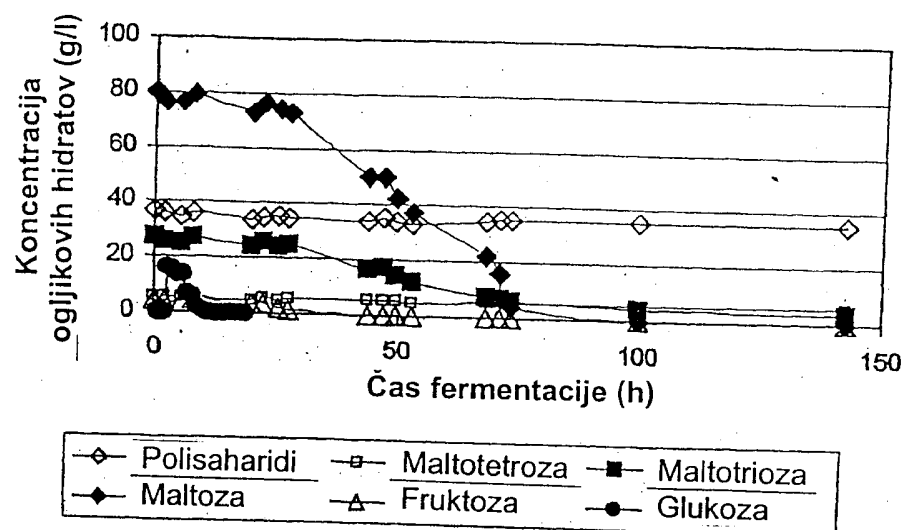
SL. 5.9



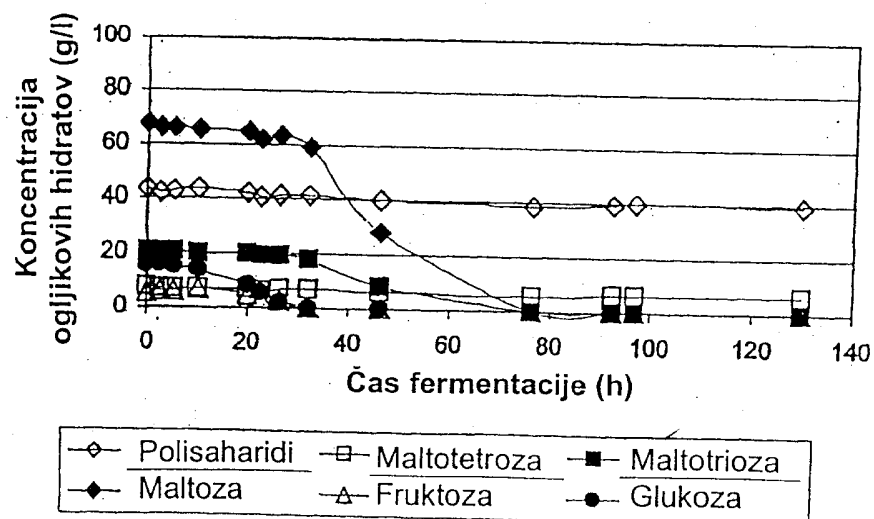
SL. 6.1



SL. 6.2

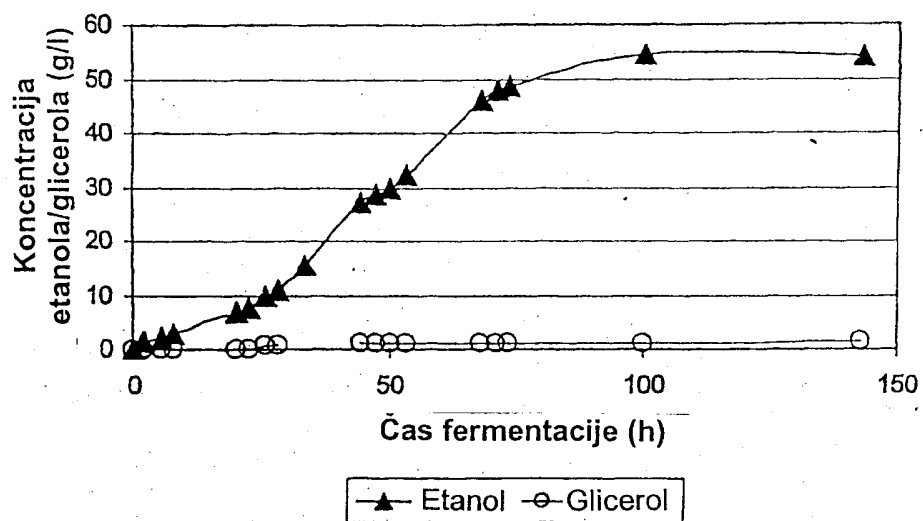


SL. 6.3

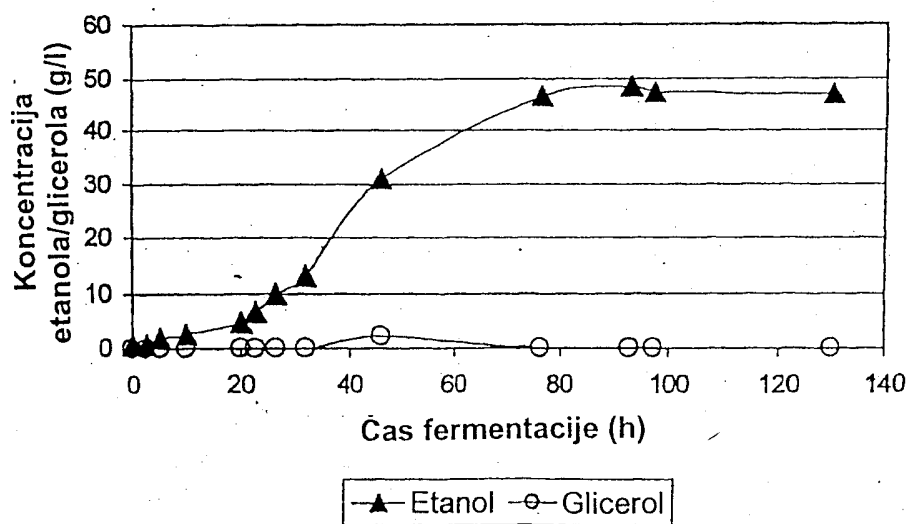


SL. 6.4

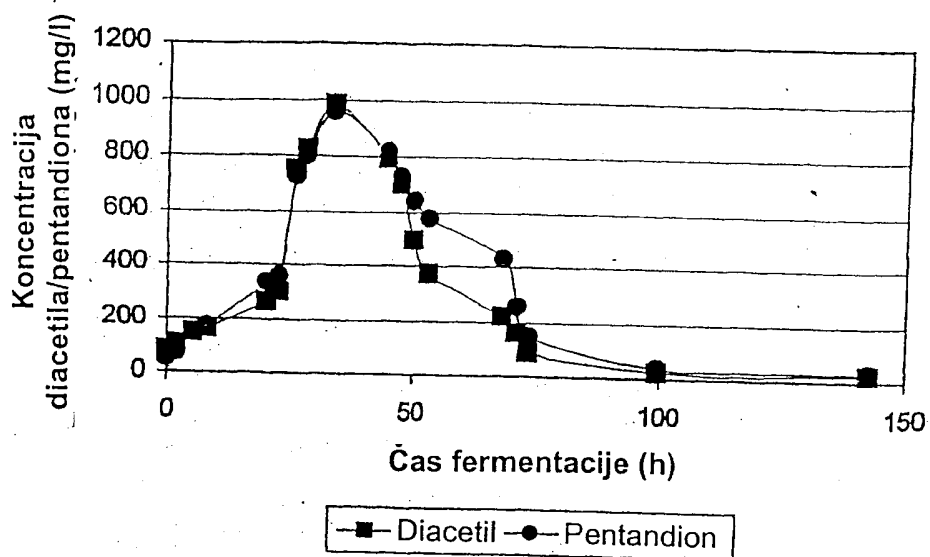
26/88



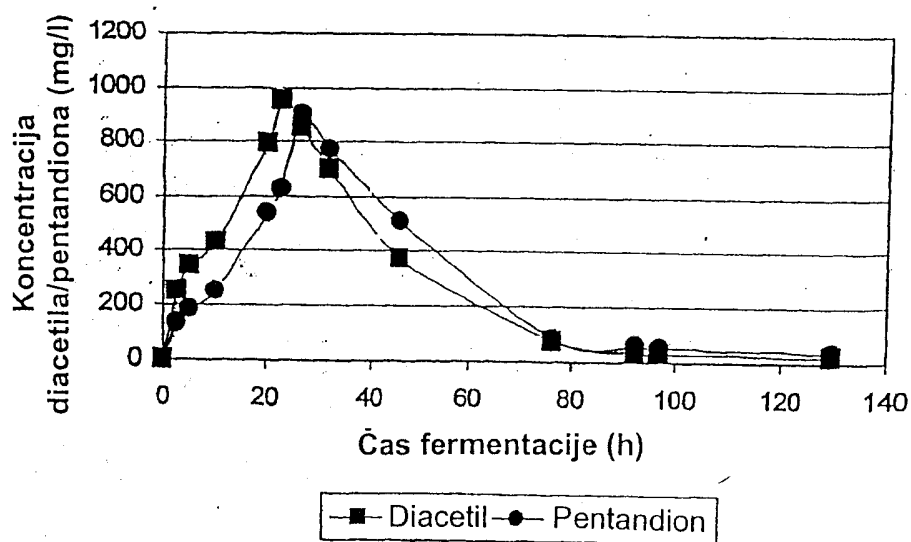
SL. 6.5



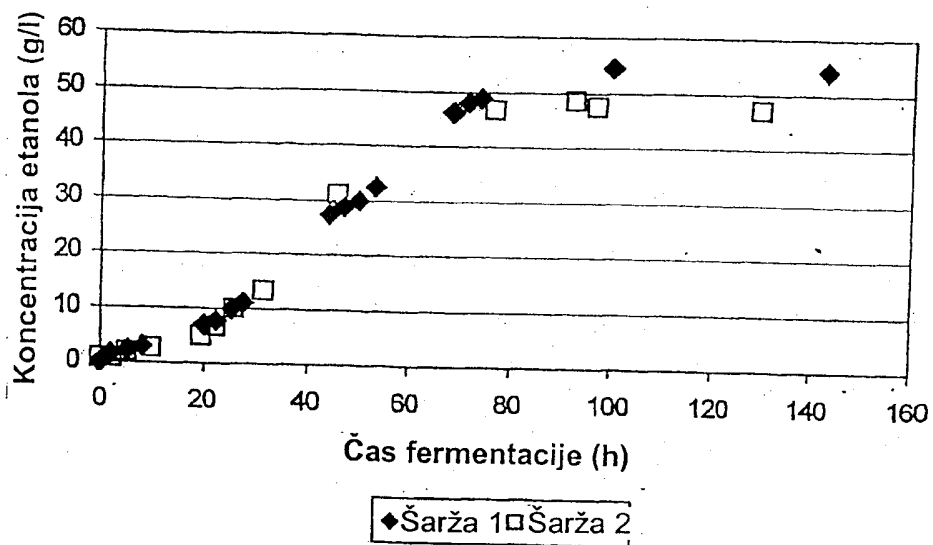
SL. 6.6



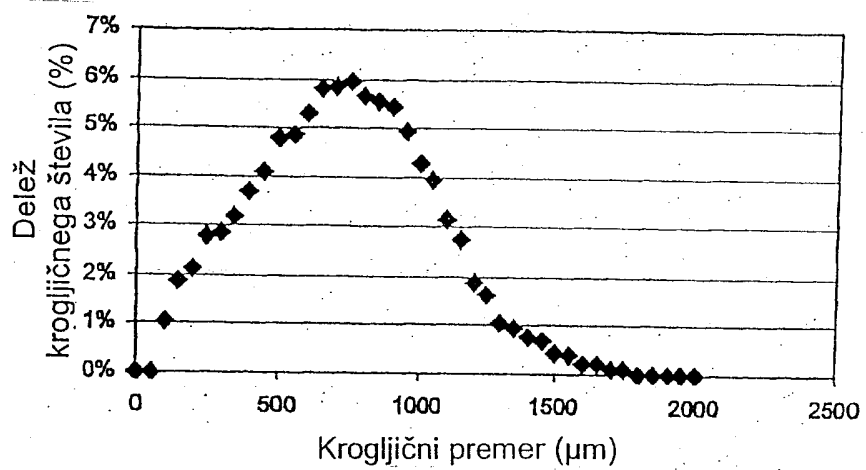
SL. 6.7



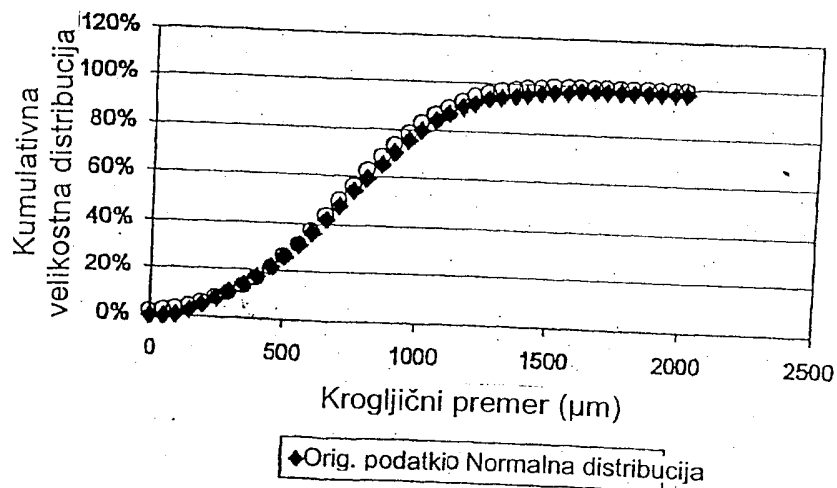
SL. 6.8



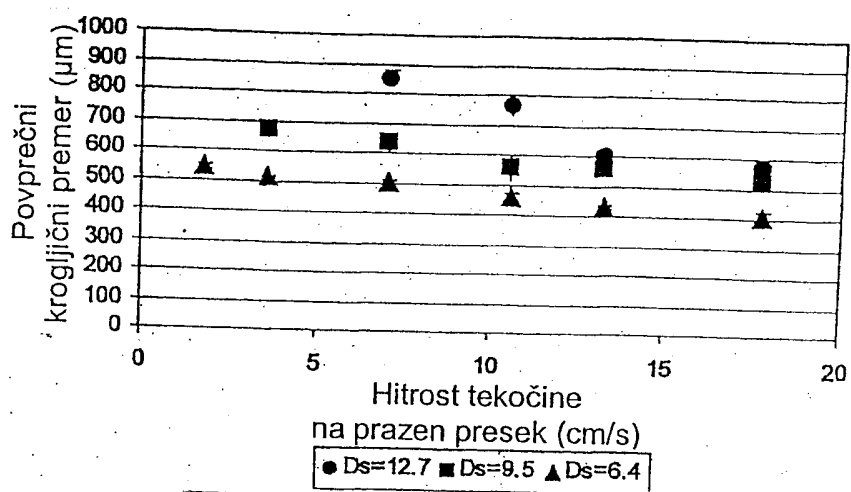
SL. 6.9



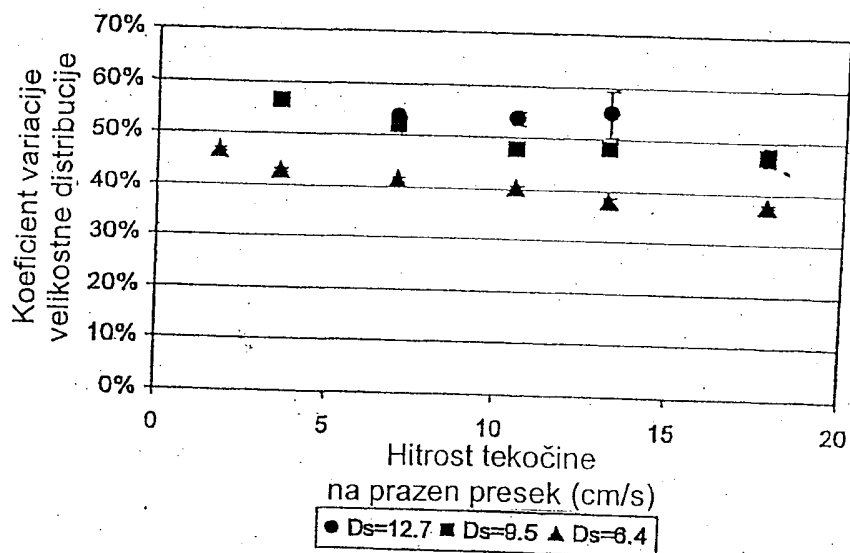
SL. 6.12



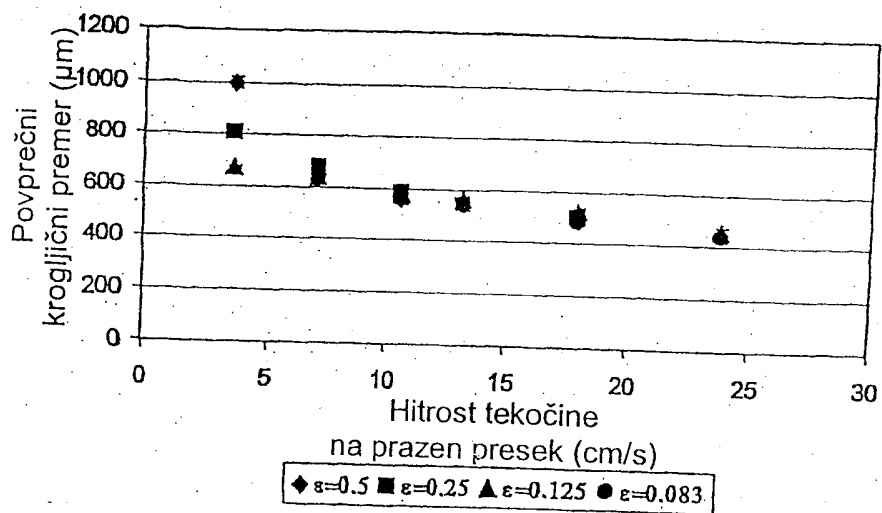
SL. 6.13



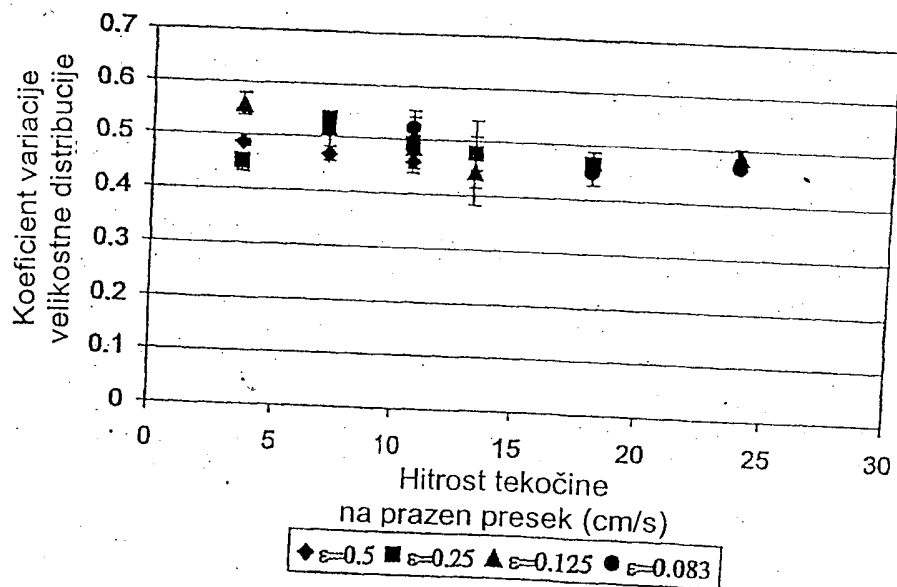
SL. 6.14



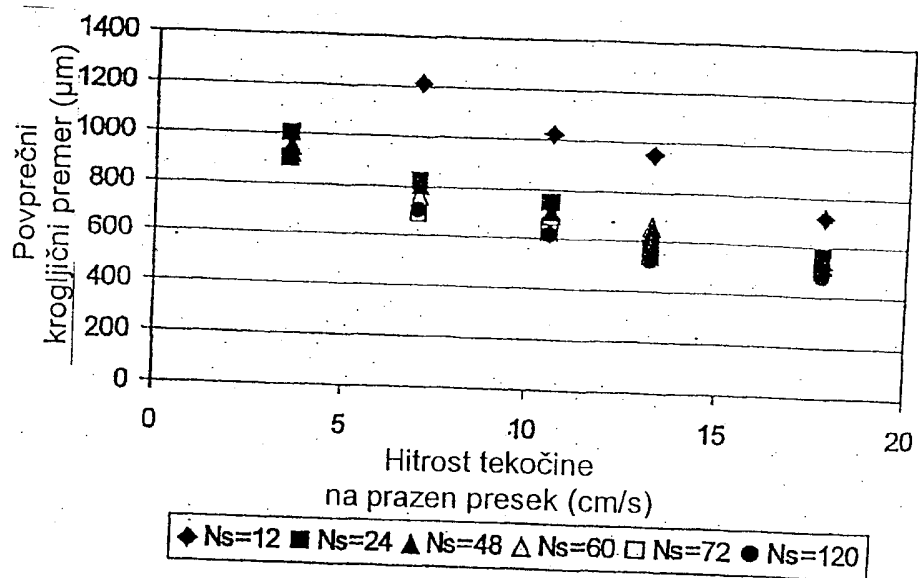
SL. 6.15



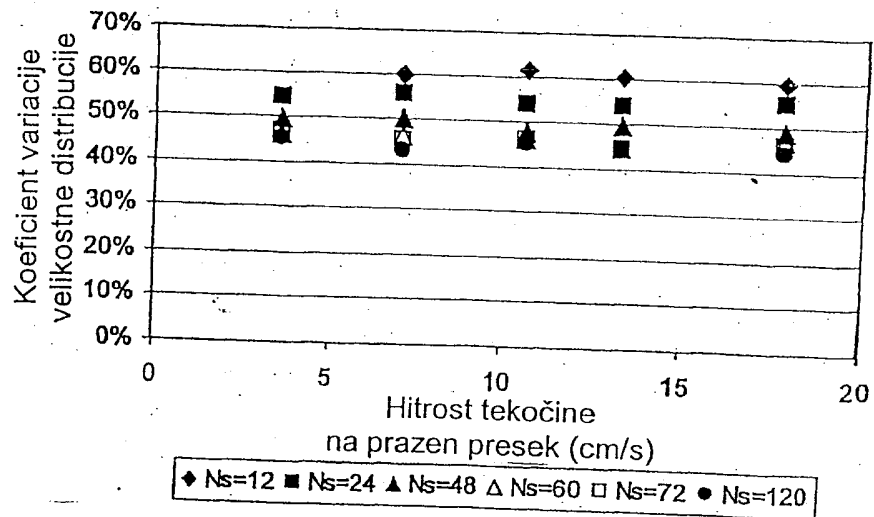
SL. 6.16



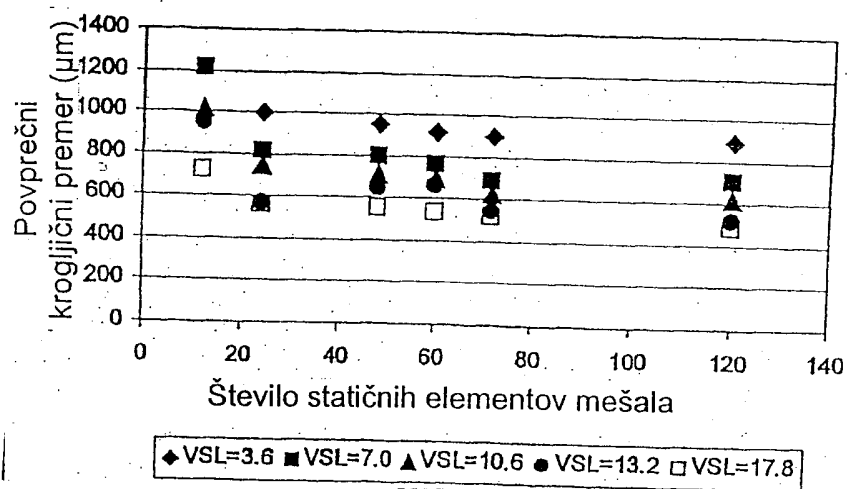
SL. 6.17



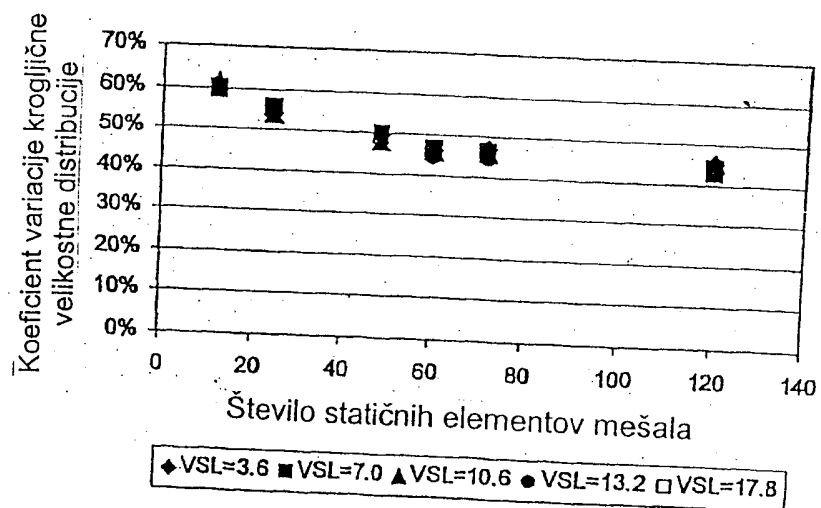
SL. 6.18



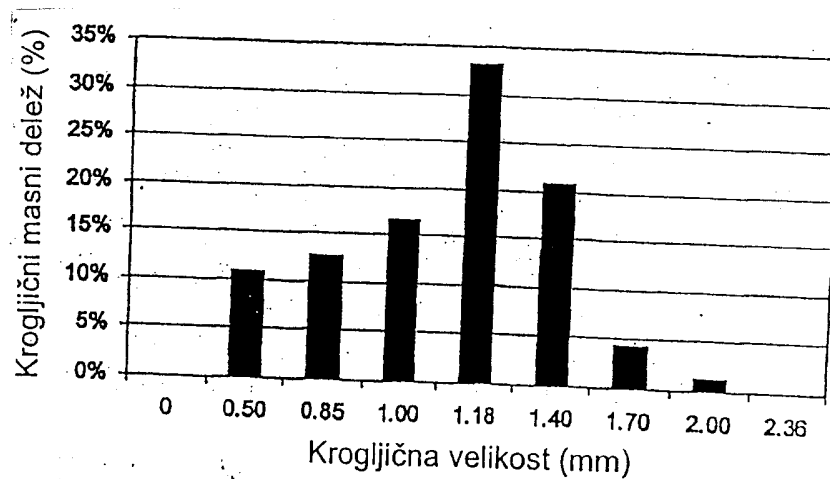
SL. 6.19



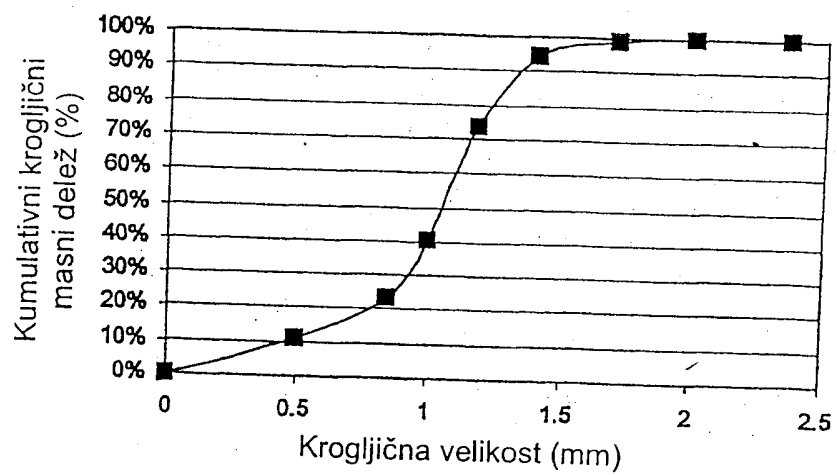
SL. 6.20



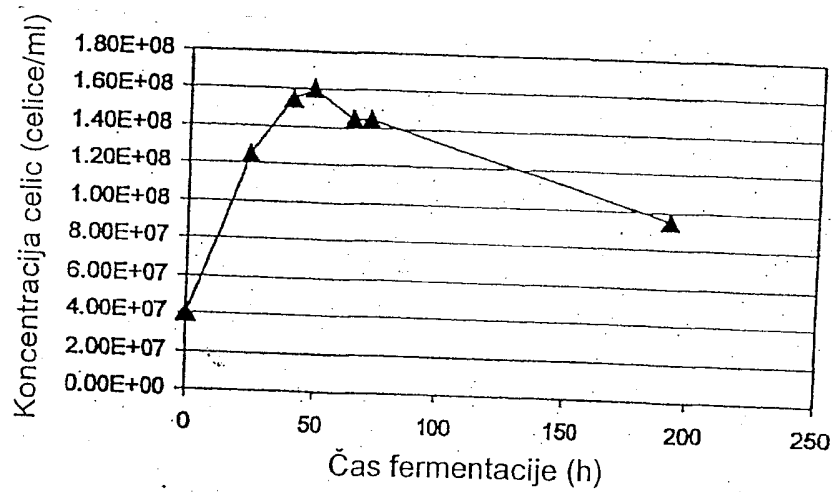
SL. 6.21



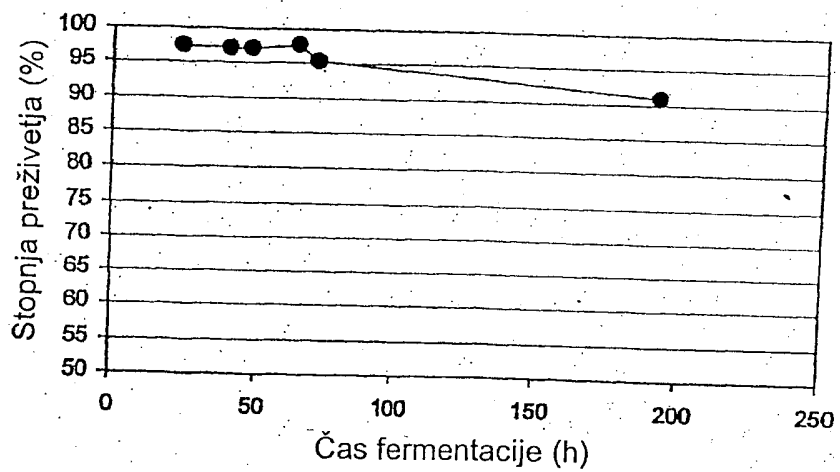
SL. 6.23



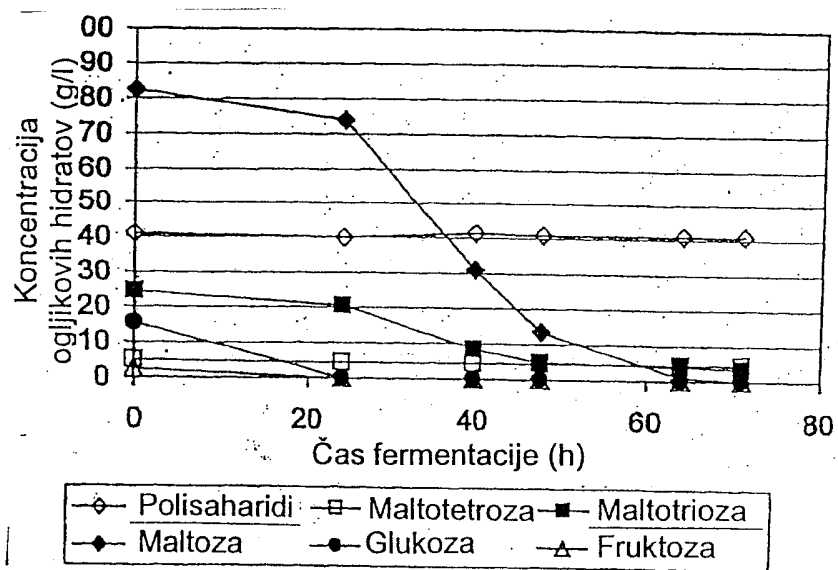
SL. 6.24



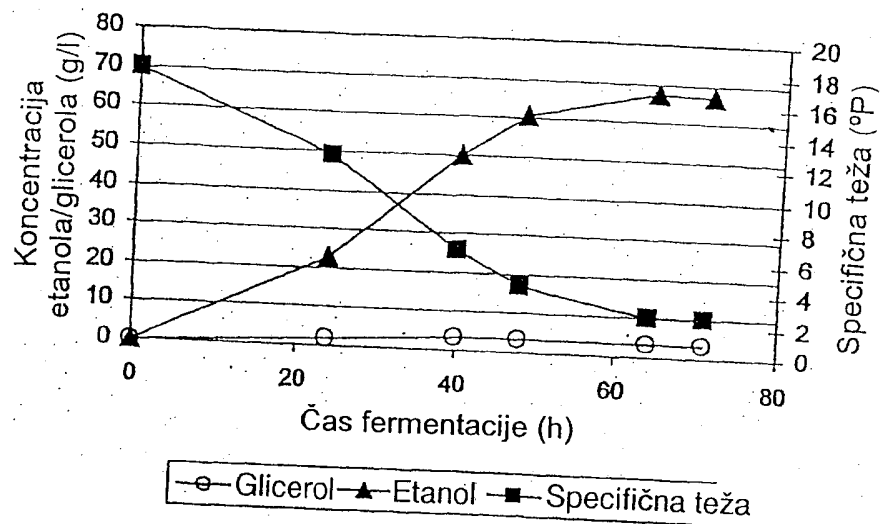
SL. 6.28



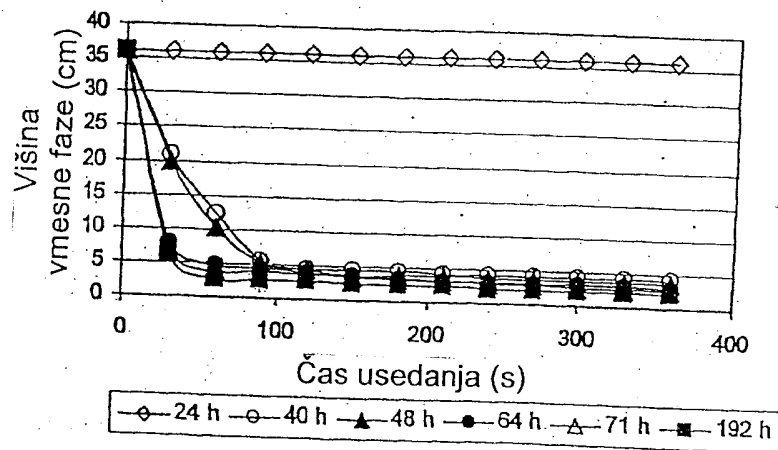
SL. 6.29



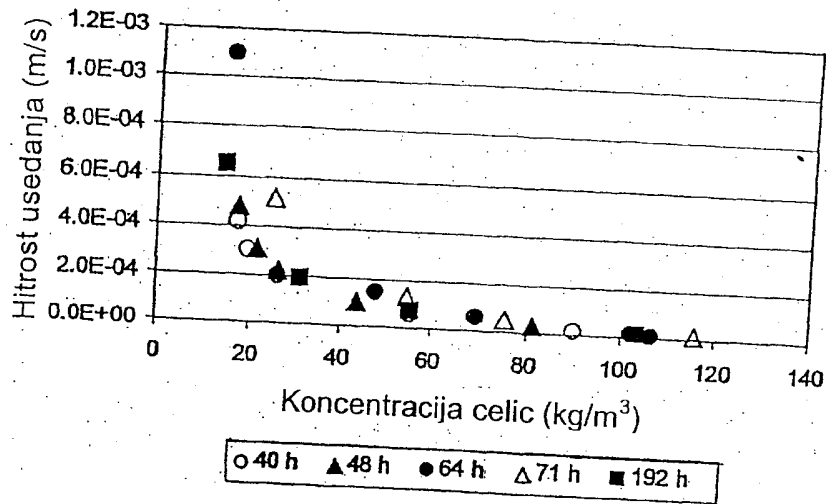
SL. 6.30



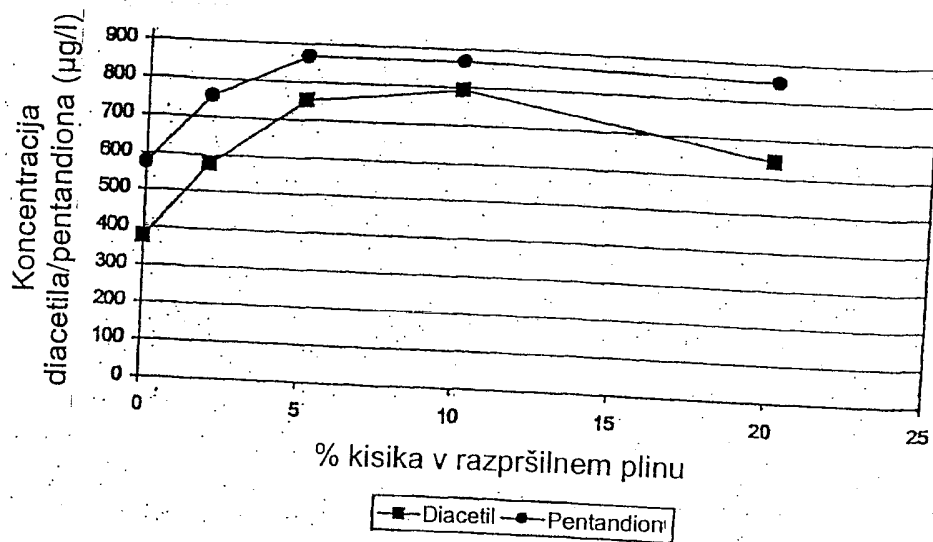
SL. 6.31



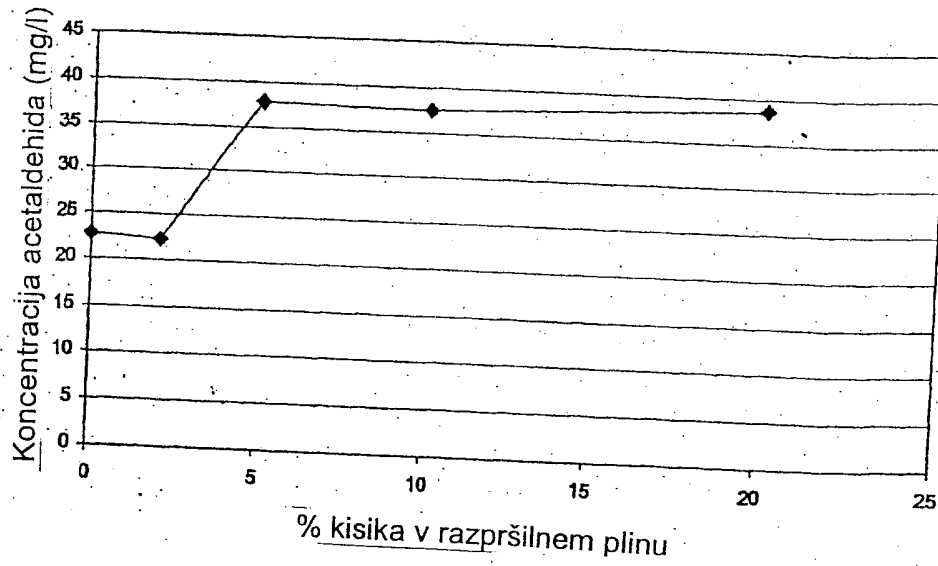
SL. 6.32



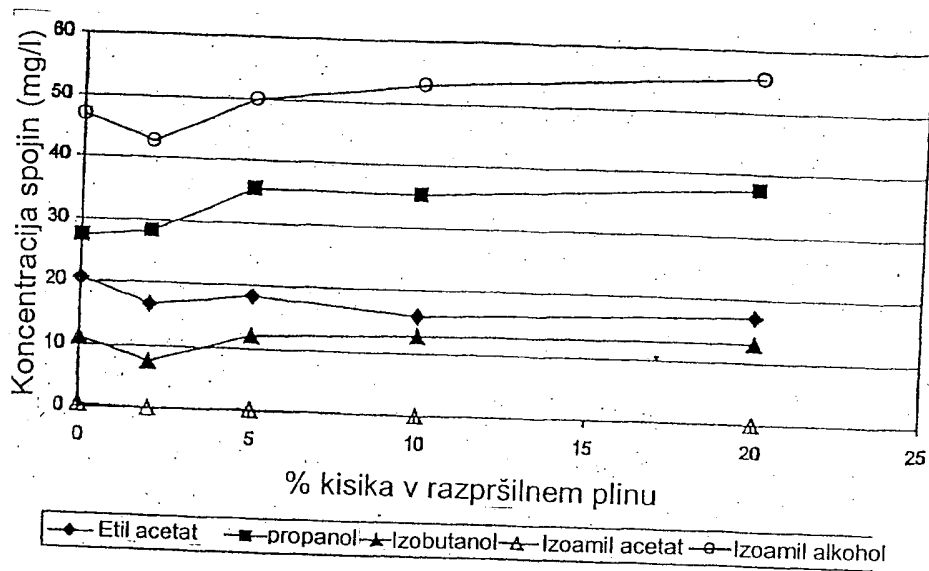
SL. 6.33



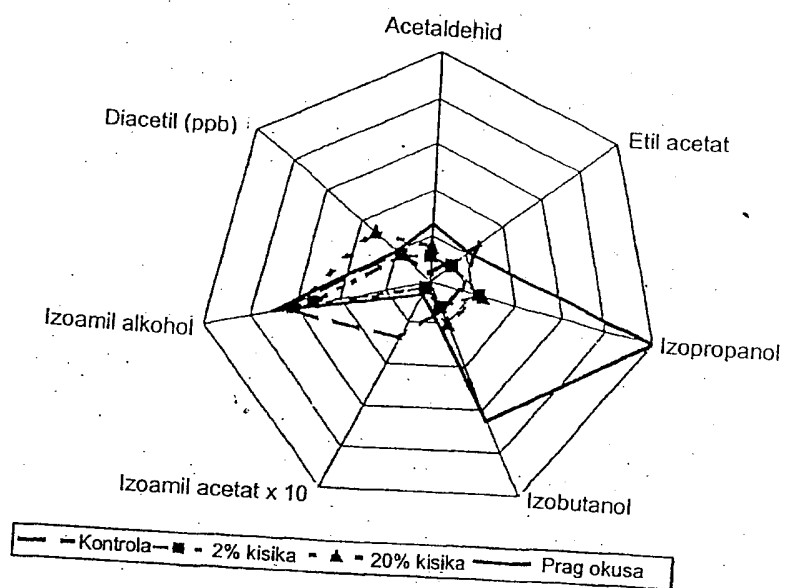
SL. 6.34



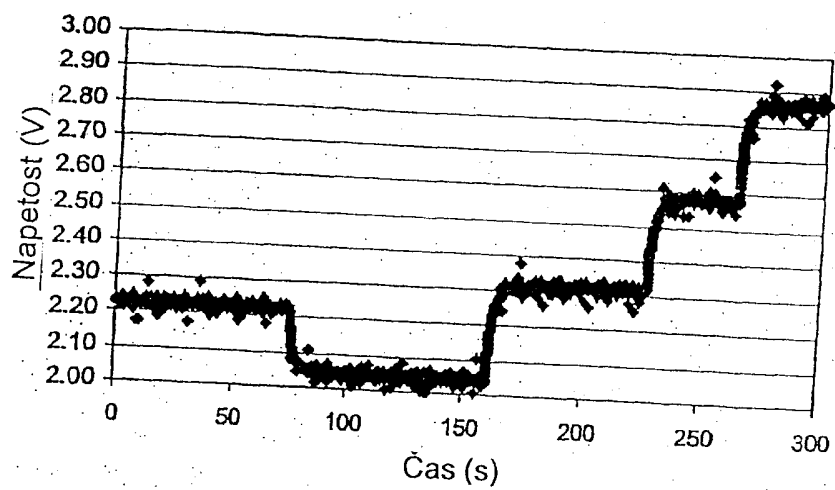
SL. 6.35



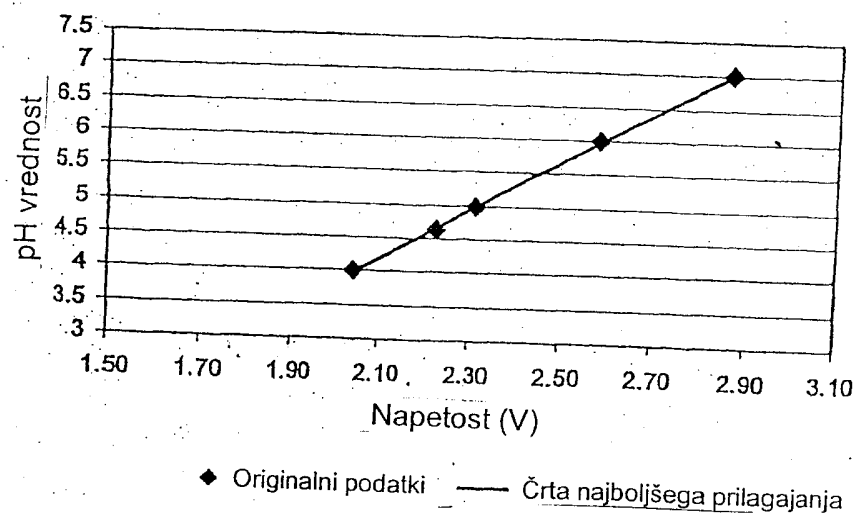
SL. 6.36



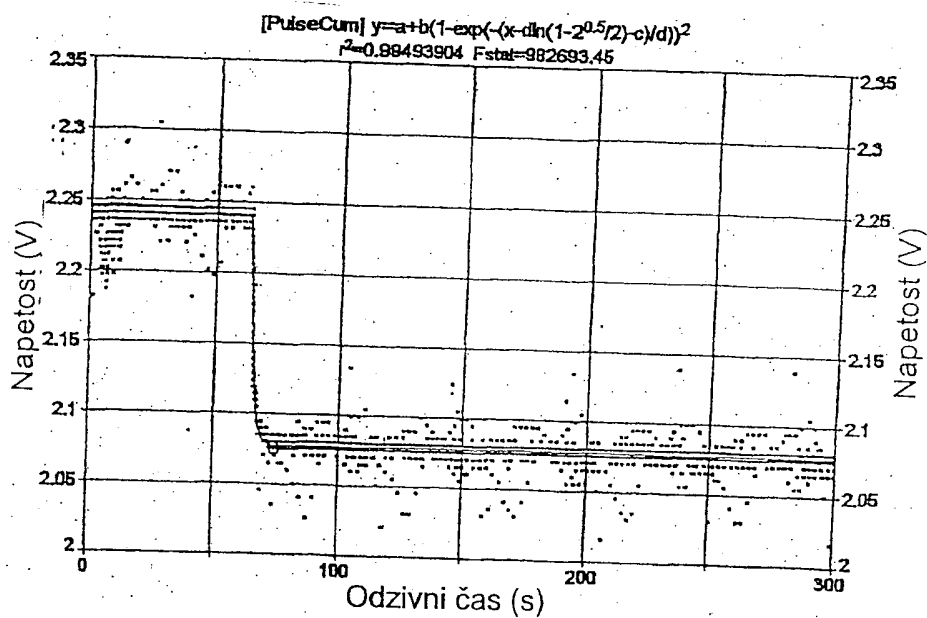
SL. 6.37



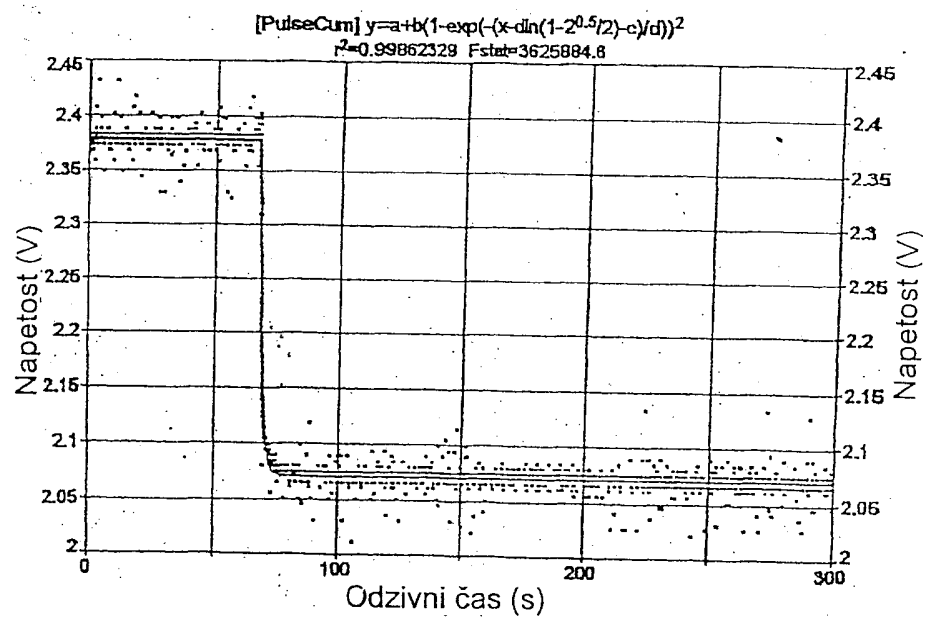
SL. 6.38



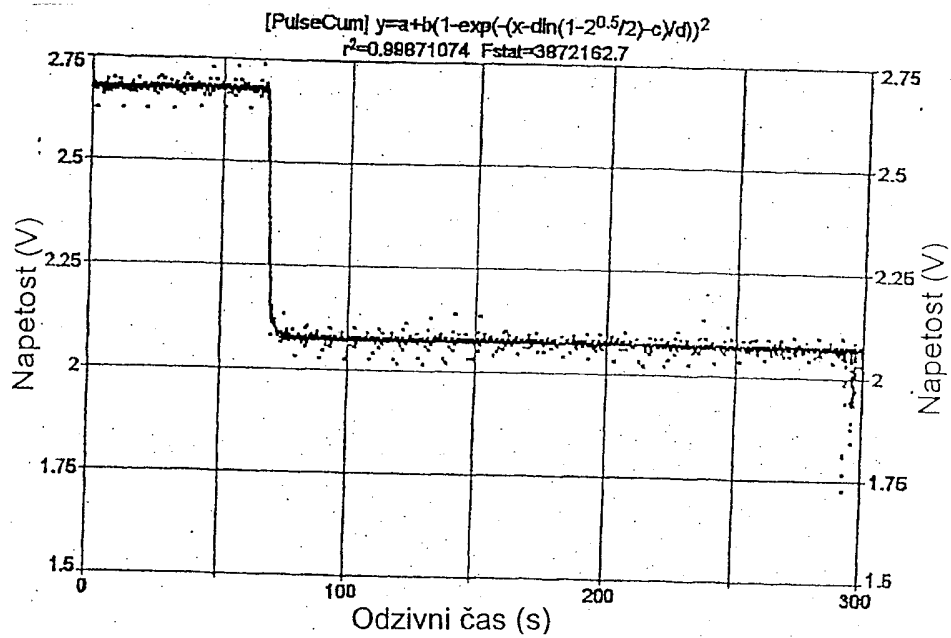
SL. 6.39



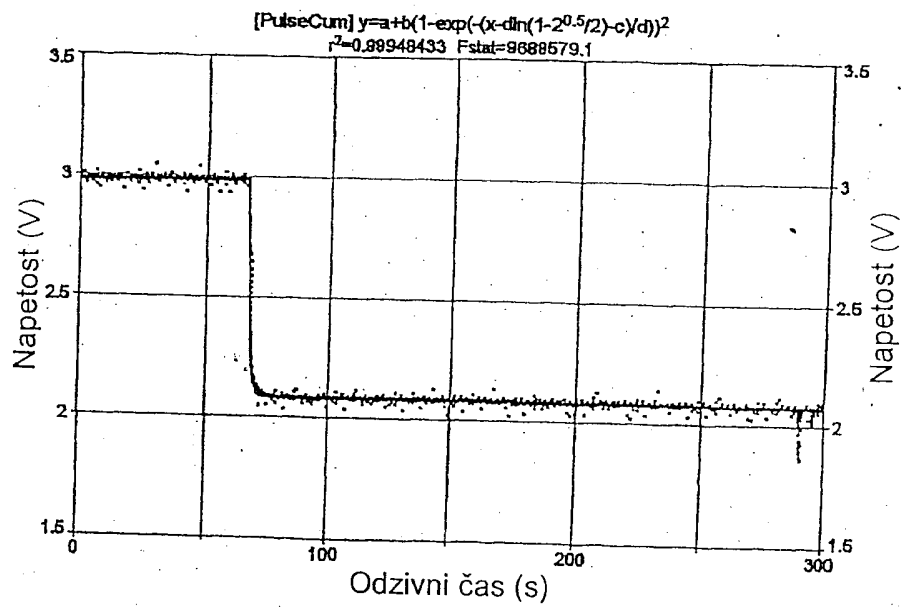
SL. 6.40



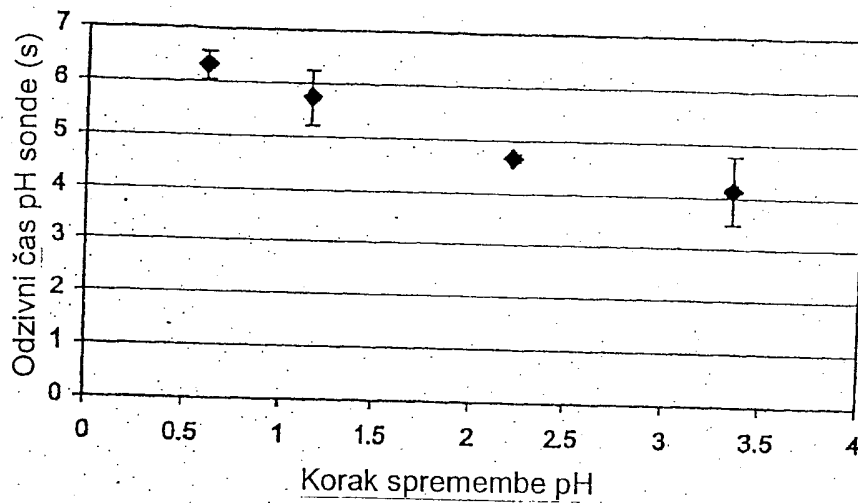
SL. 6.41



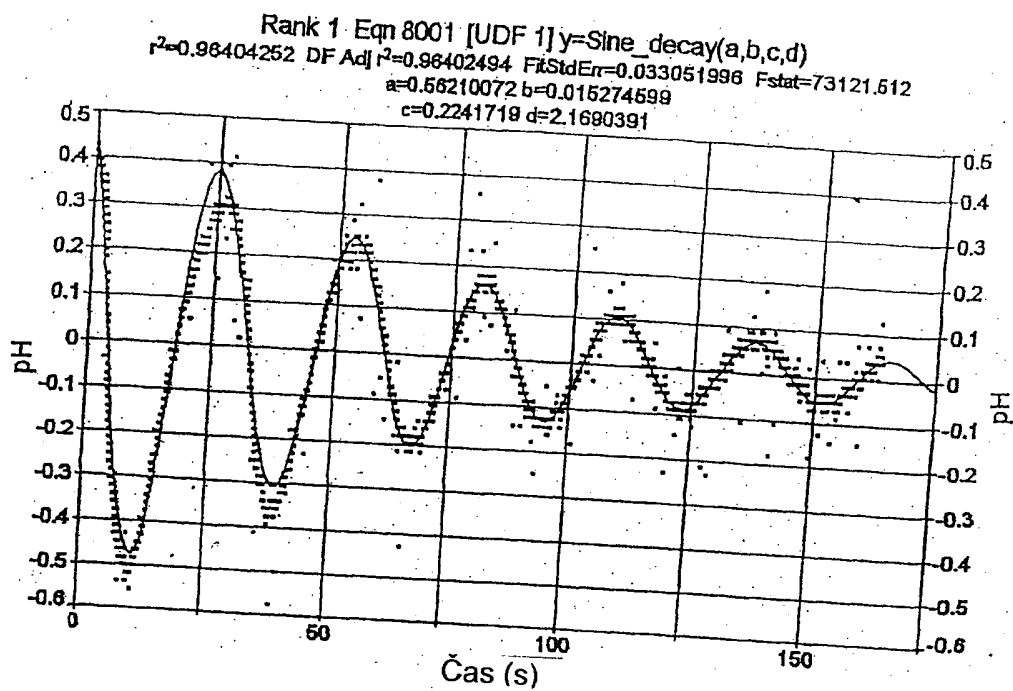
SL. 6.42



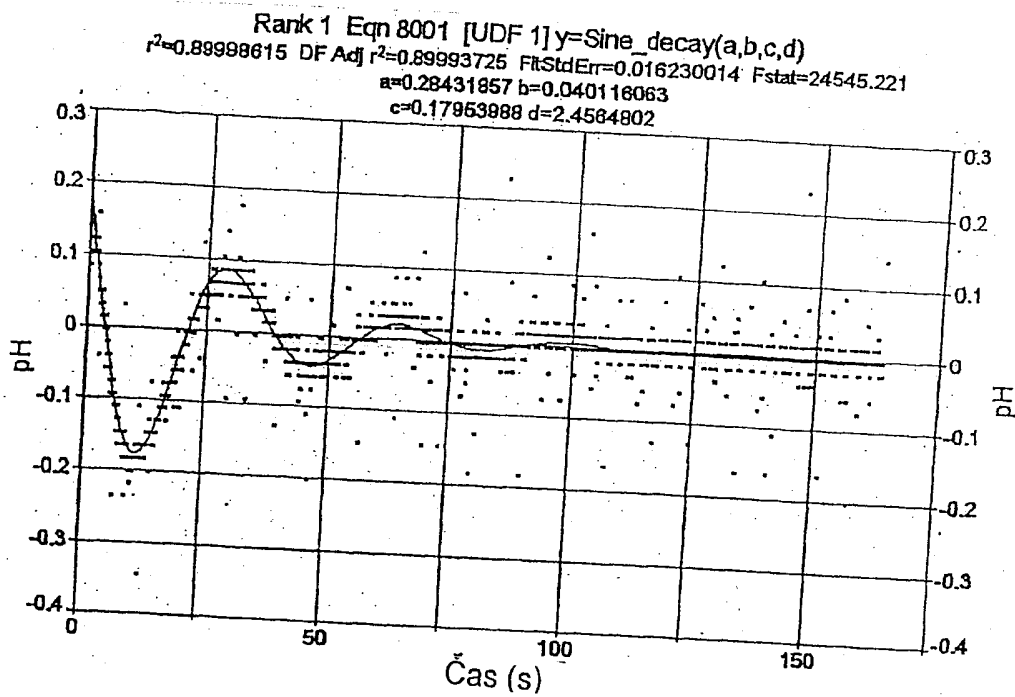
SL. 6.43



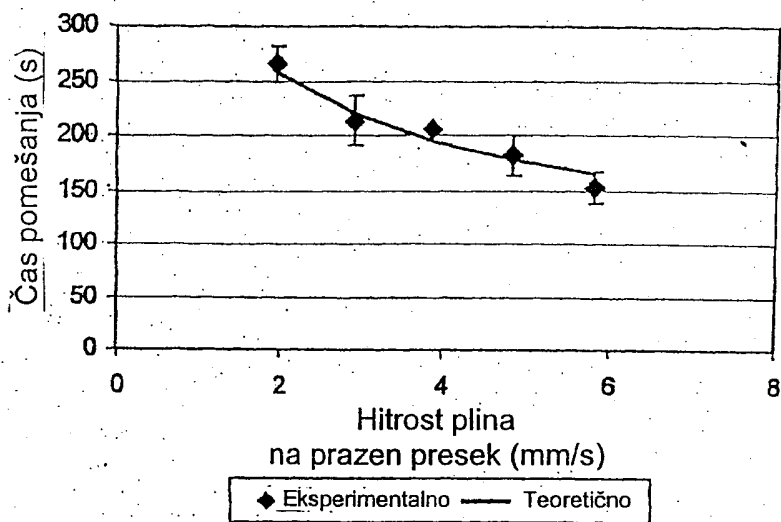
SL. 6.44



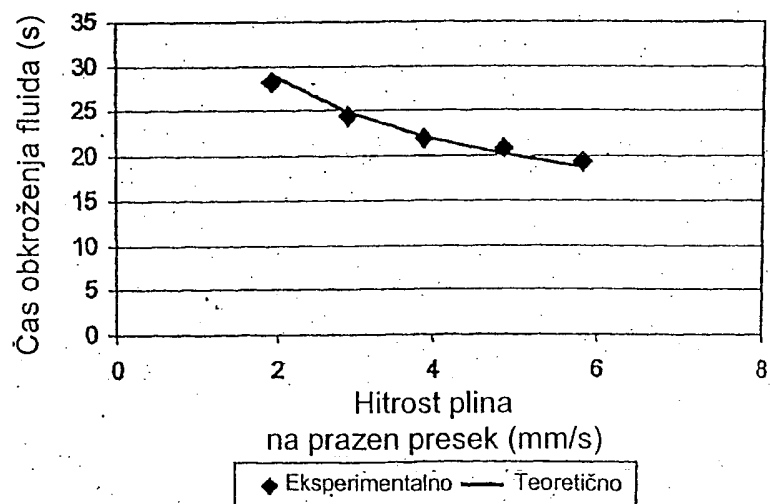
SL. 6.45



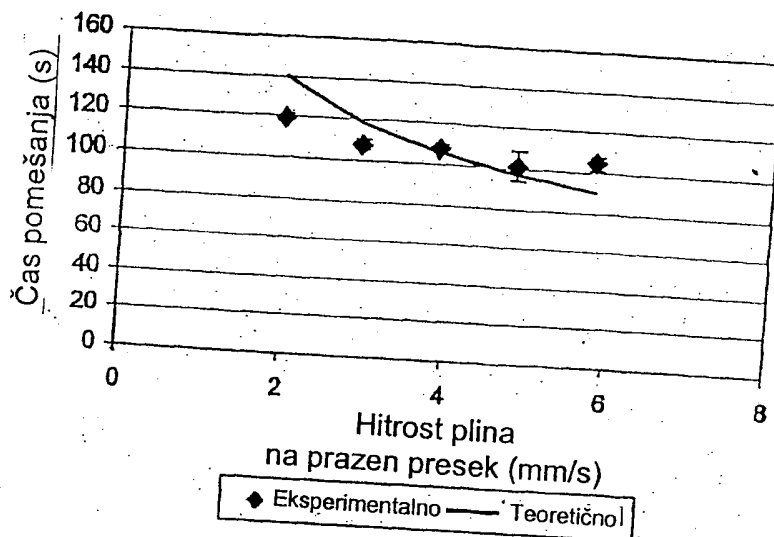
SL. 6.46



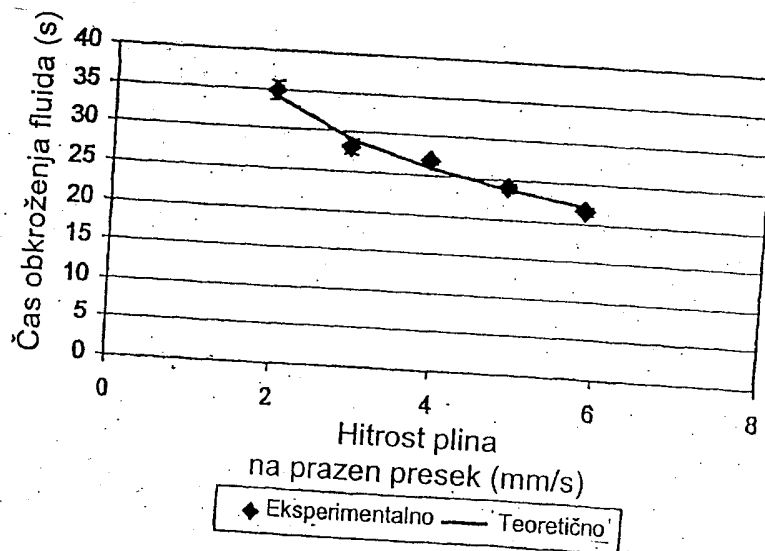
SL. 6.47



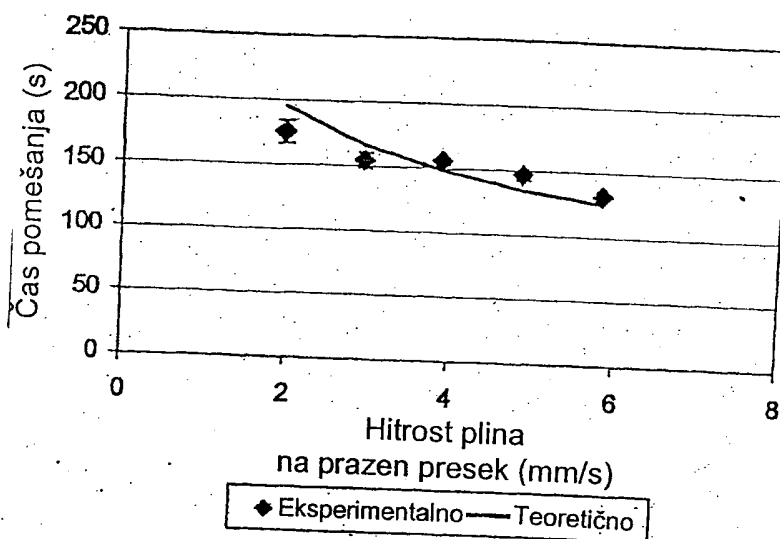
SL. 6.48



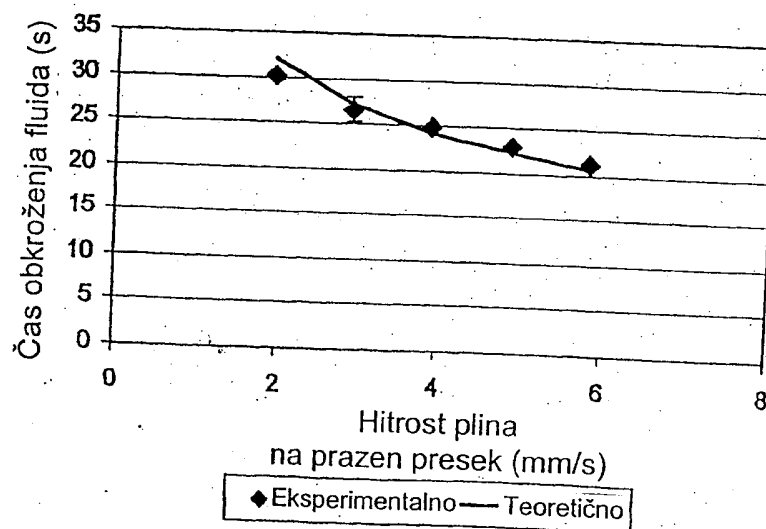
SL. 6.49



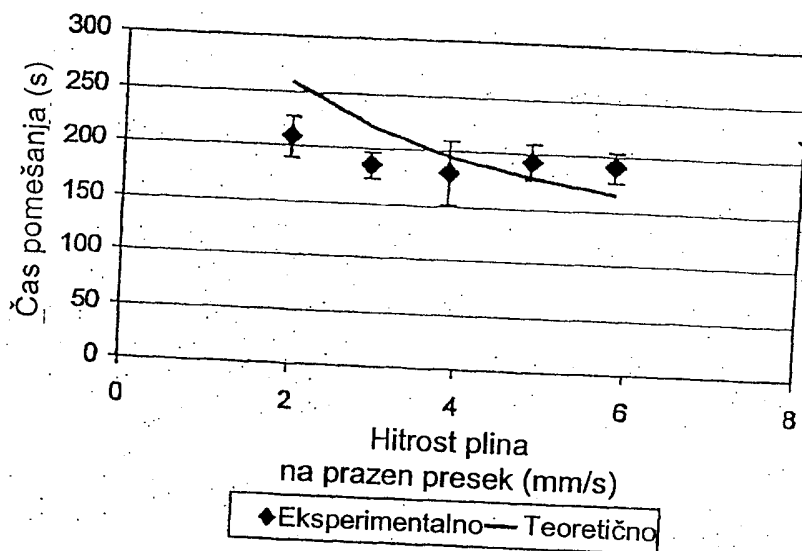
SL. 6.50



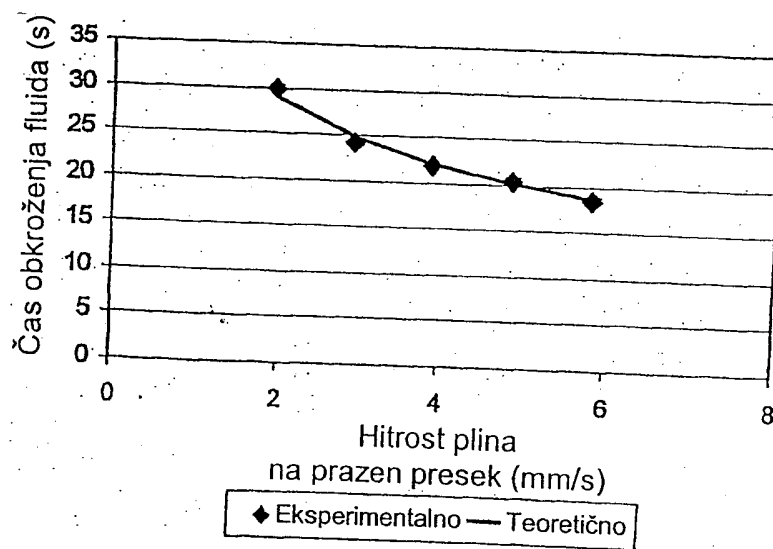
SL. 6.51



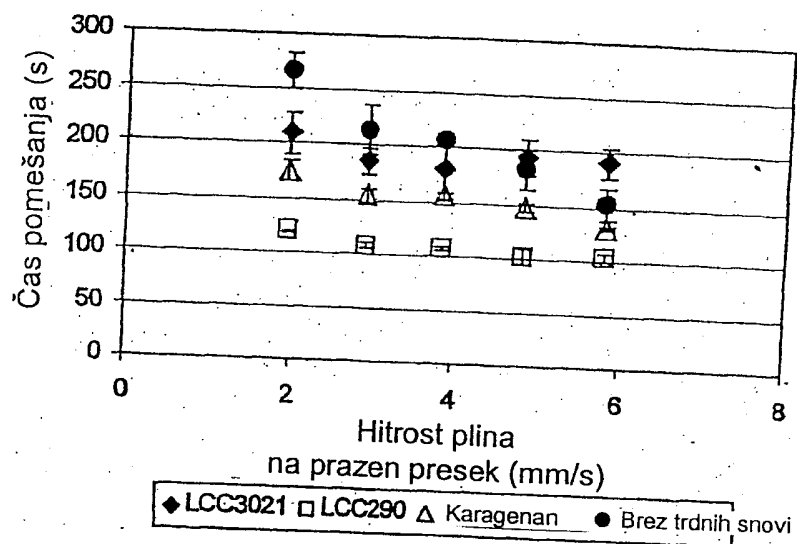
SL. 6.52



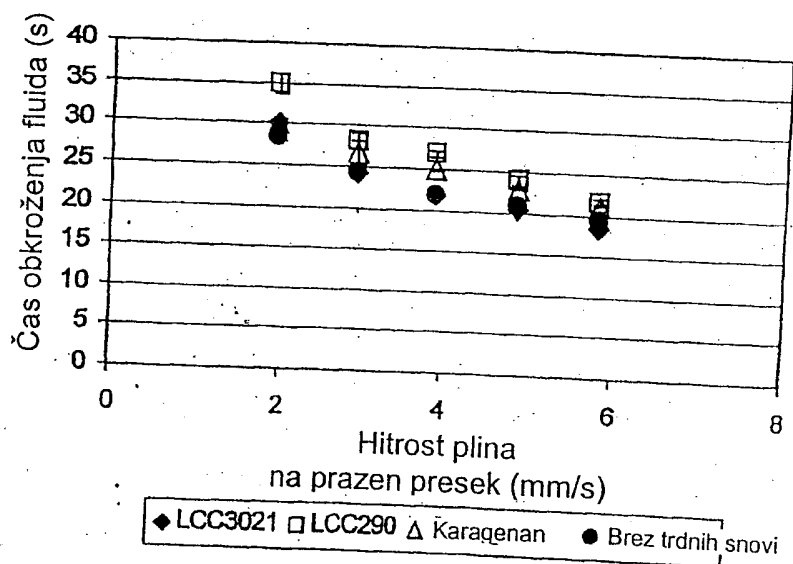
SL. 6.53



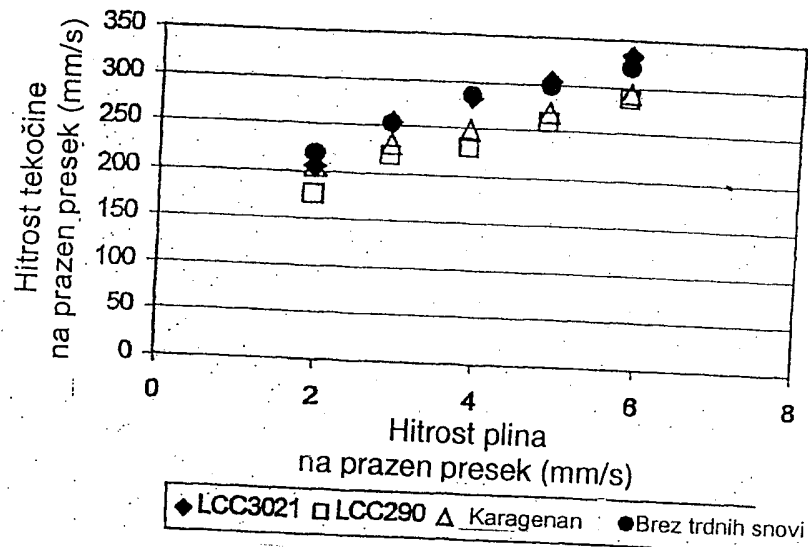
SL. 6.54



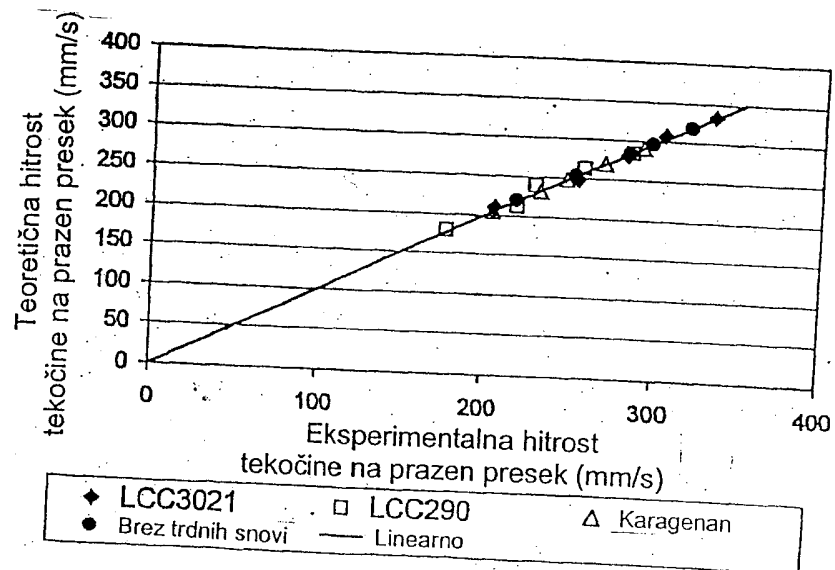
SL. 6.55



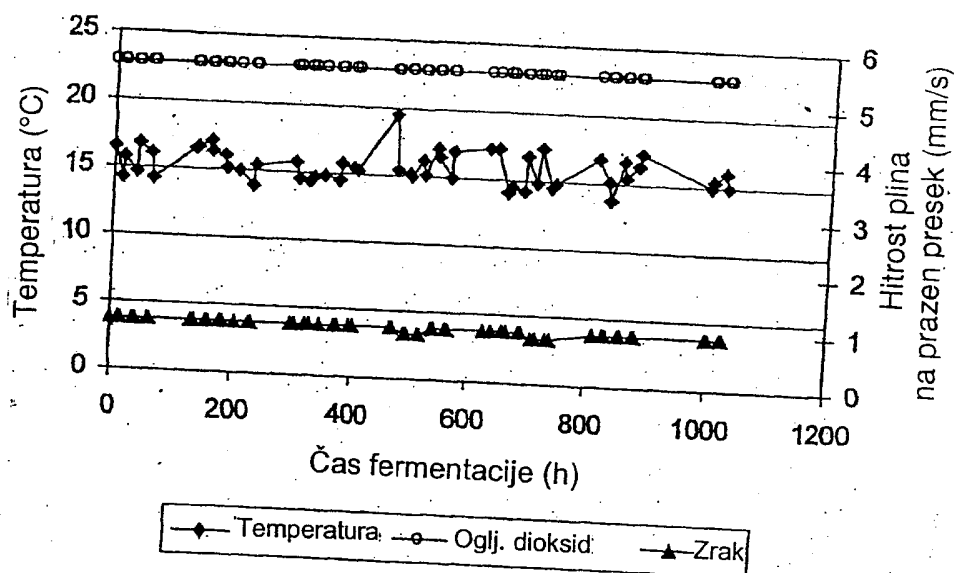
SL. 6.56



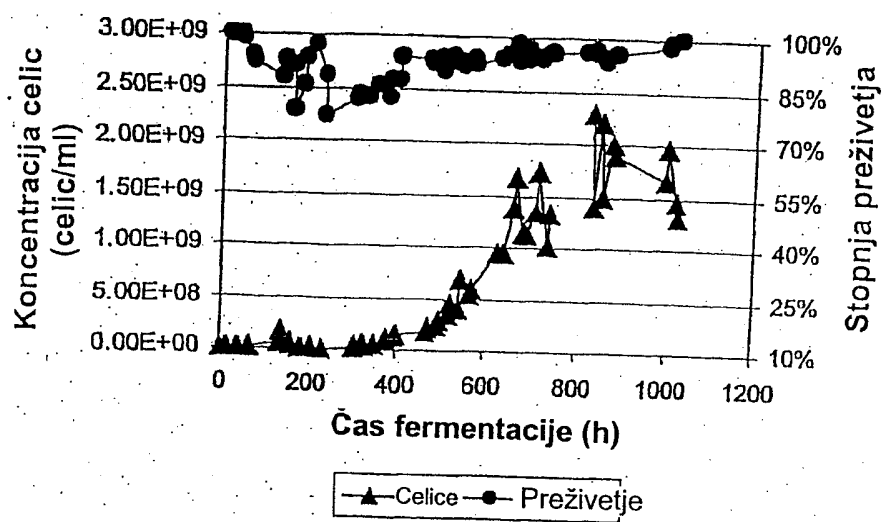
SL. 6.57



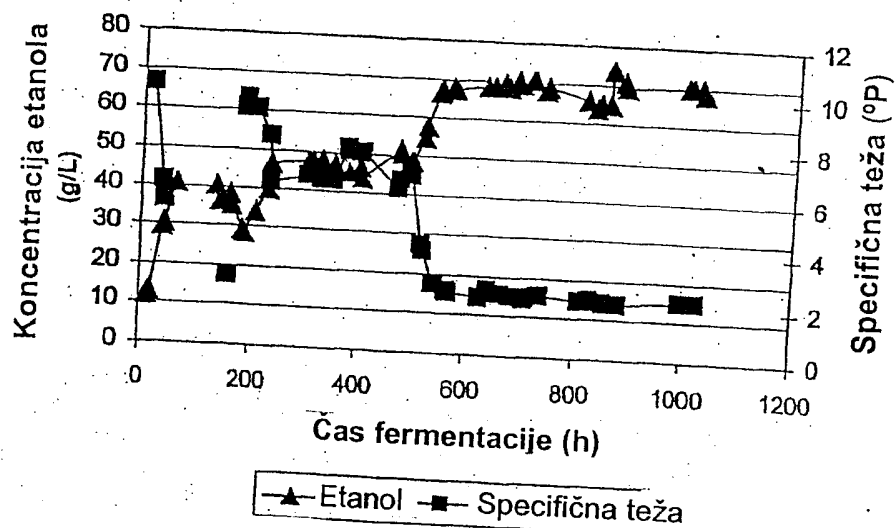
SL. 6.58



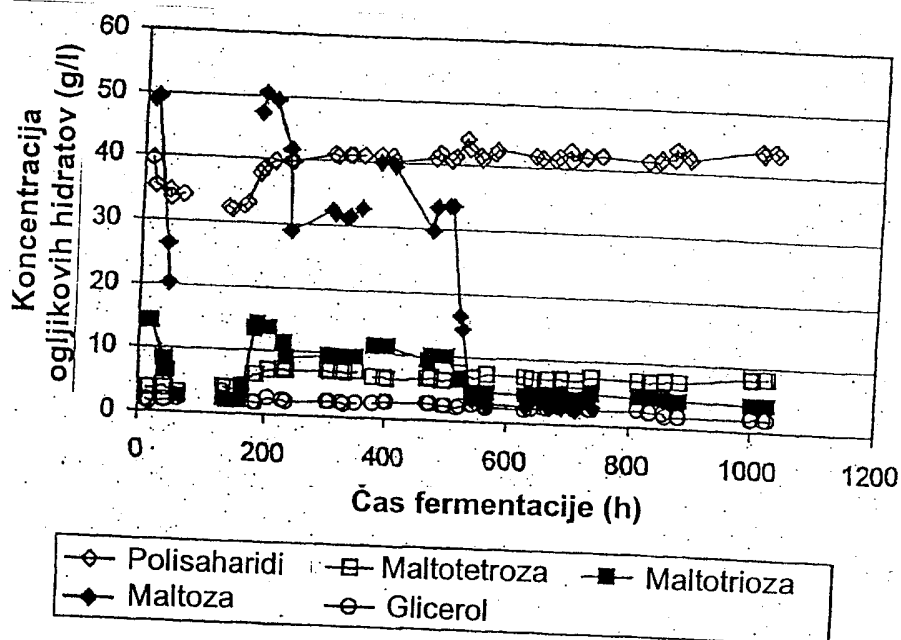
SL. 6.59



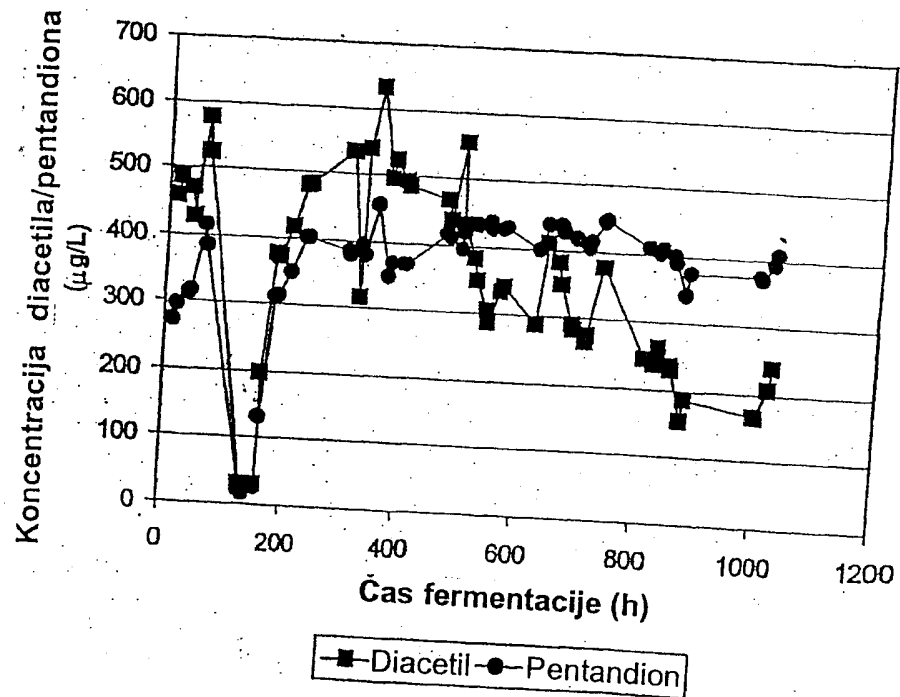
SL. 6.60



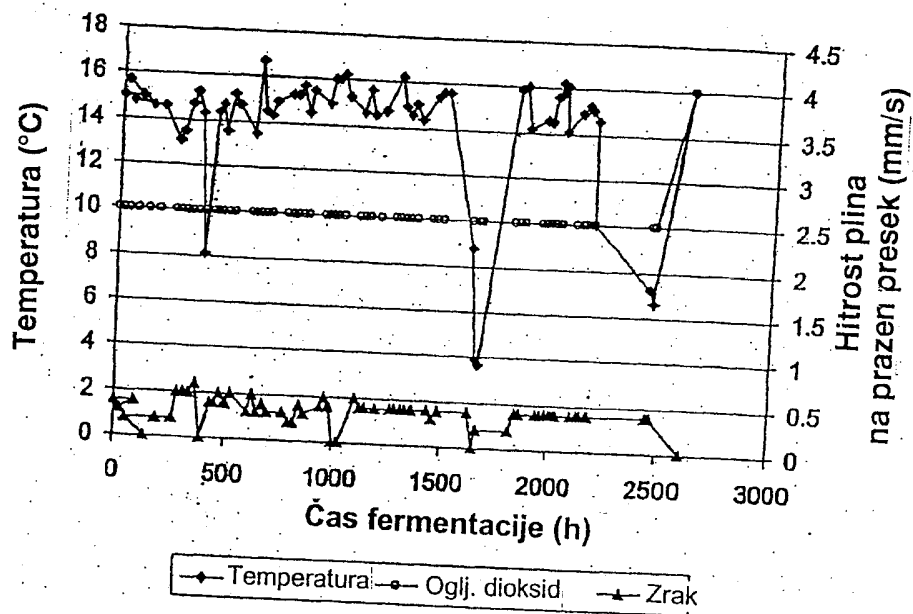
SL. 6.61



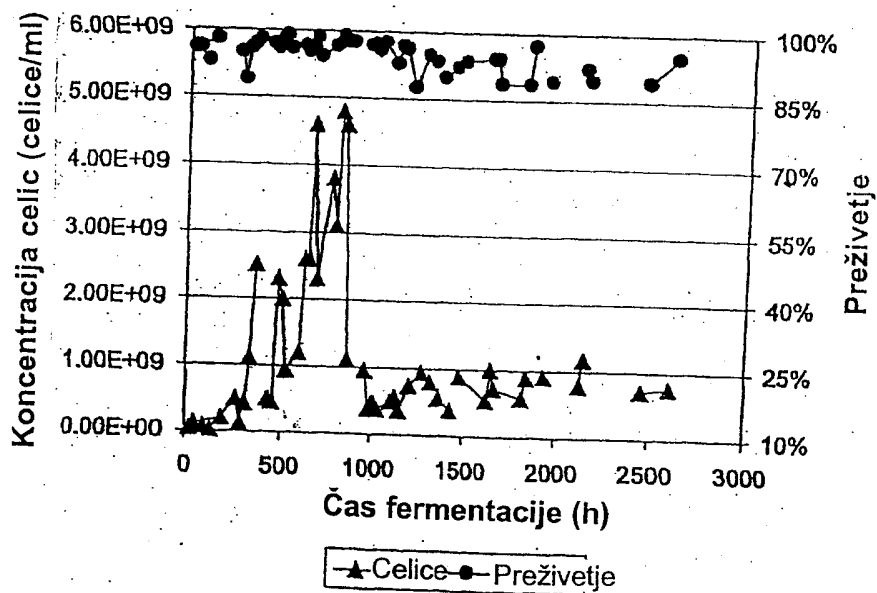
SL. 6.62



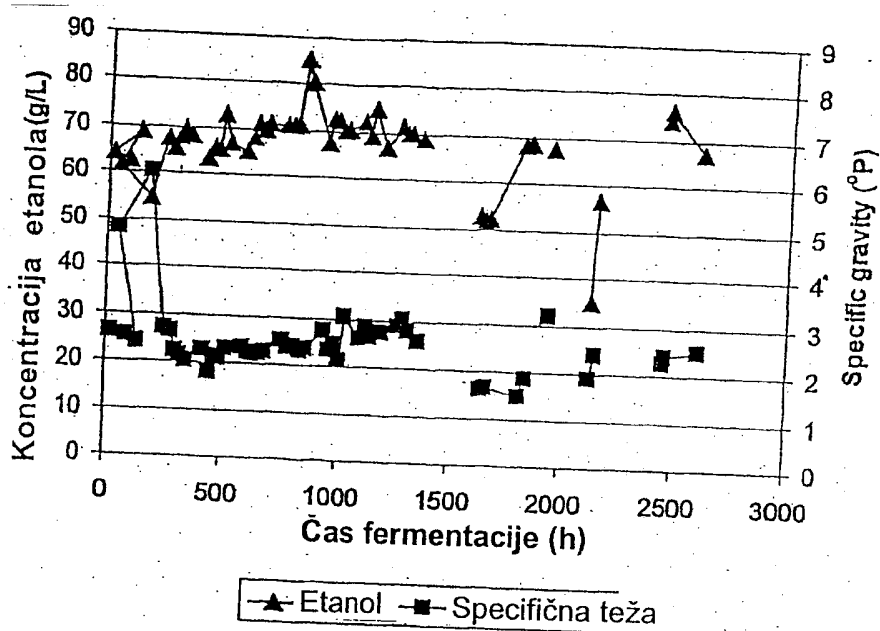
SL. 6.63



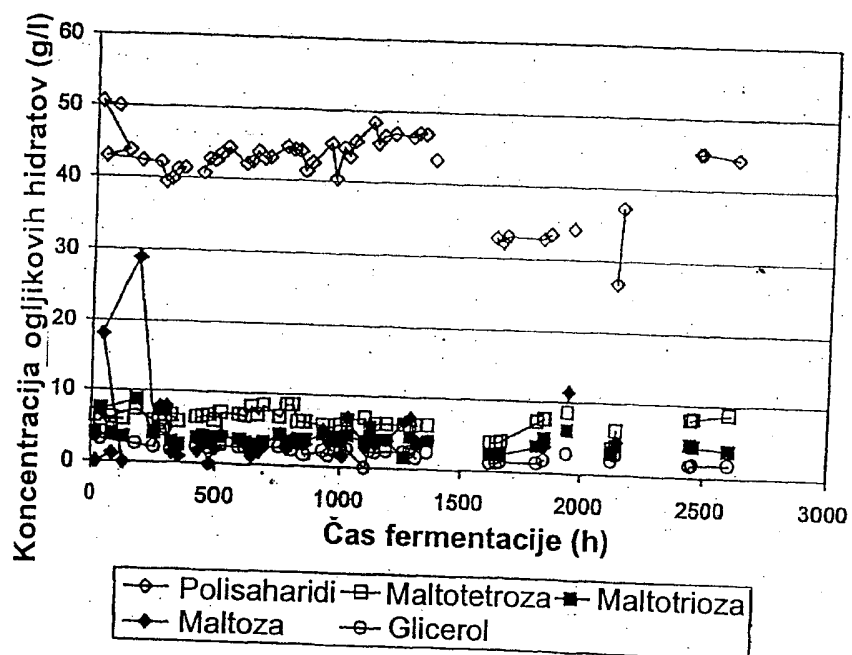
SL. 6.64



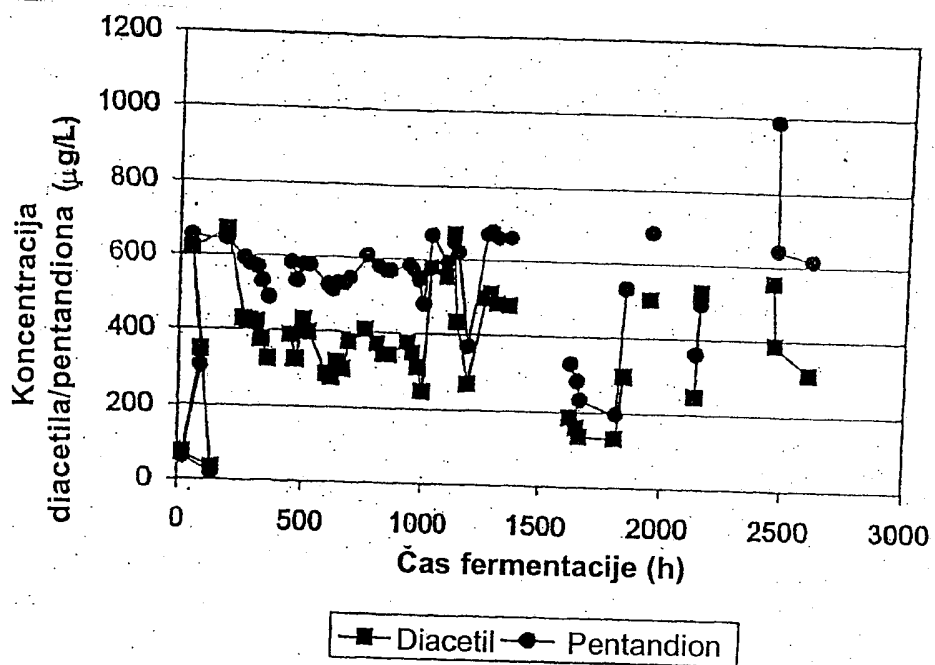
SL. 6.65



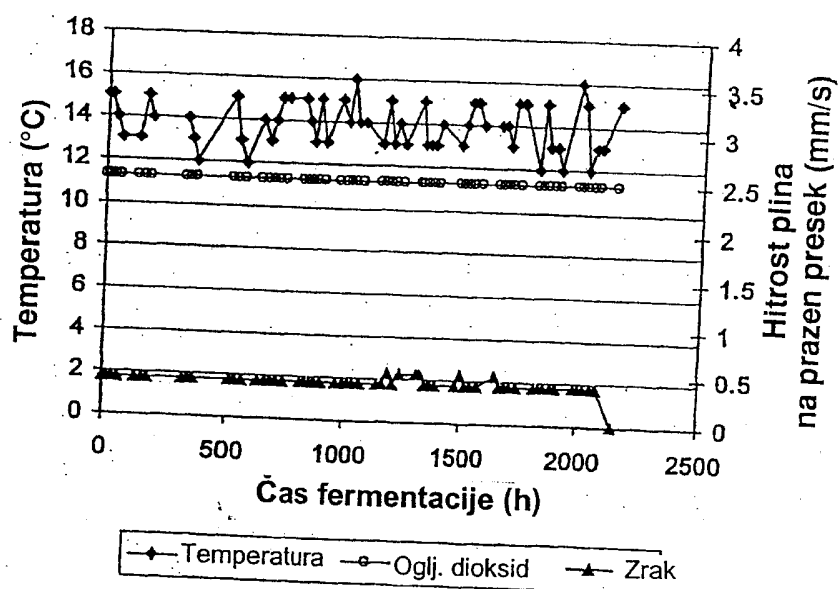
SL. 6.66



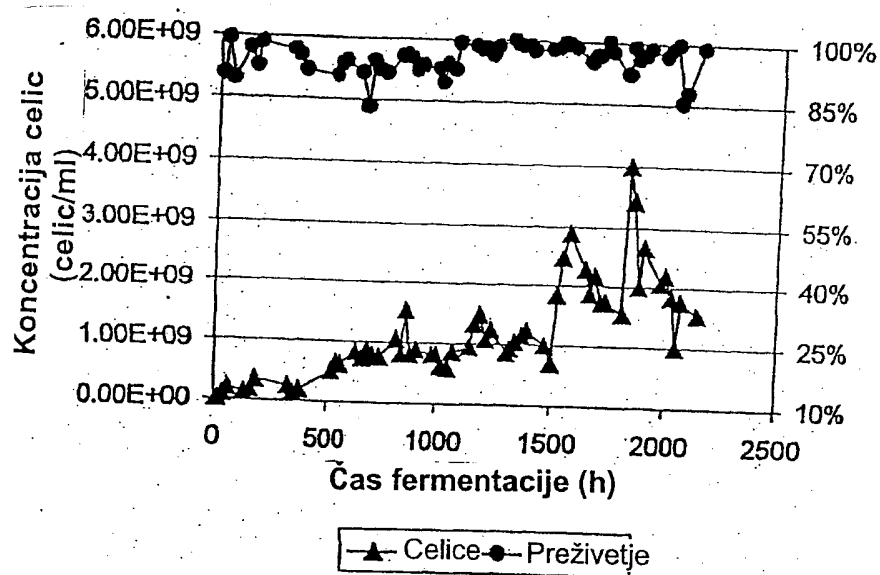
SL. 6.67



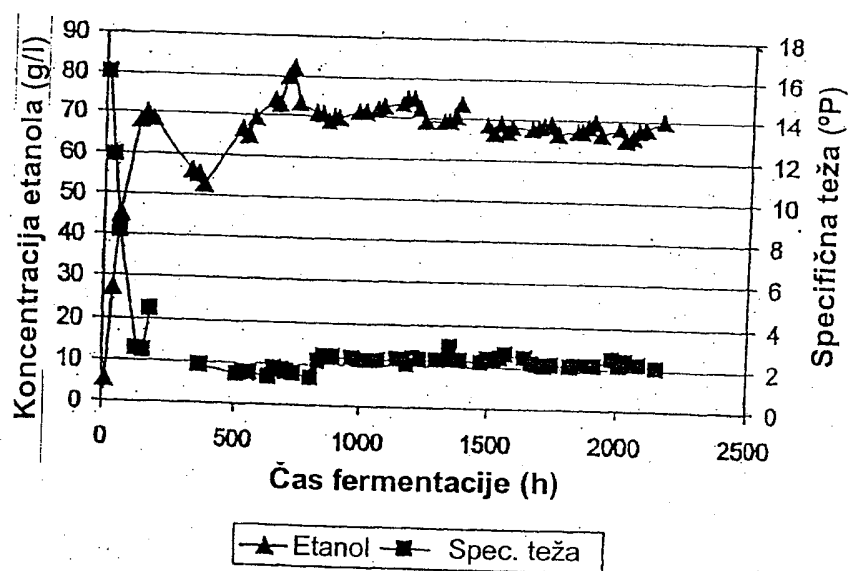
SL. 6.68



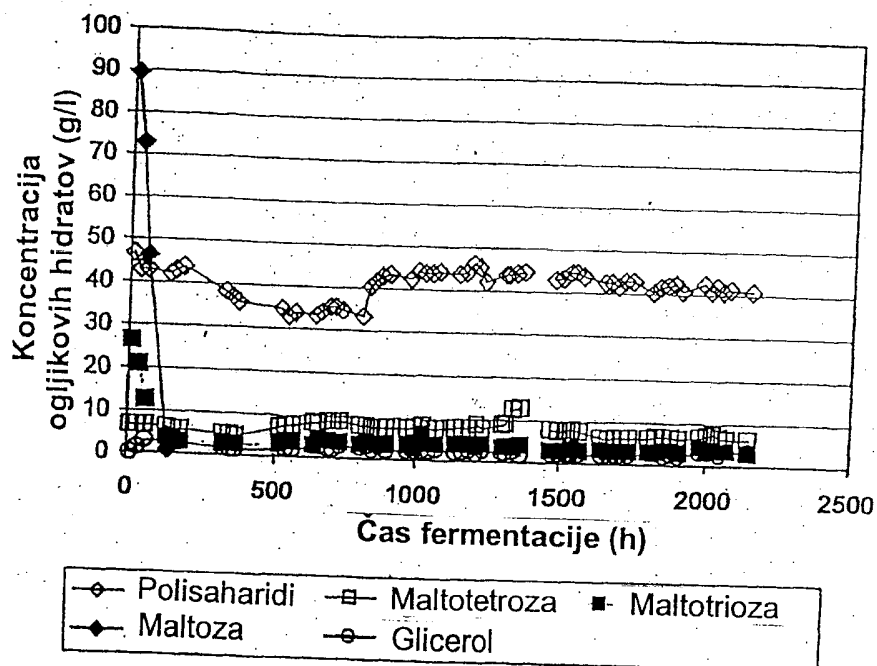
SL. 6.69



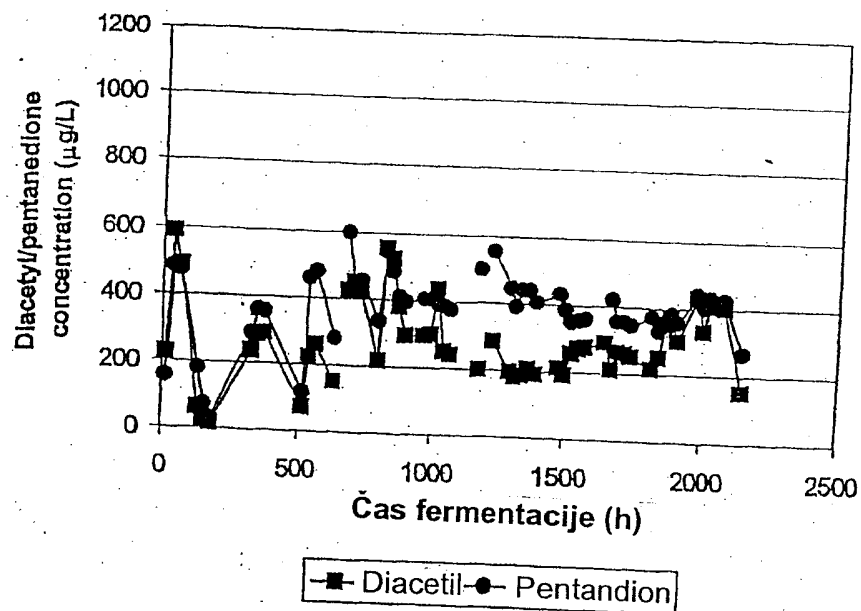
SL. 6.70



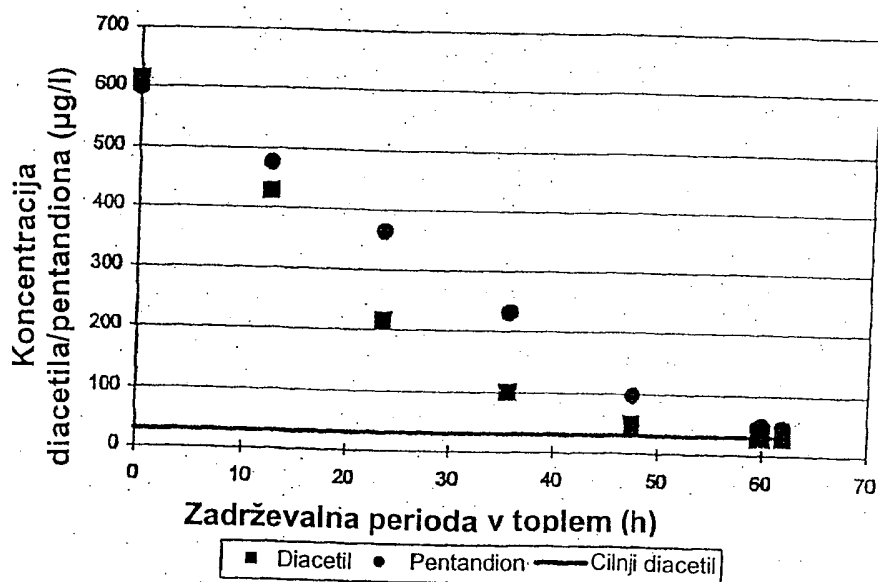
SL. 6.71



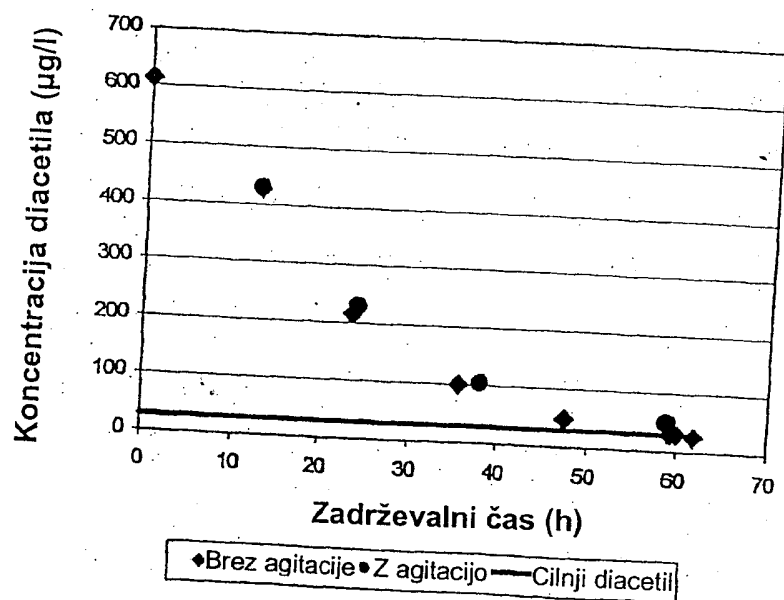
SL. 6.72



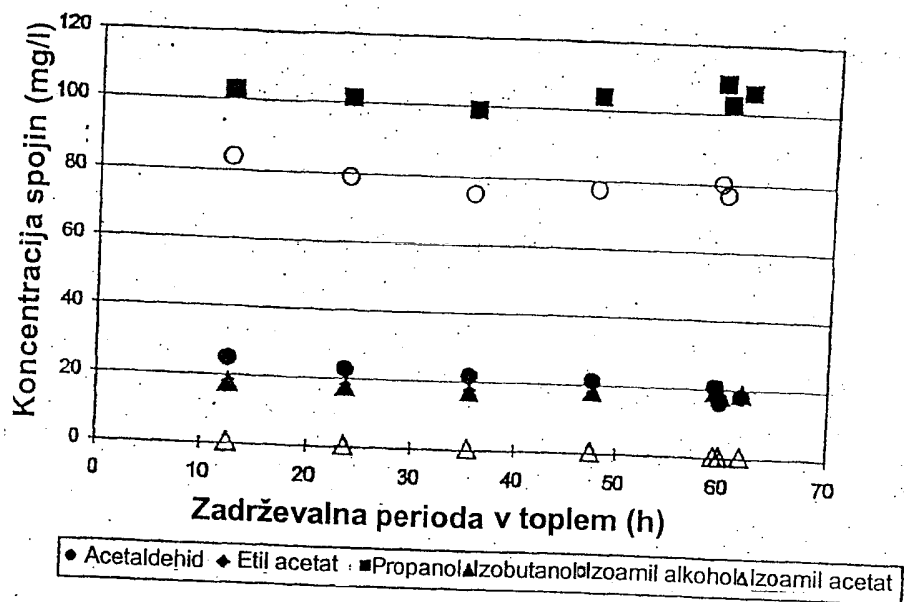
SL. 6.73



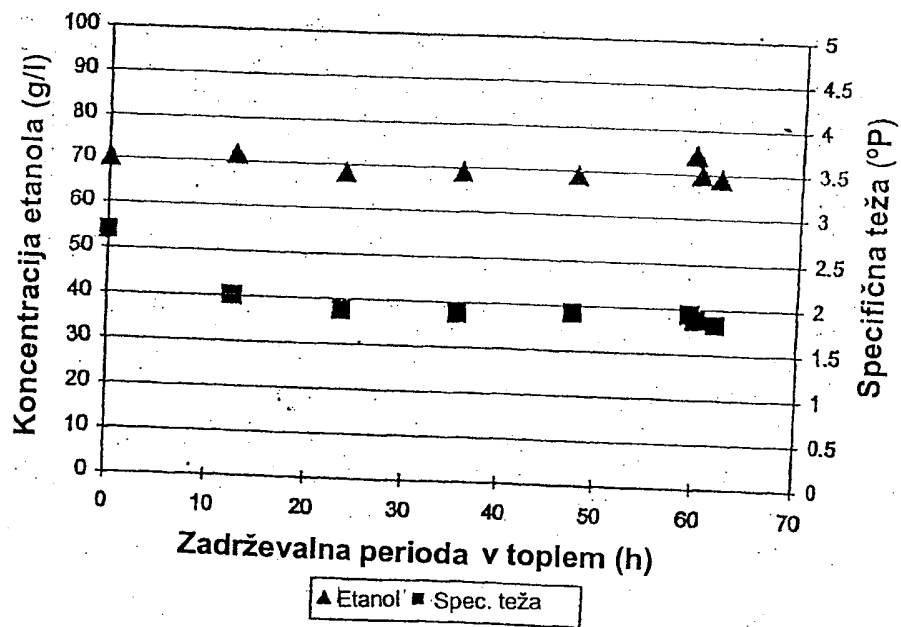
SL. 6.74



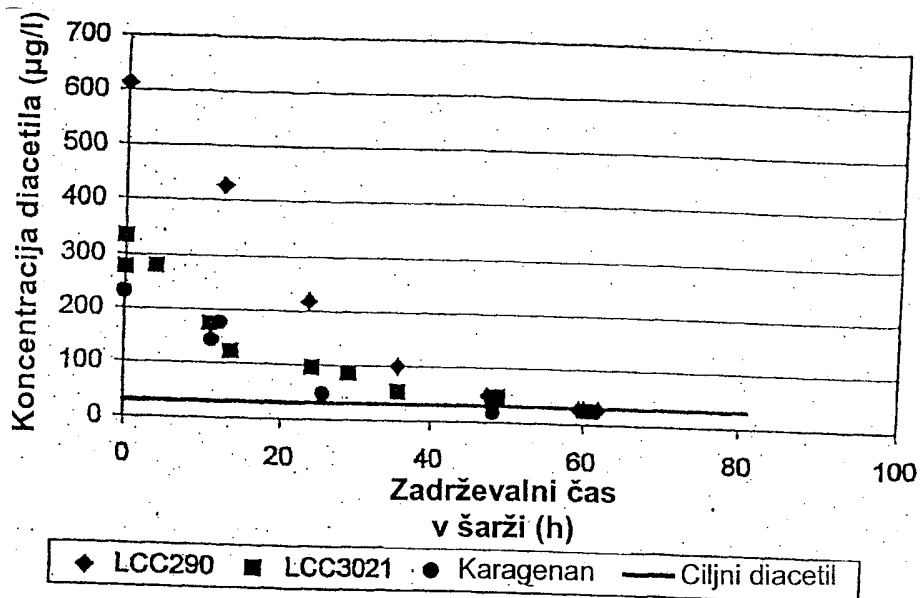
SL. 6.75



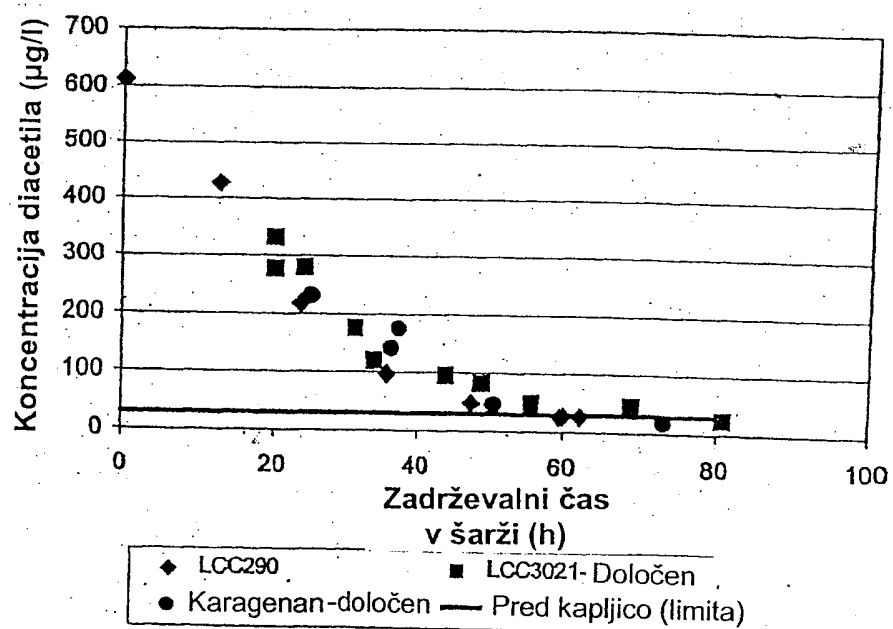
SL. 6.76



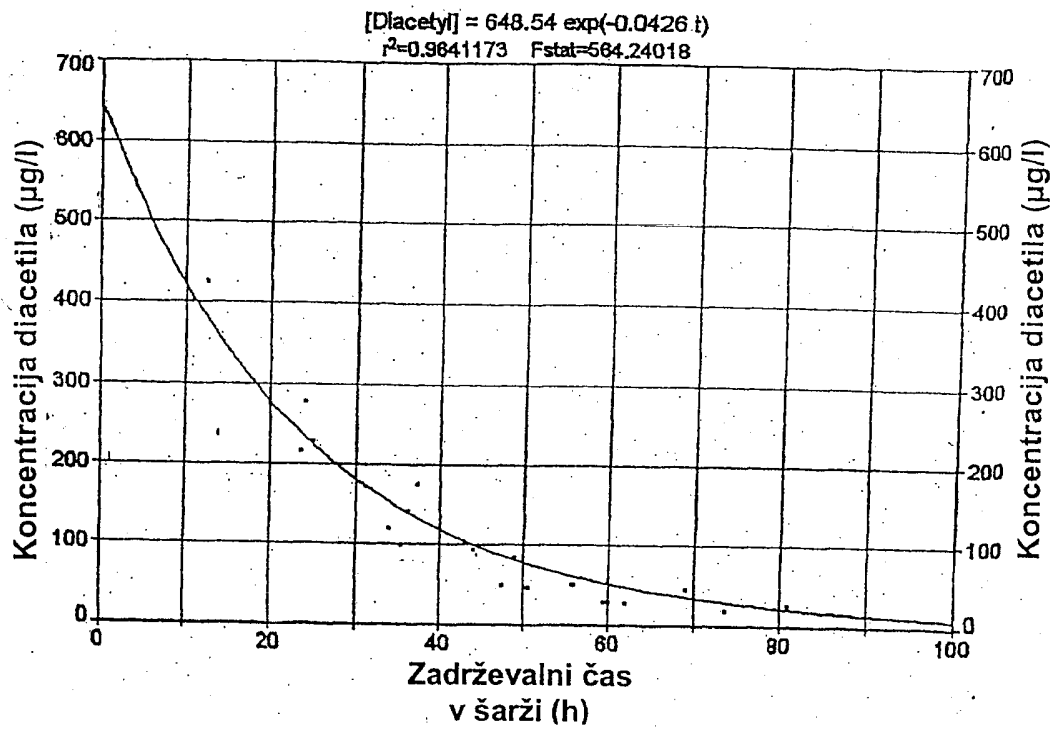
SL. 6.77



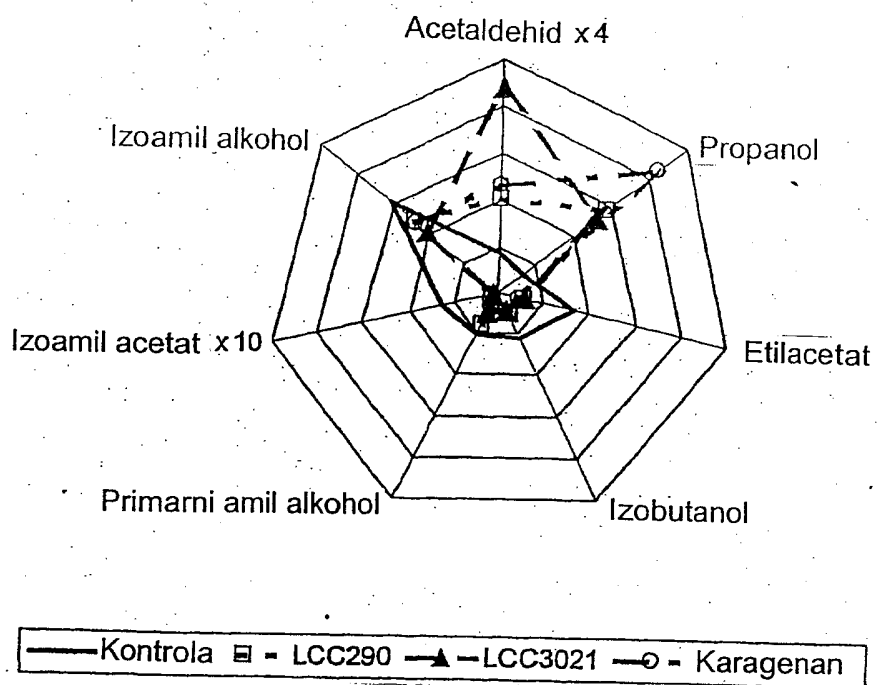
SL. 6.78



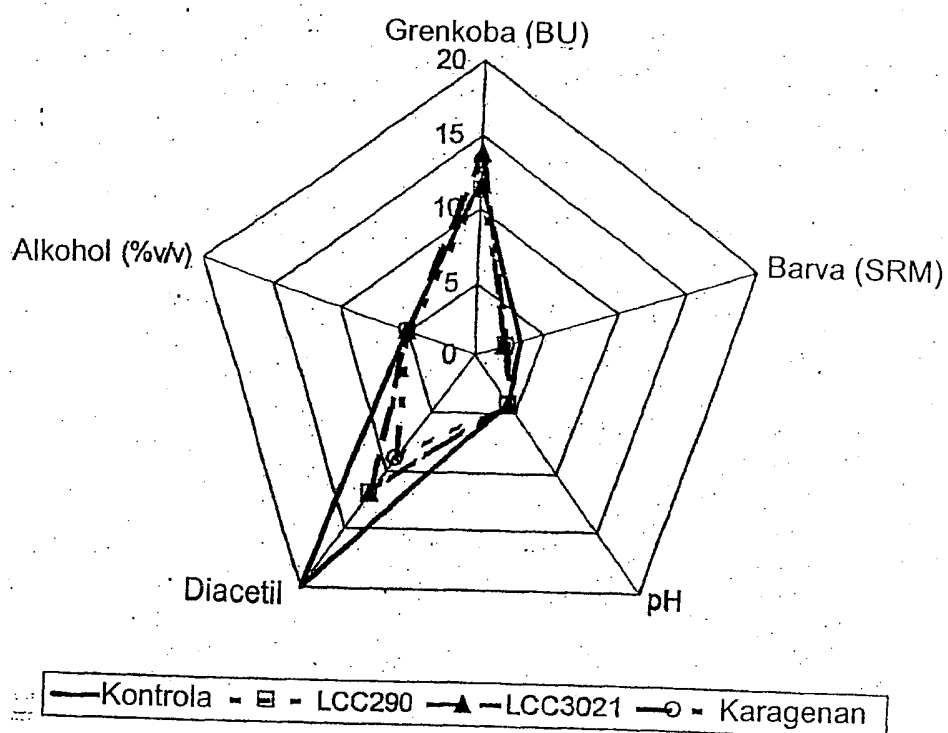
SL. 6.79



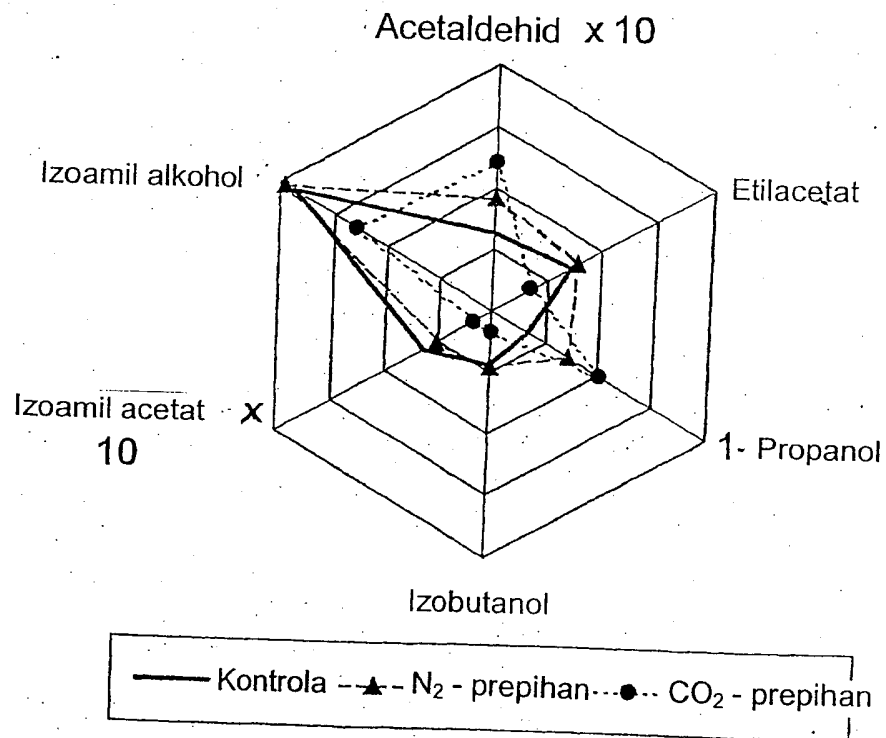
SL. 6.80



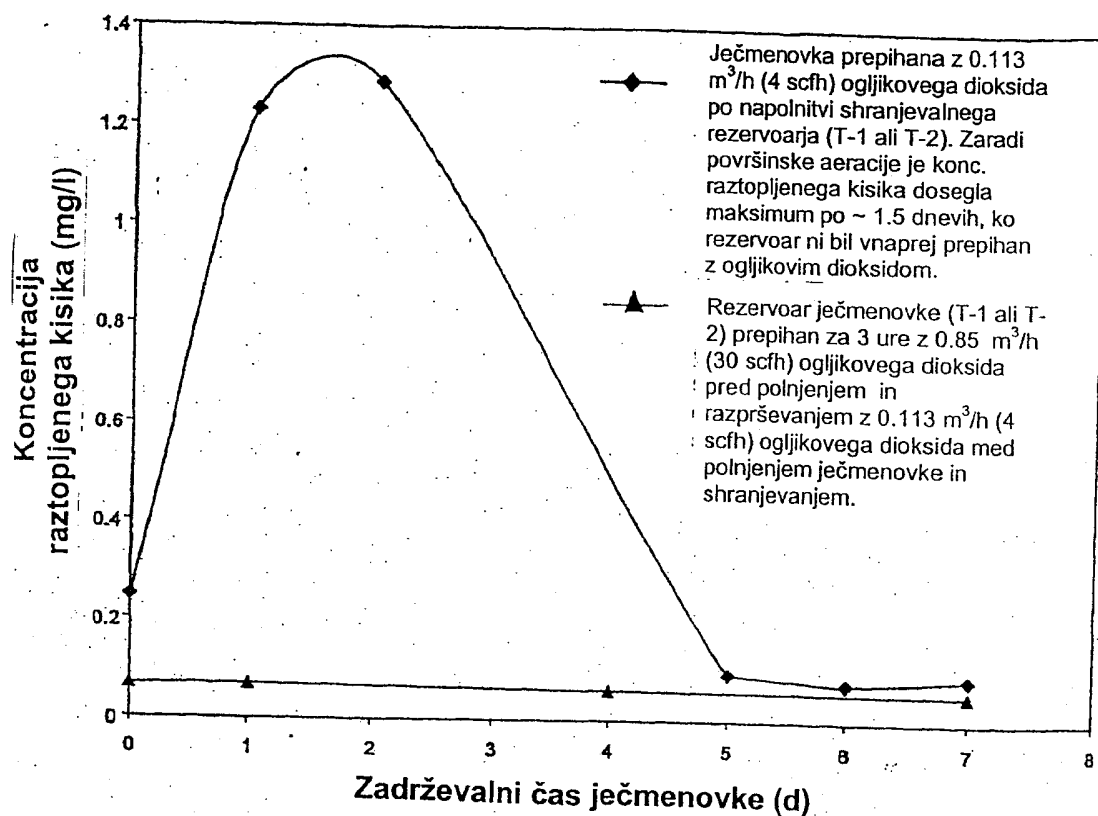
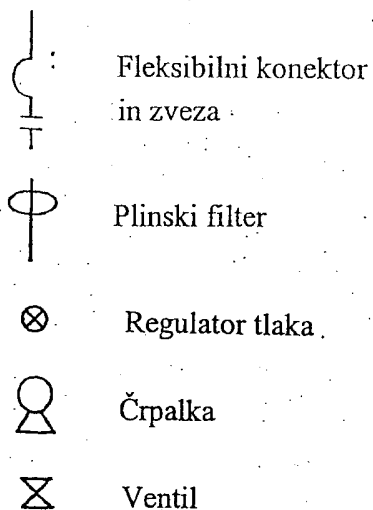
SL. 6.81

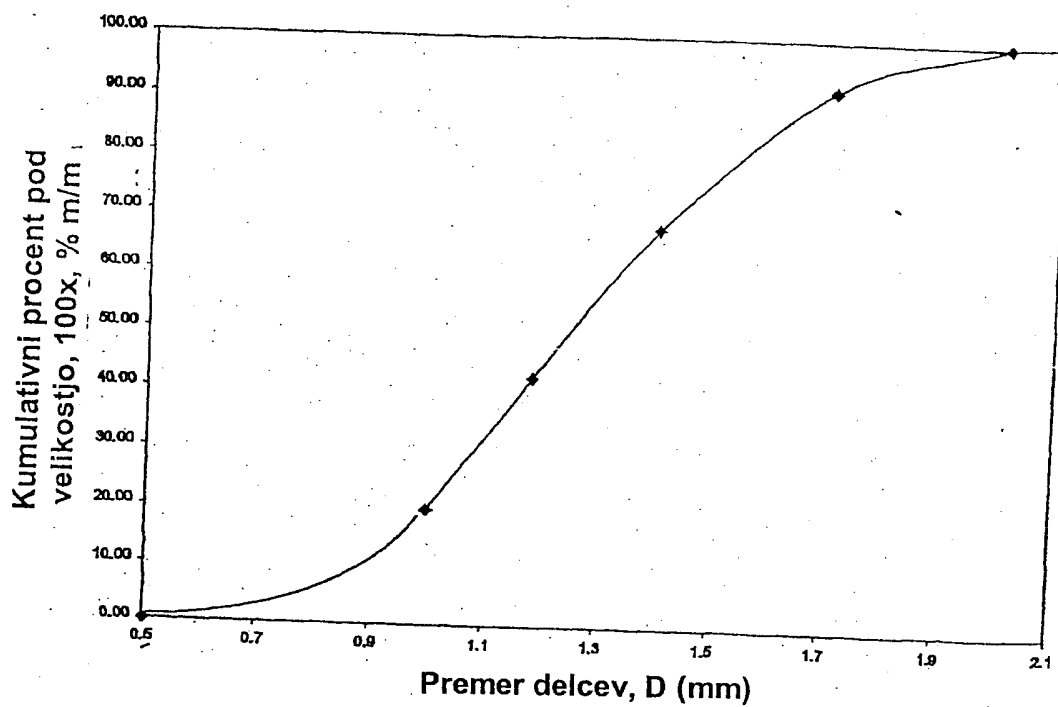


SL. 6.82

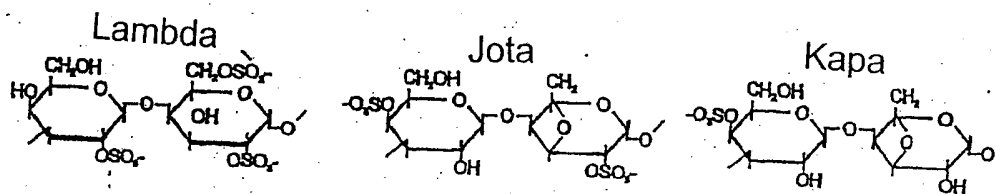


SL. 6.83

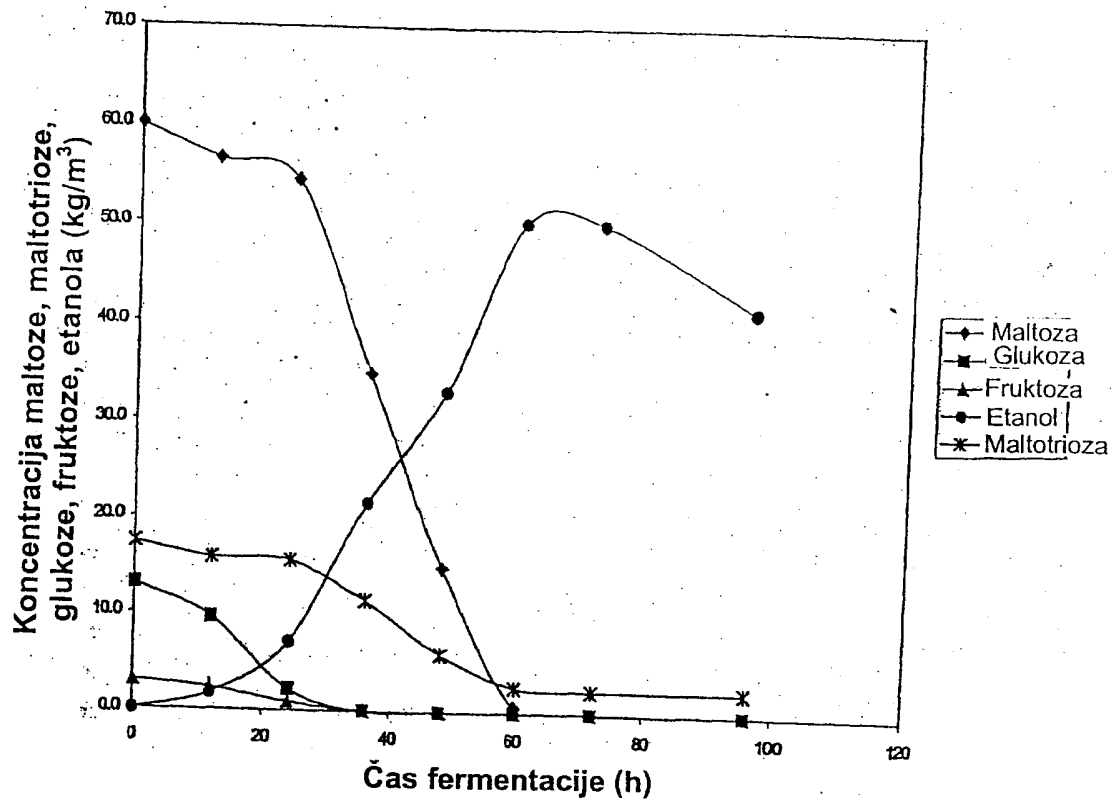




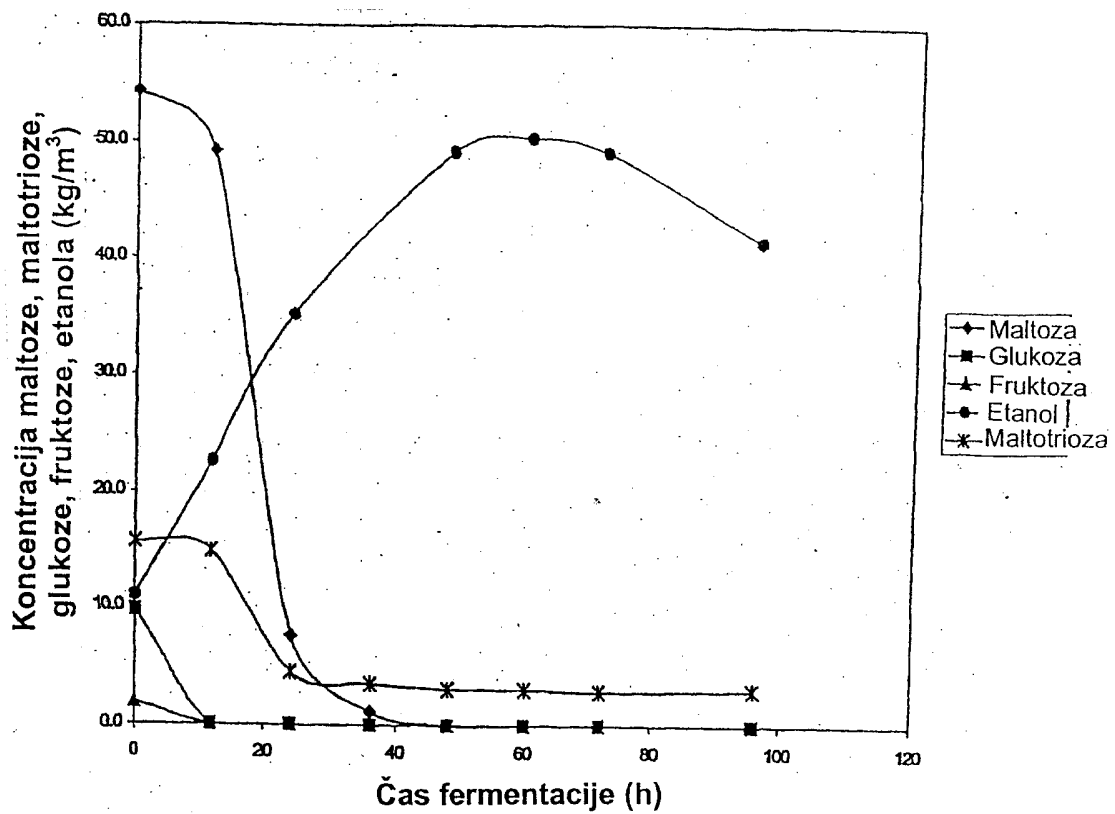
SL. 5.8.1



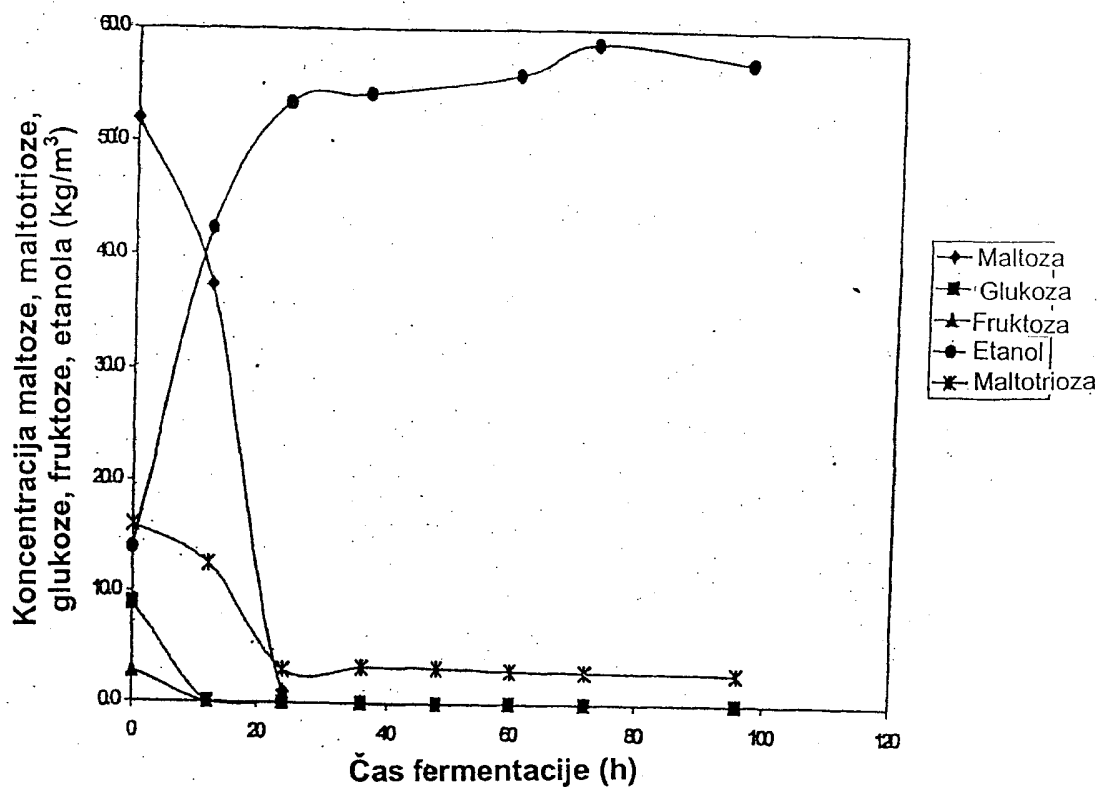
SL. 6.2



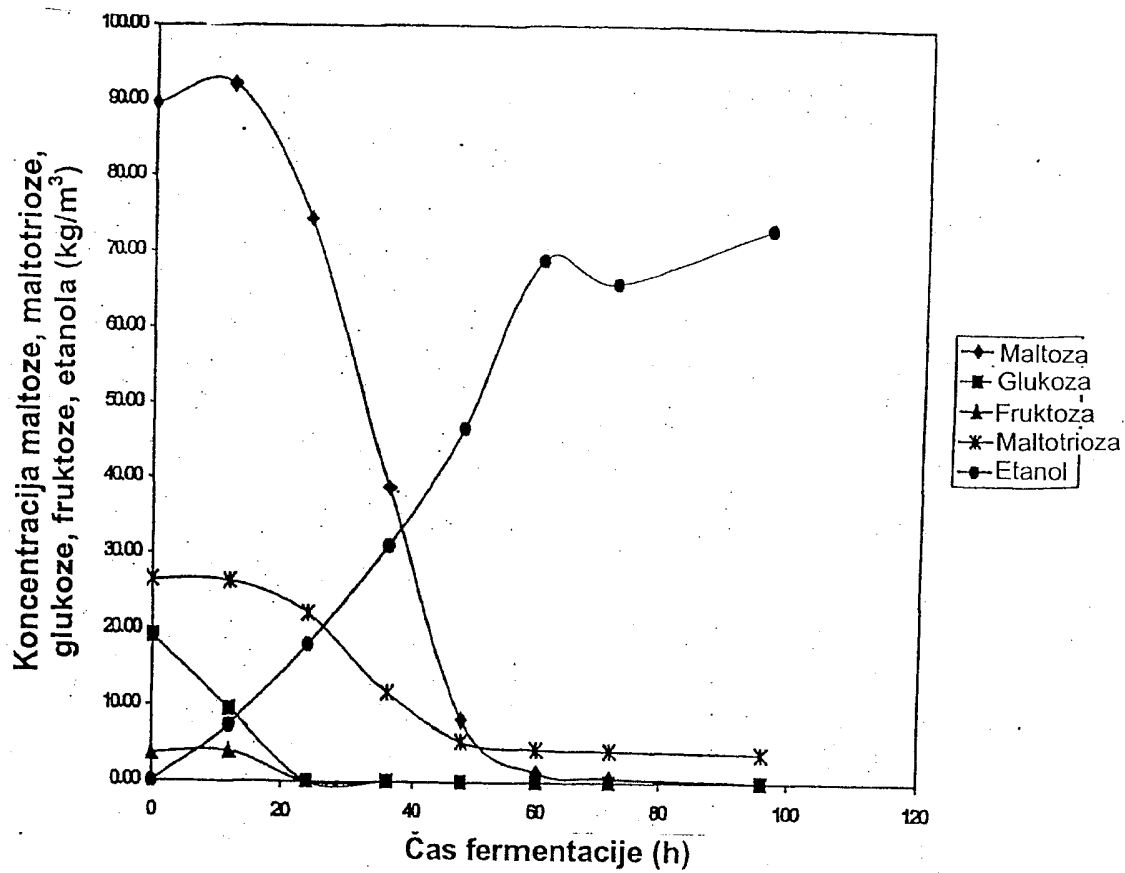
SL. 6.4. a)



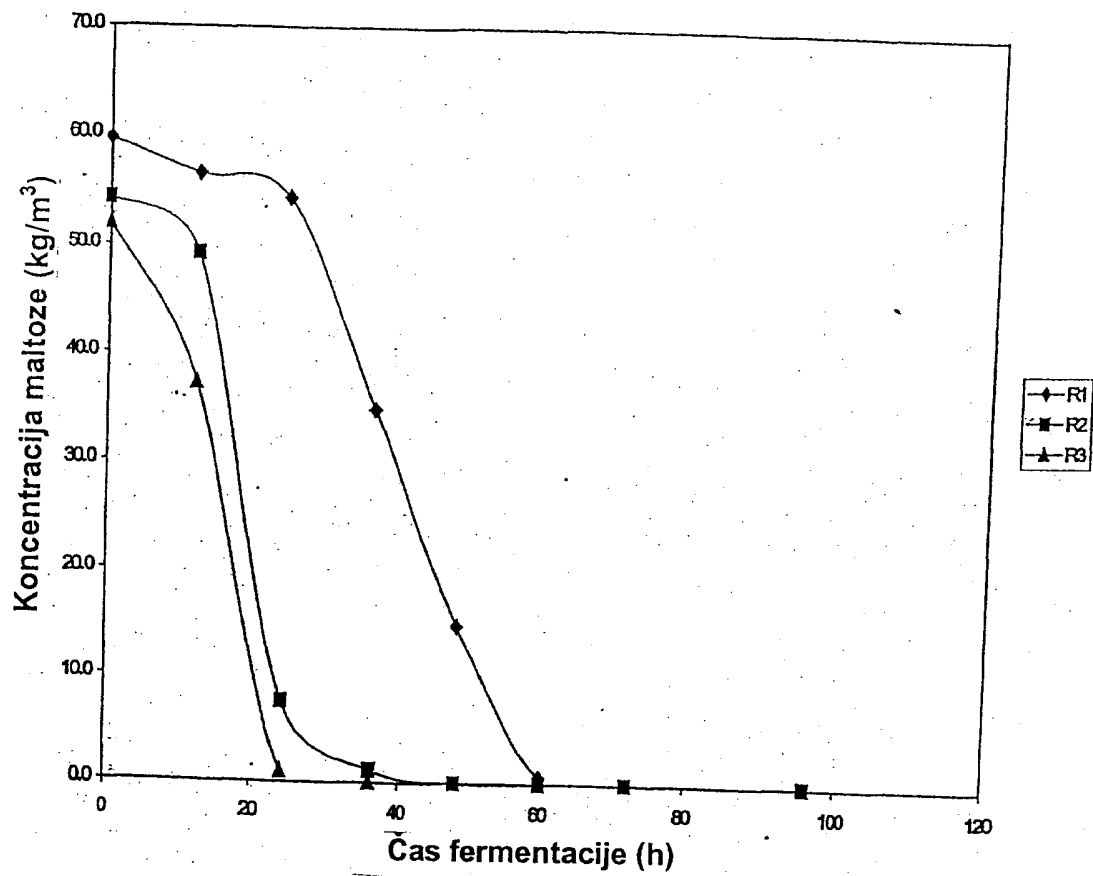
SL. 6.4. b)



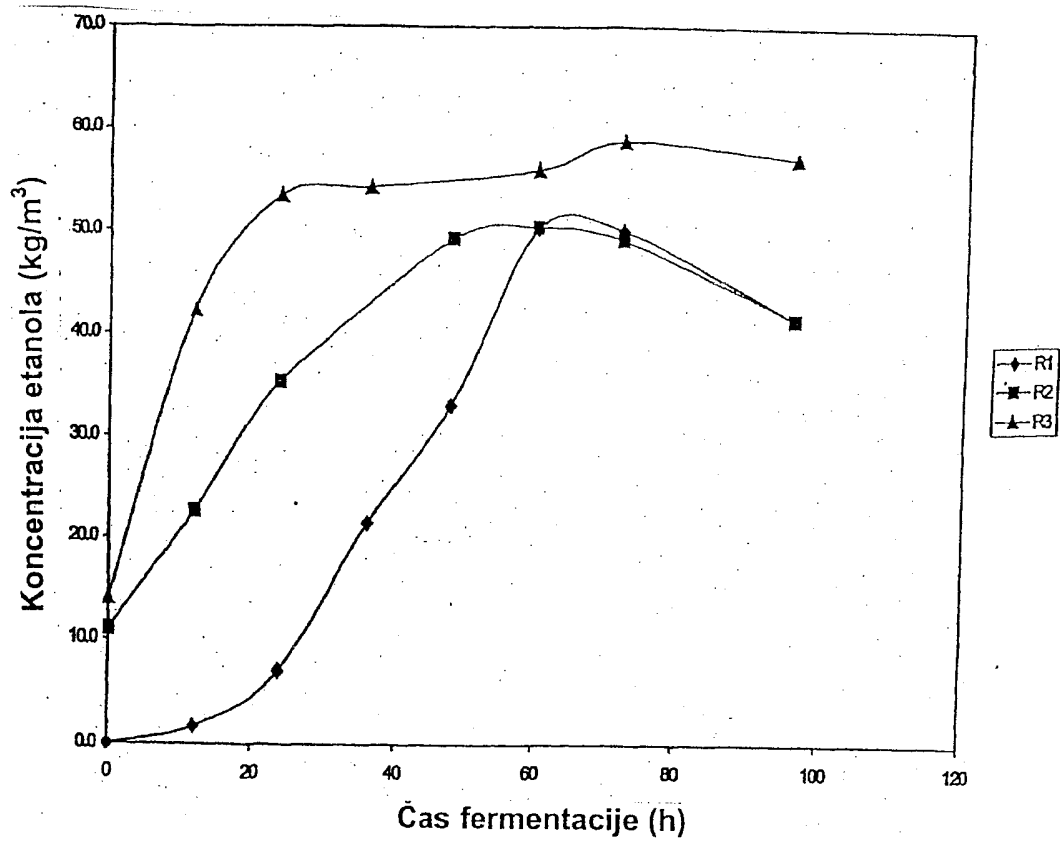
SL. 6.4. c)



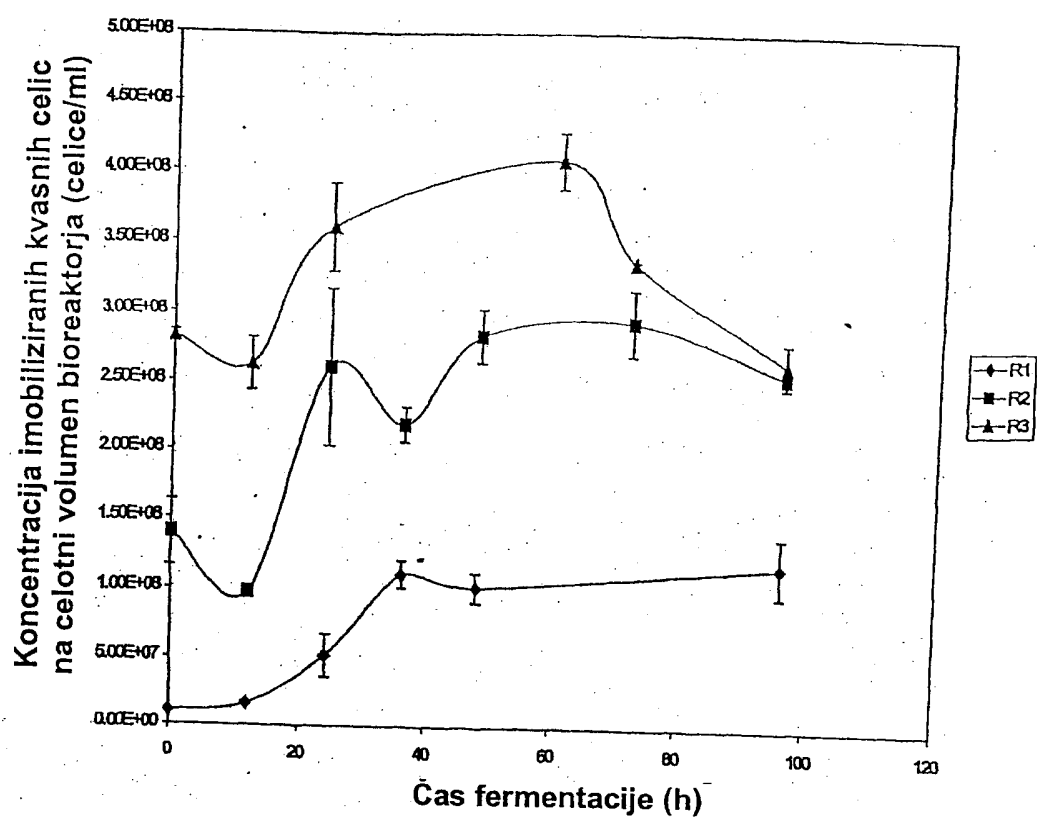
SL. 6.5



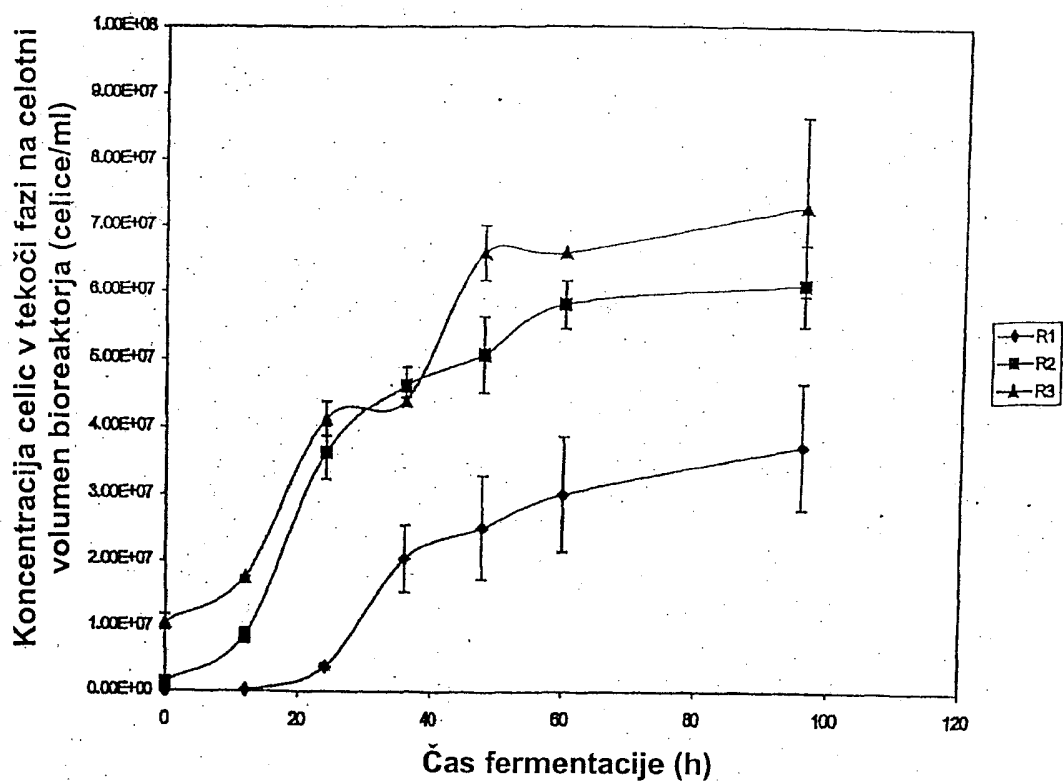
SL. 6.6. a)



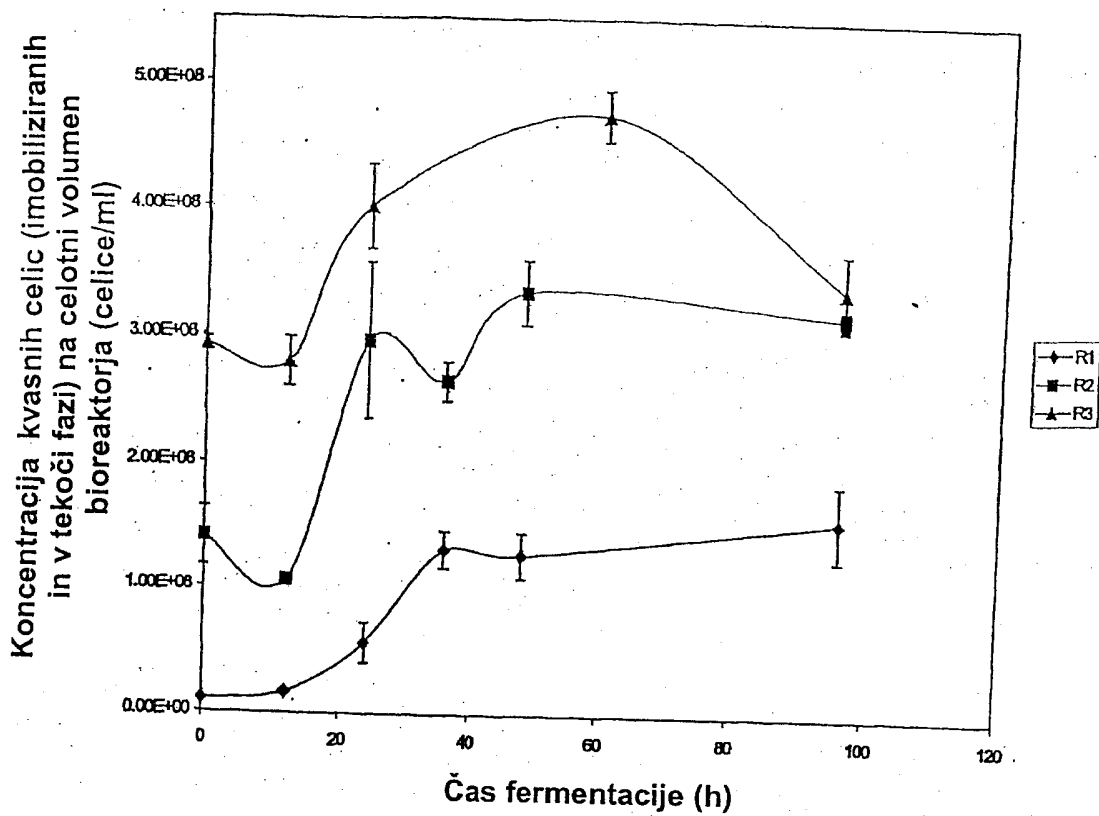
SL. 6.6. b)



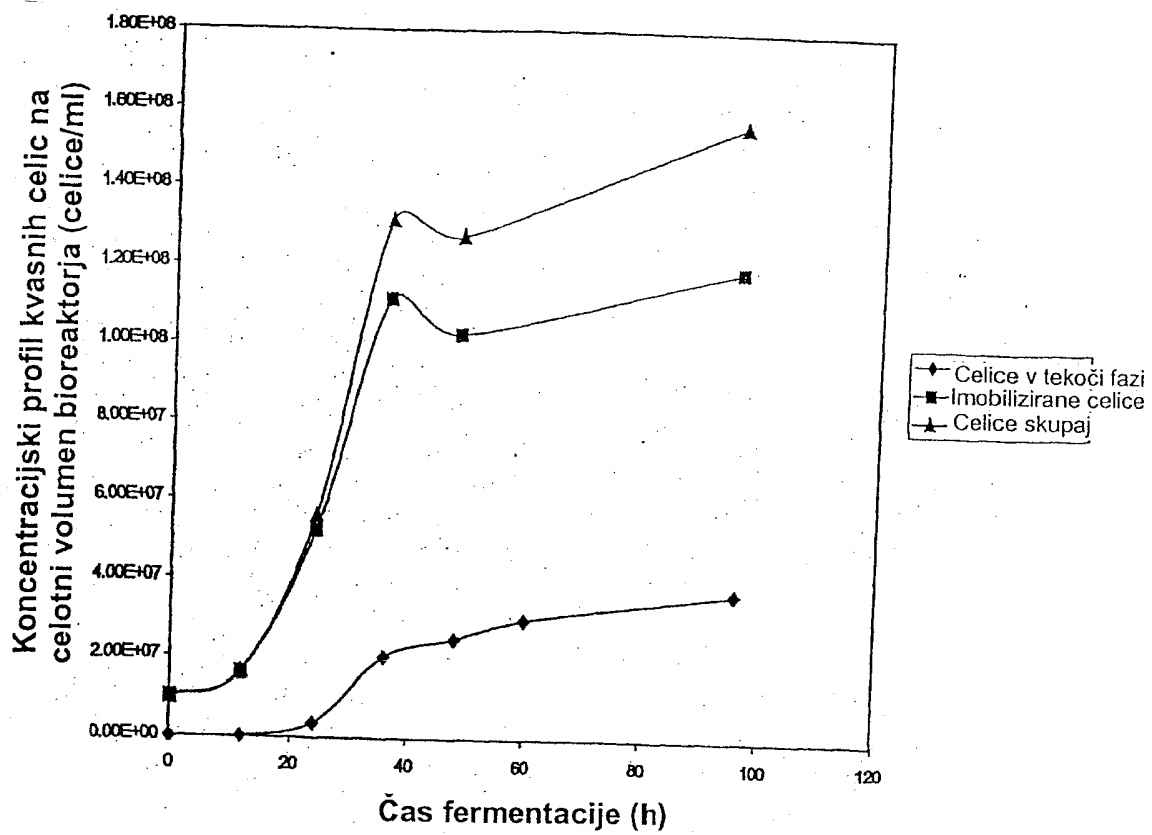
SL. 6.7. a)



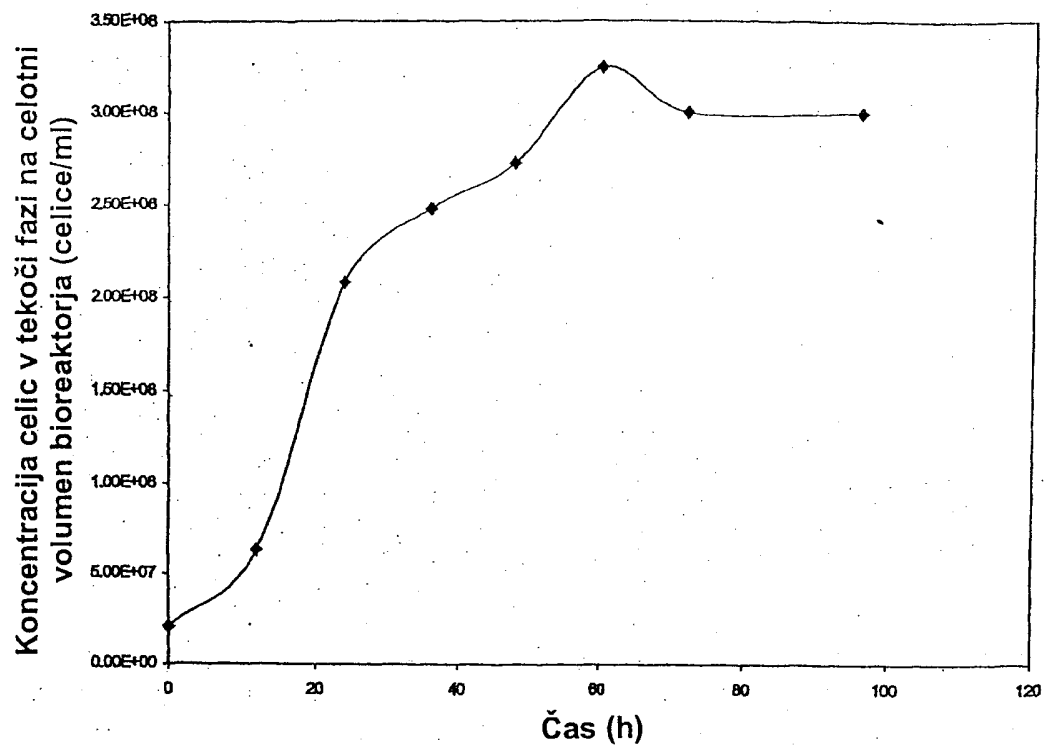
SL. 6.7. b)



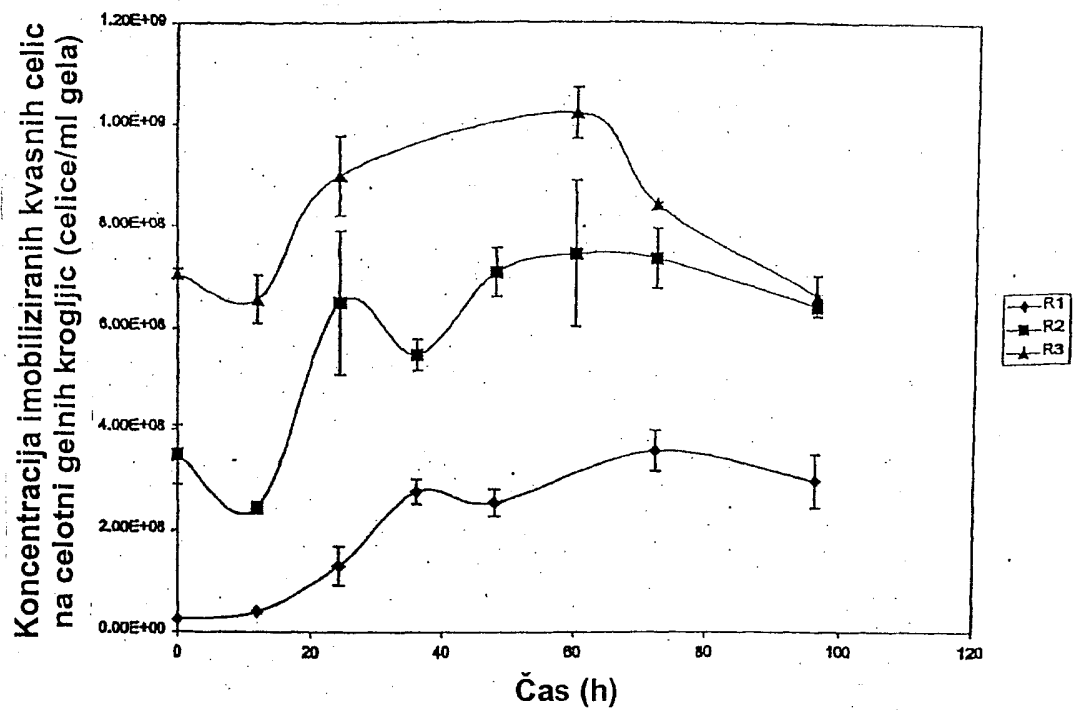
SL. 6.7. c)



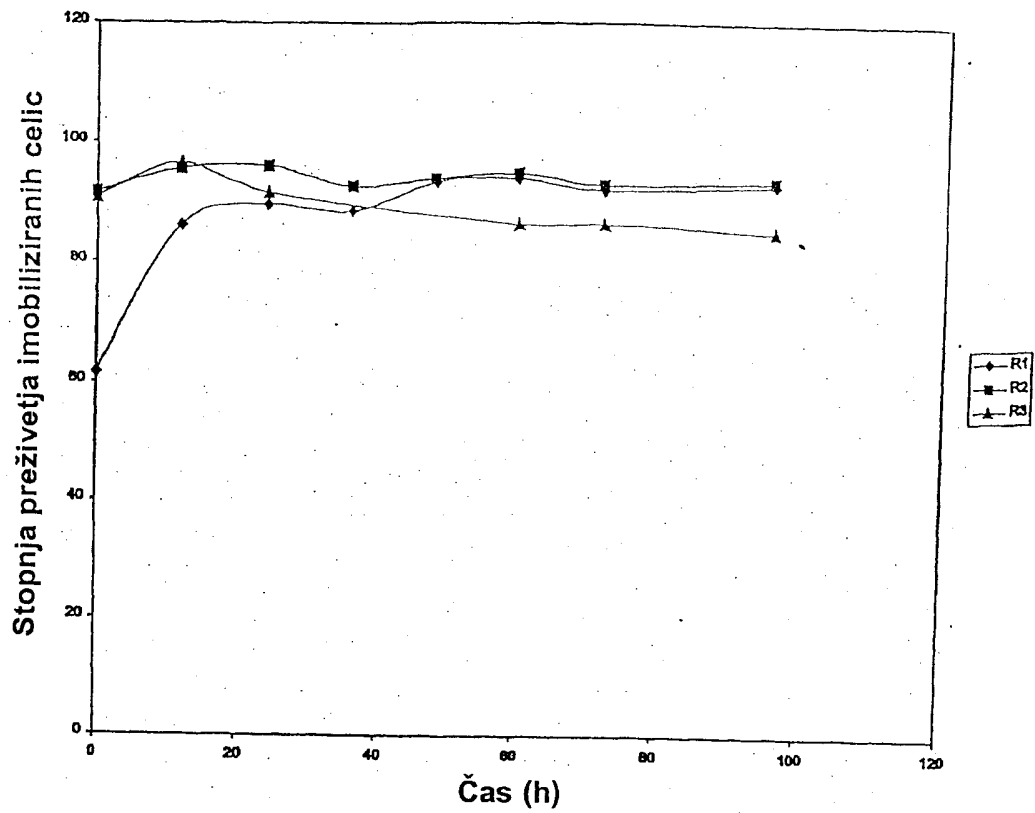
SL. 6.8



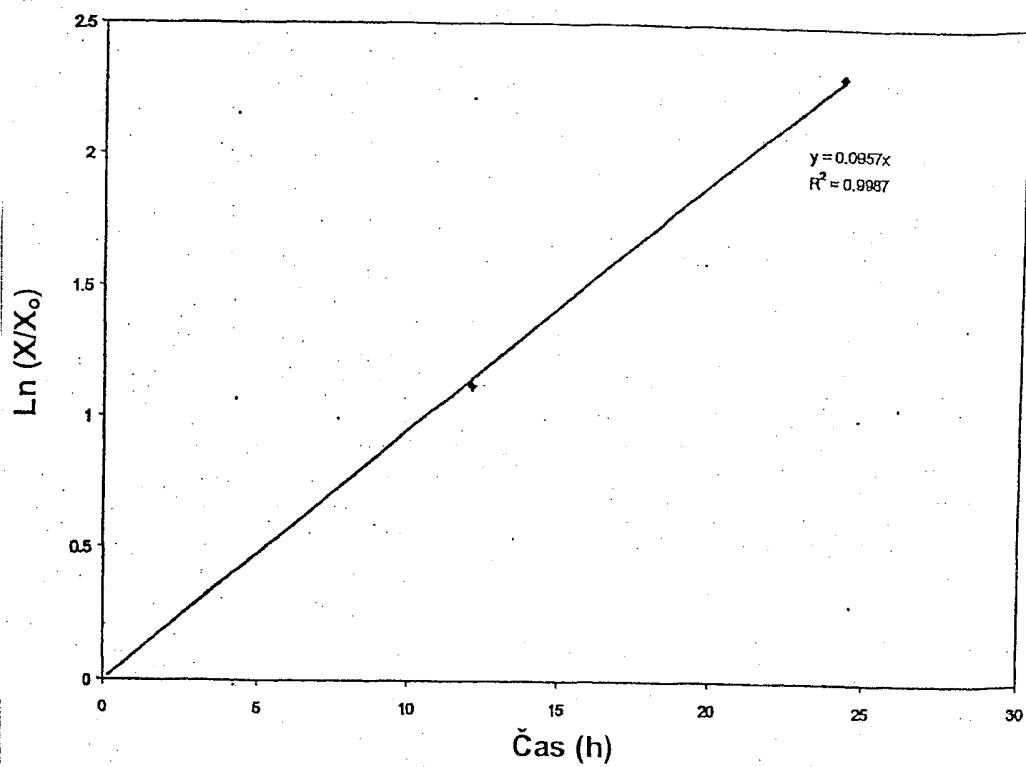
SL. 6.9



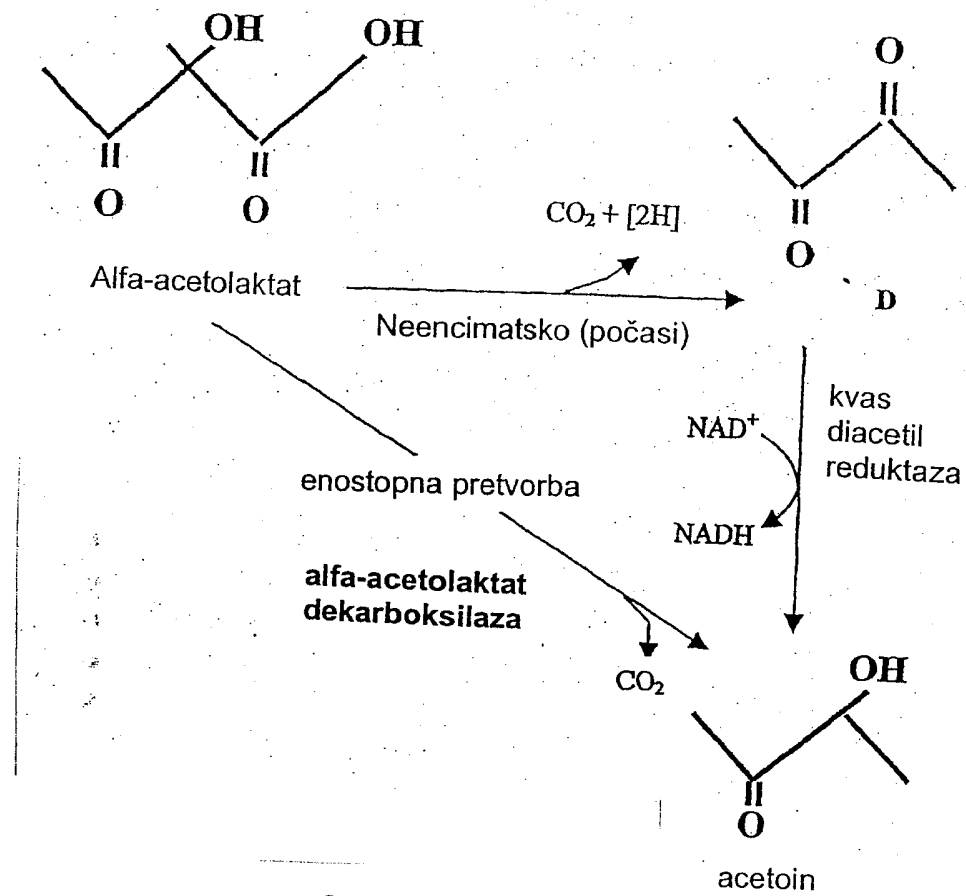
SL. 6.10



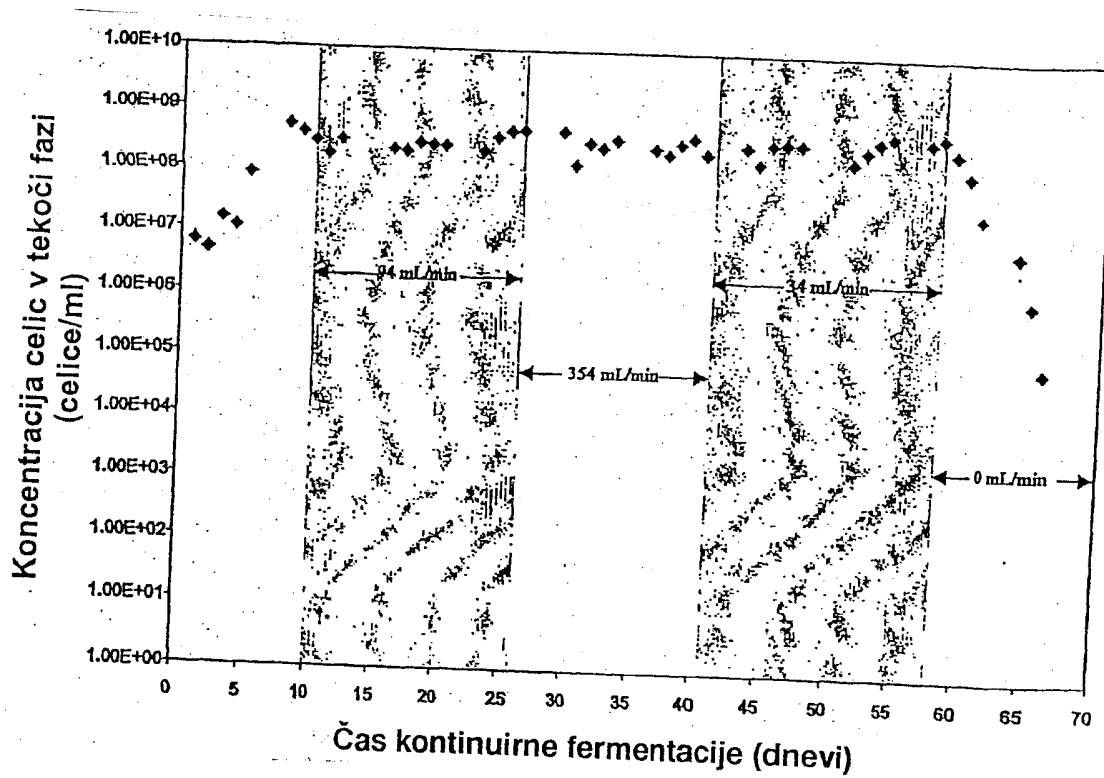
SL. 6.11



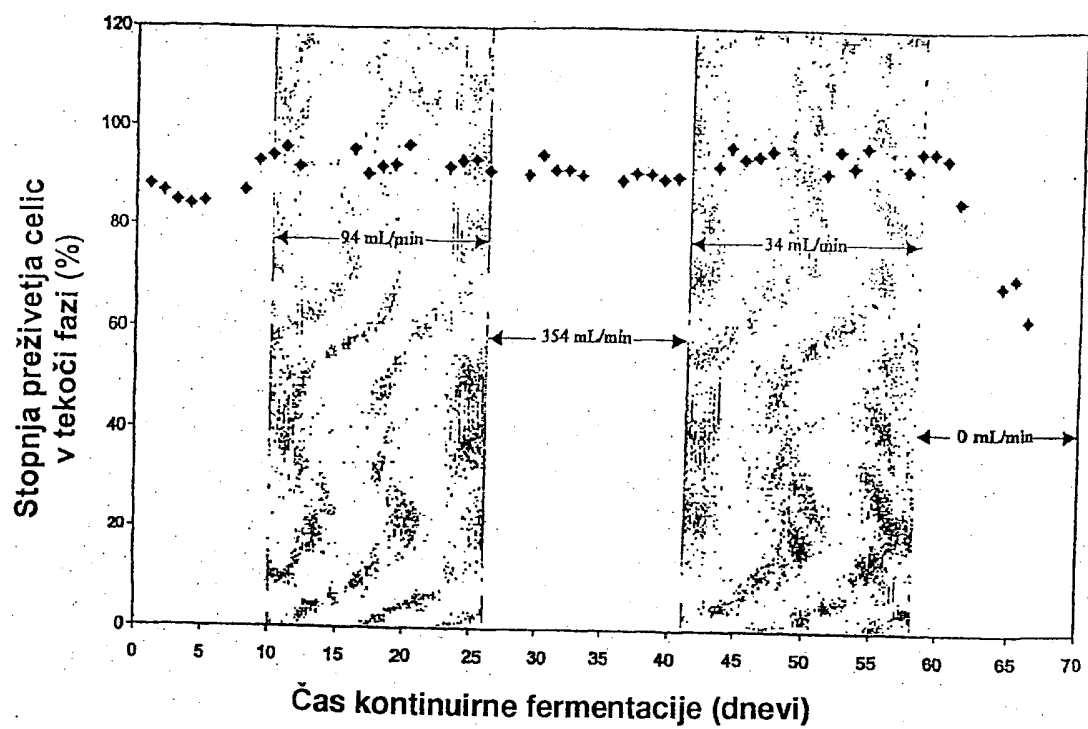
SL. 6.12



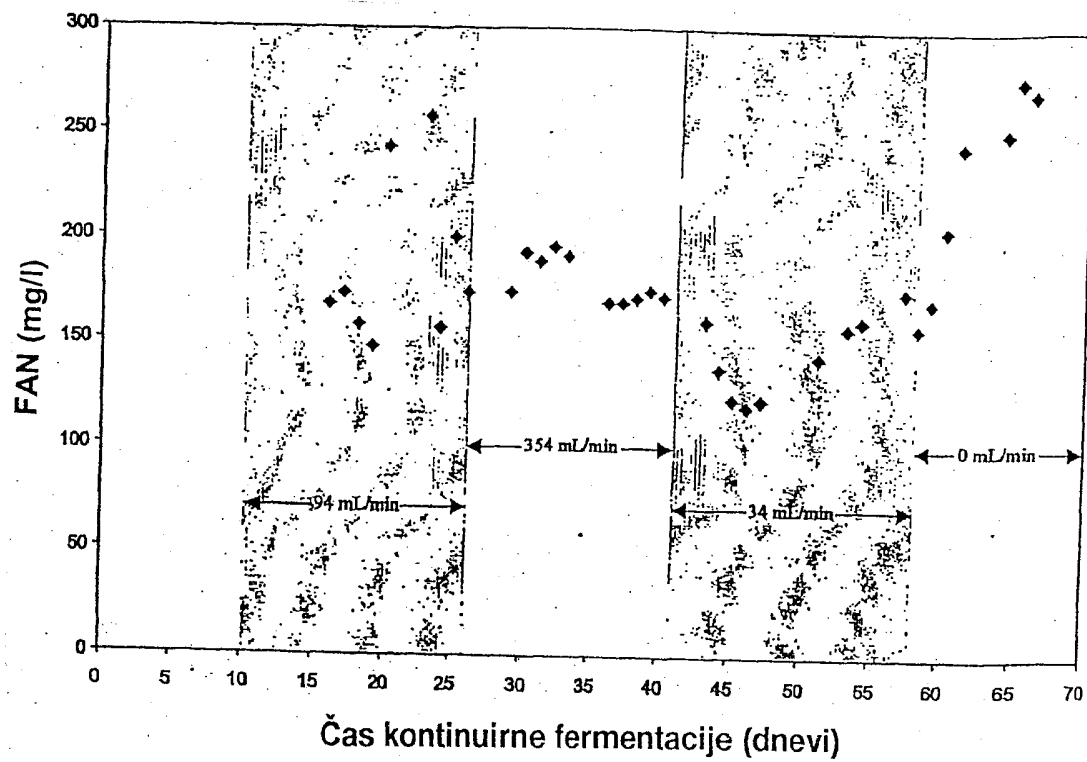
SL. 7.1



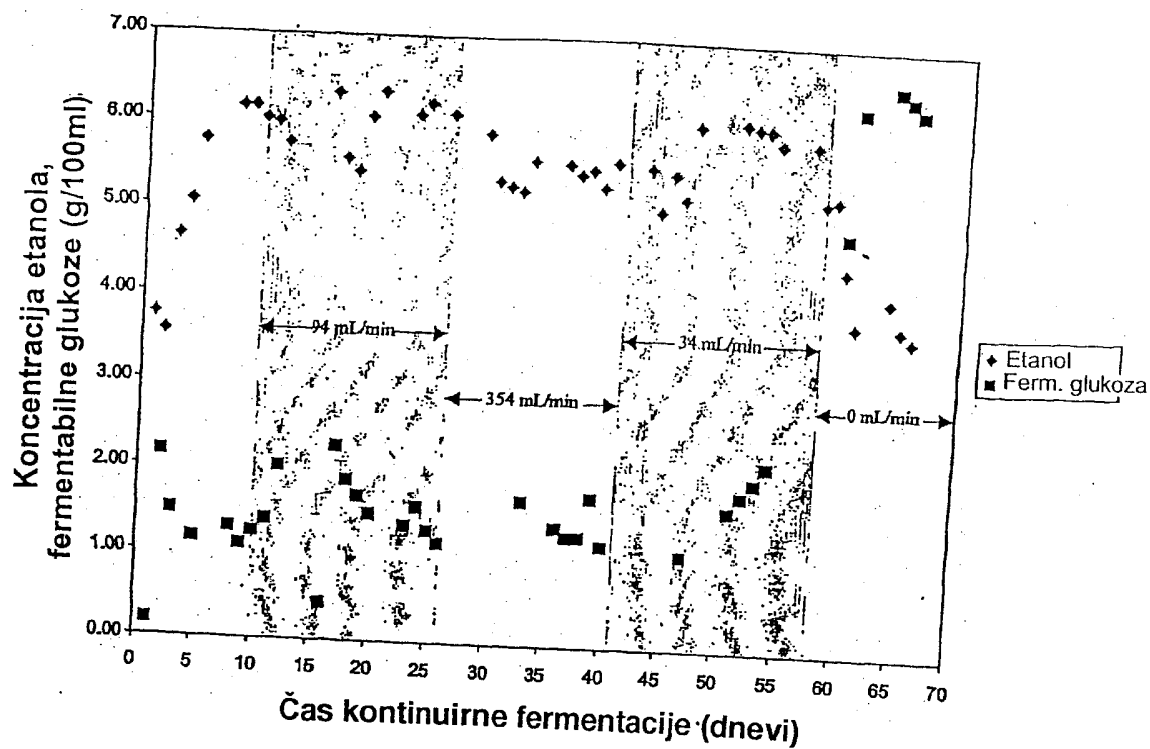
SL. 7.2



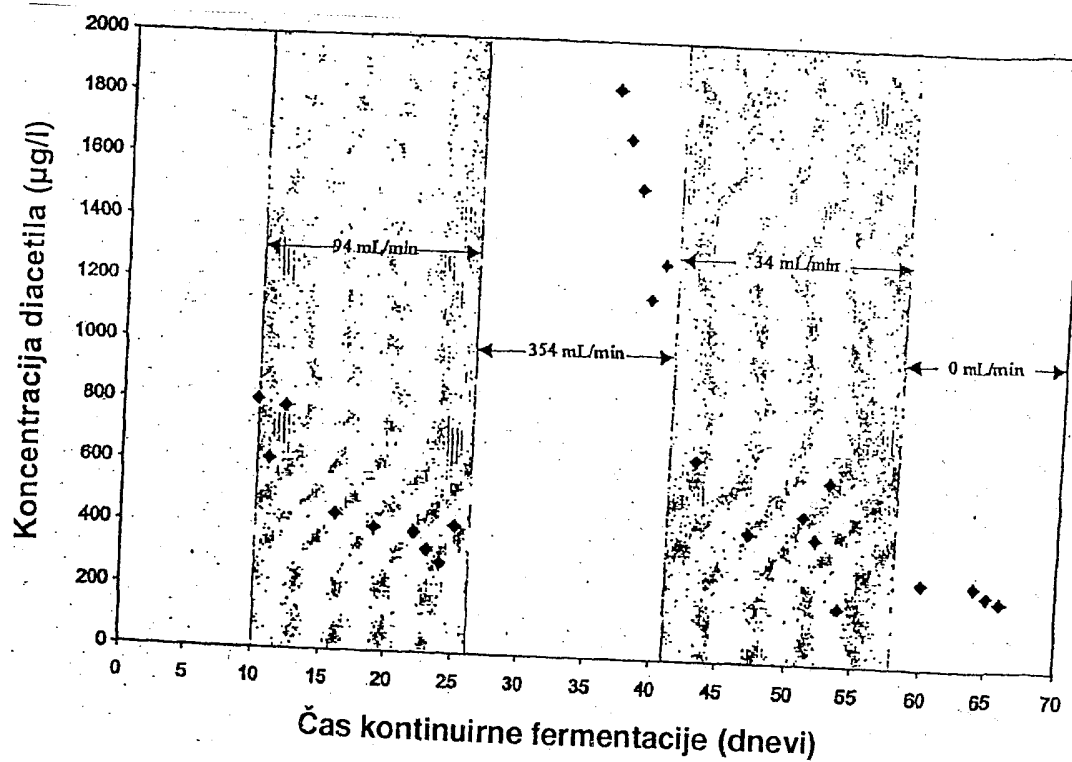
SL. 7.3



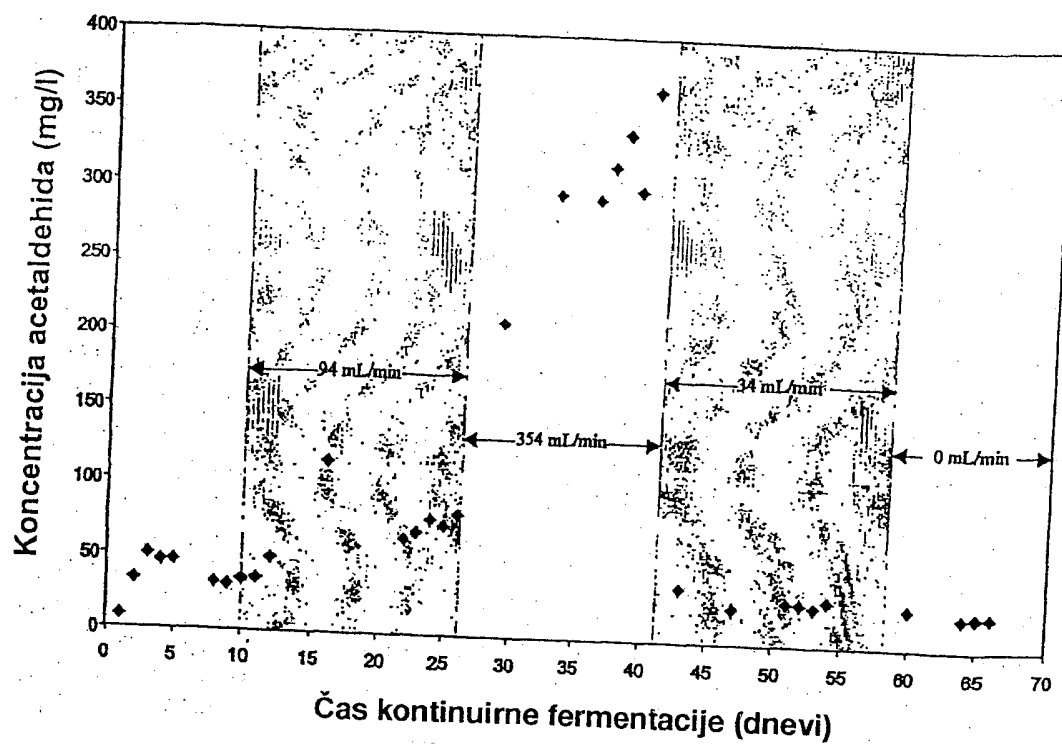
SL. 7.4



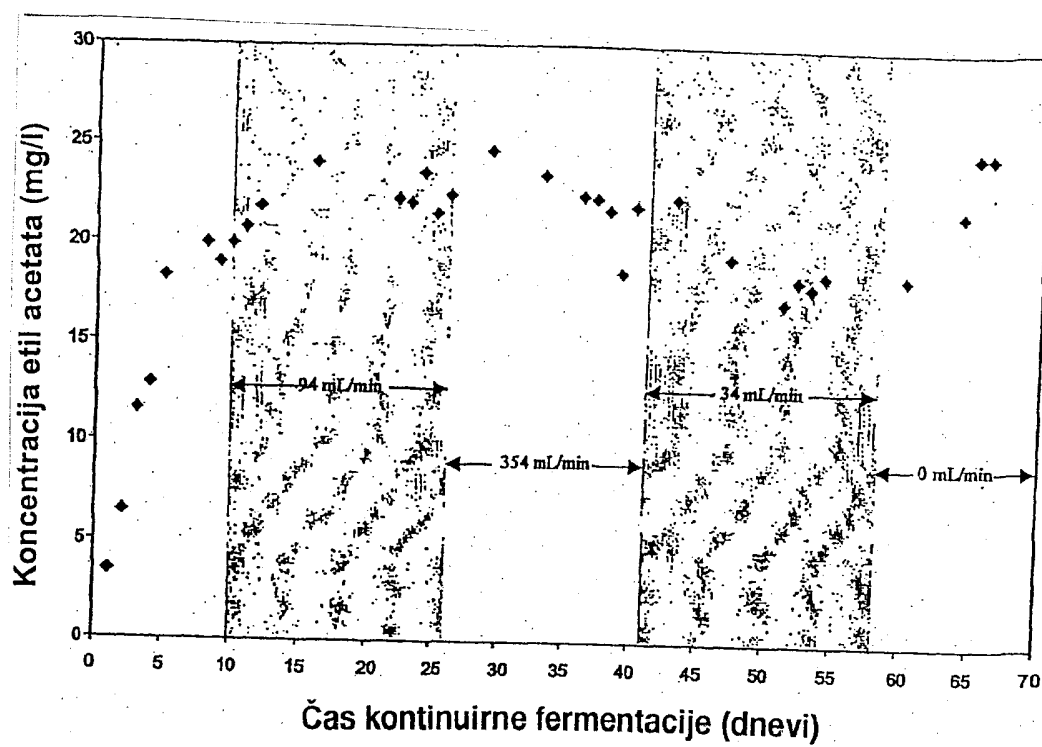
SL. 7.5



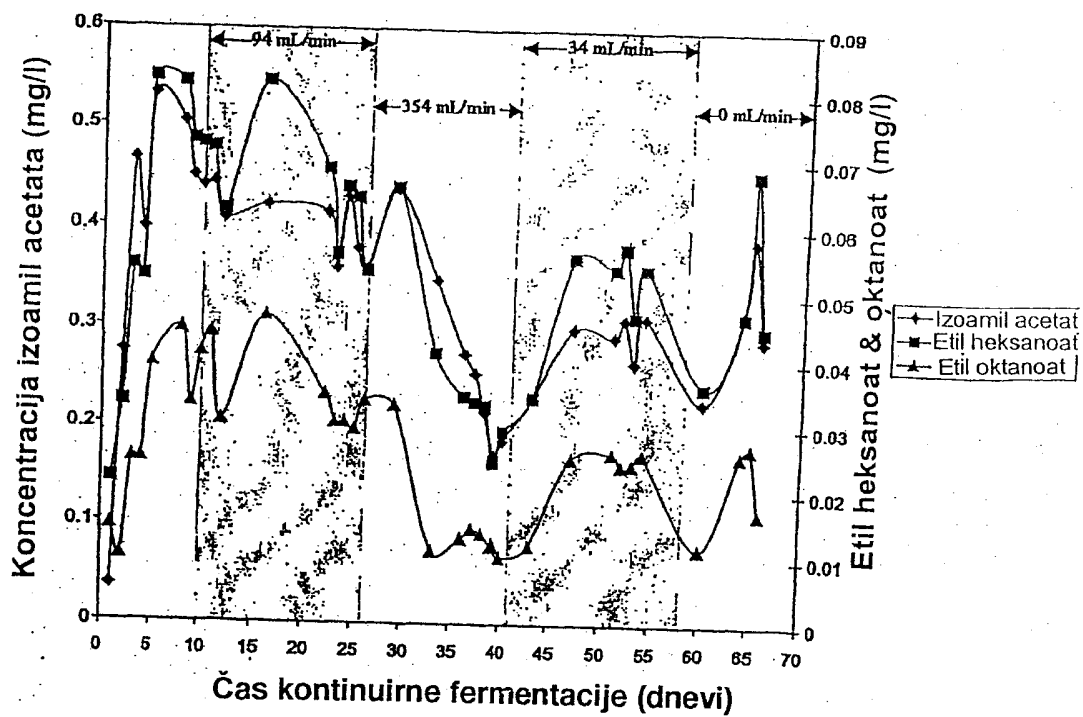
SL. 7.6



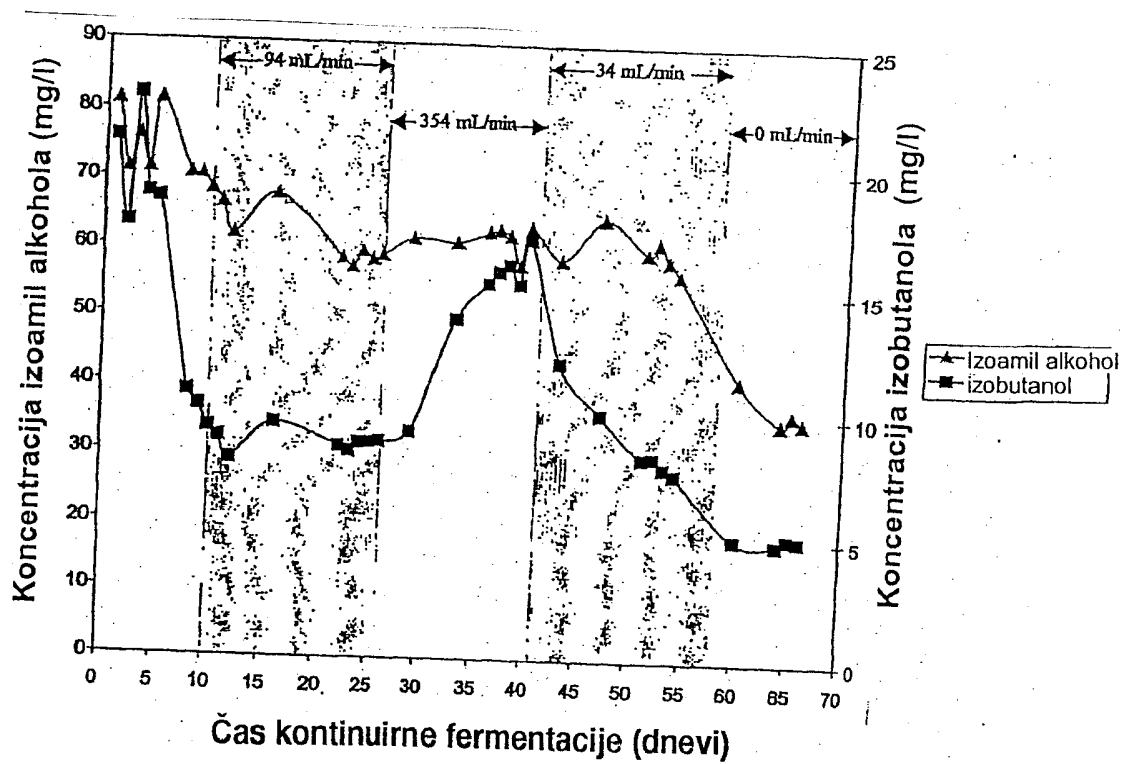
SL. 7.7



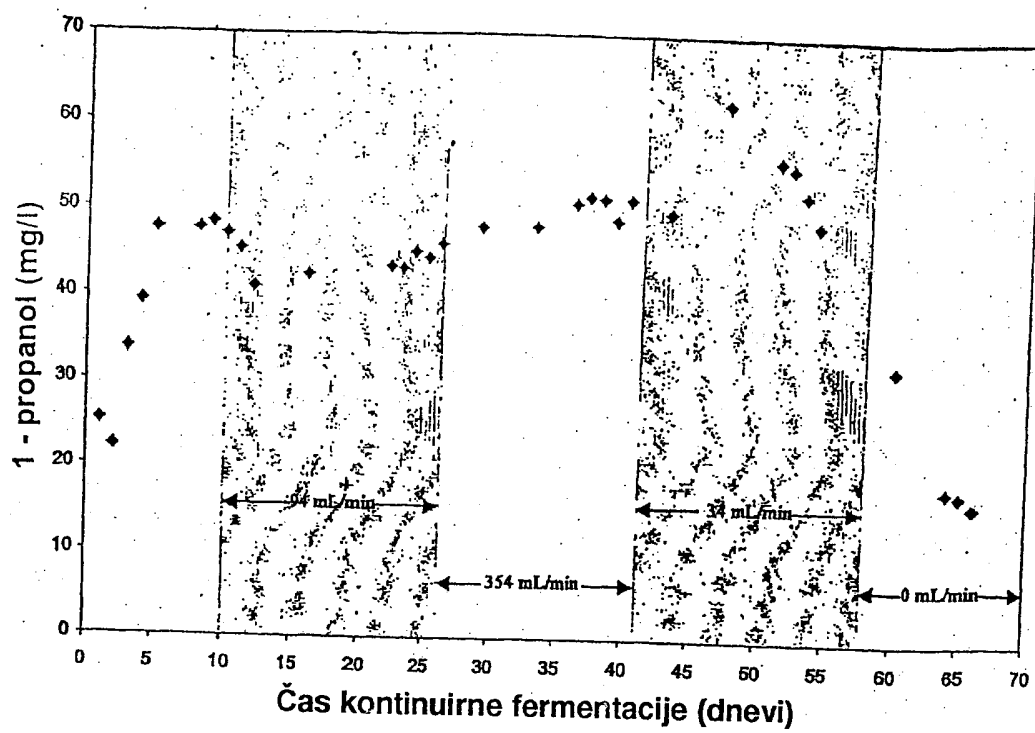
SL. 7.8



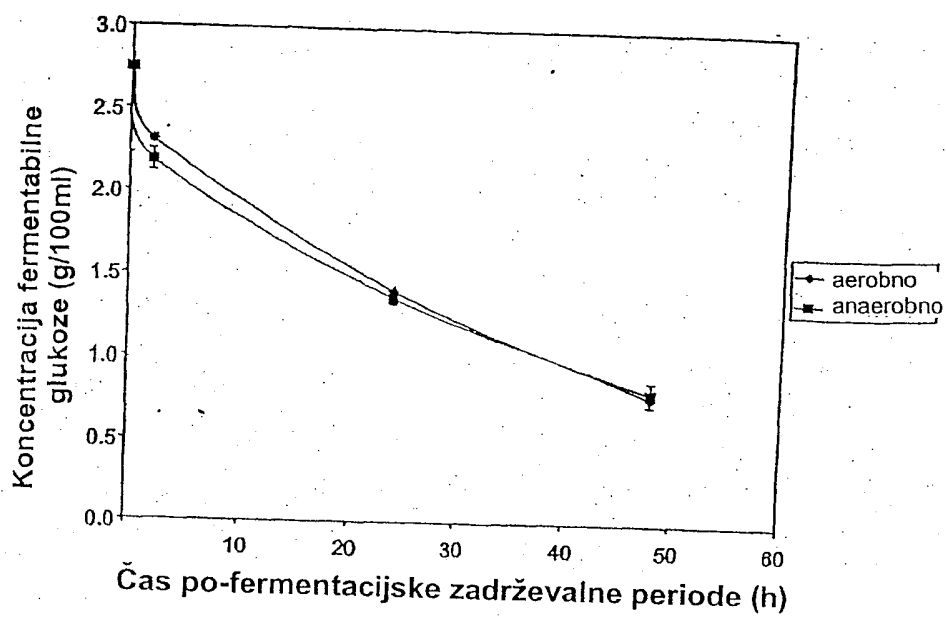
SL. 7.9



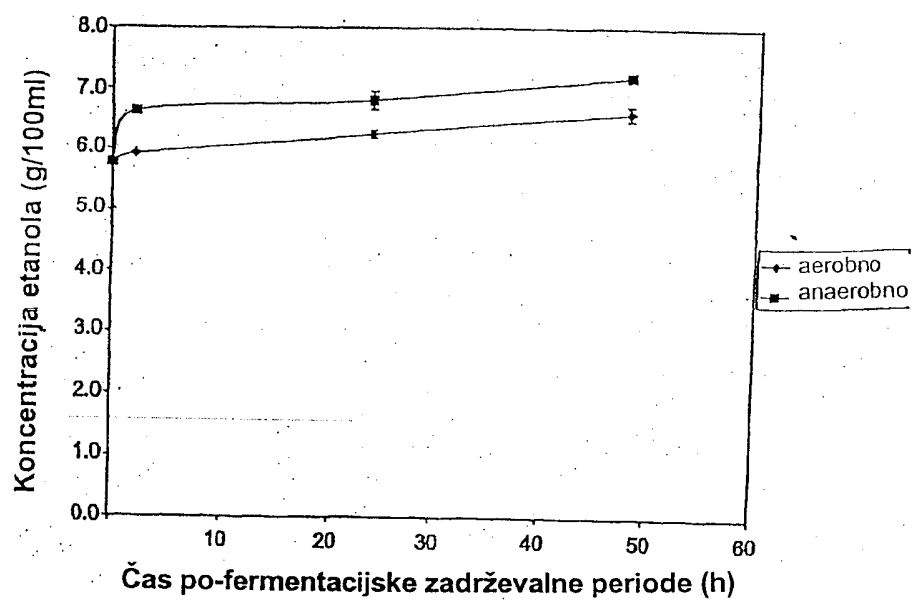
SL. 7.10



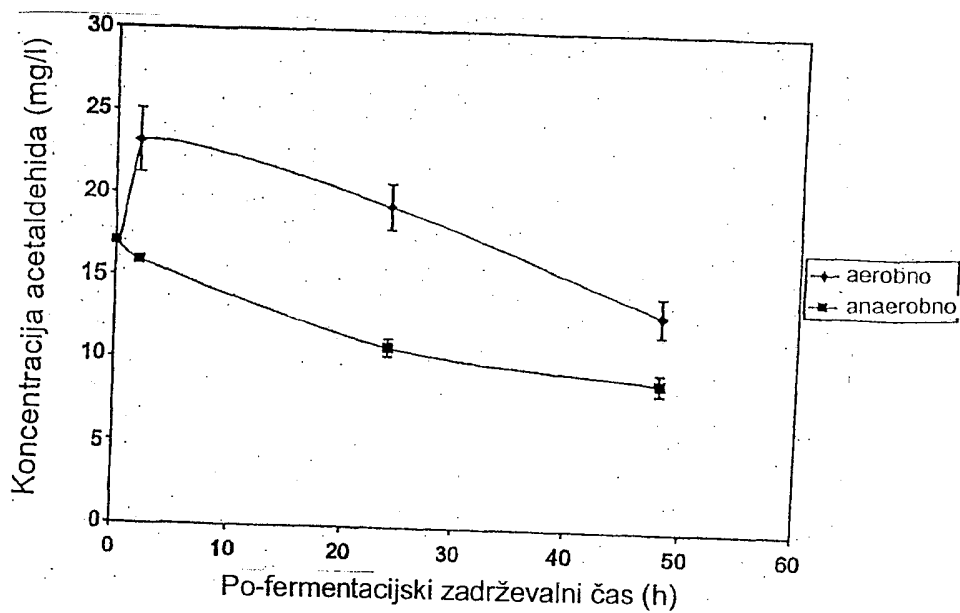
SL. 7.11



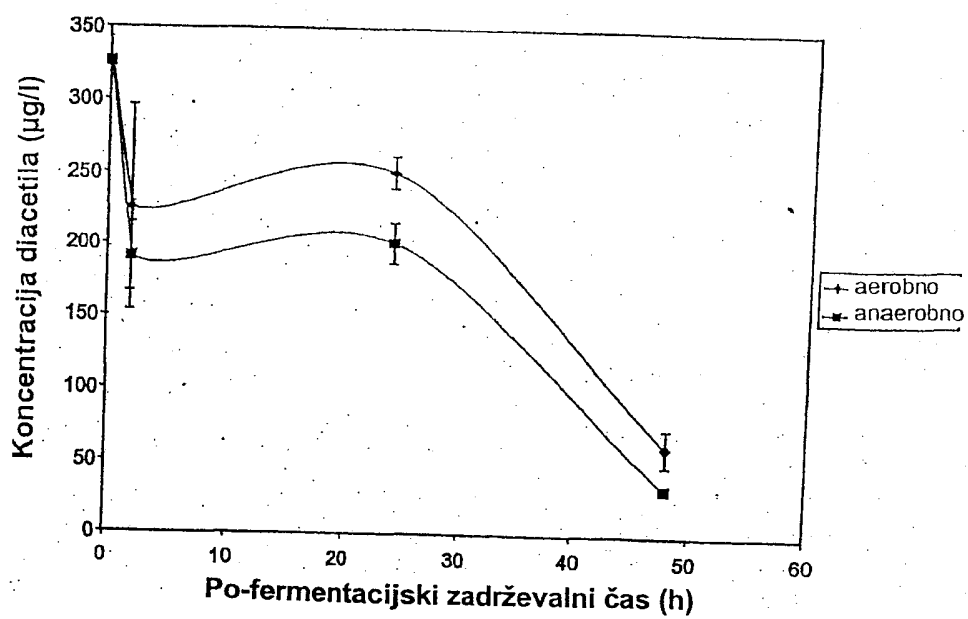
SL. 7.12



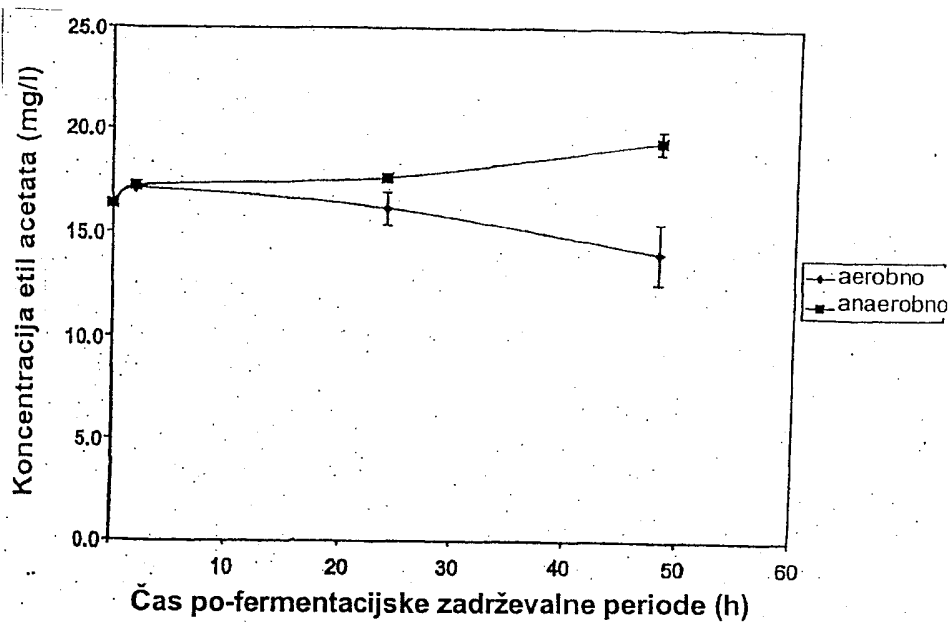
SL. 7.13



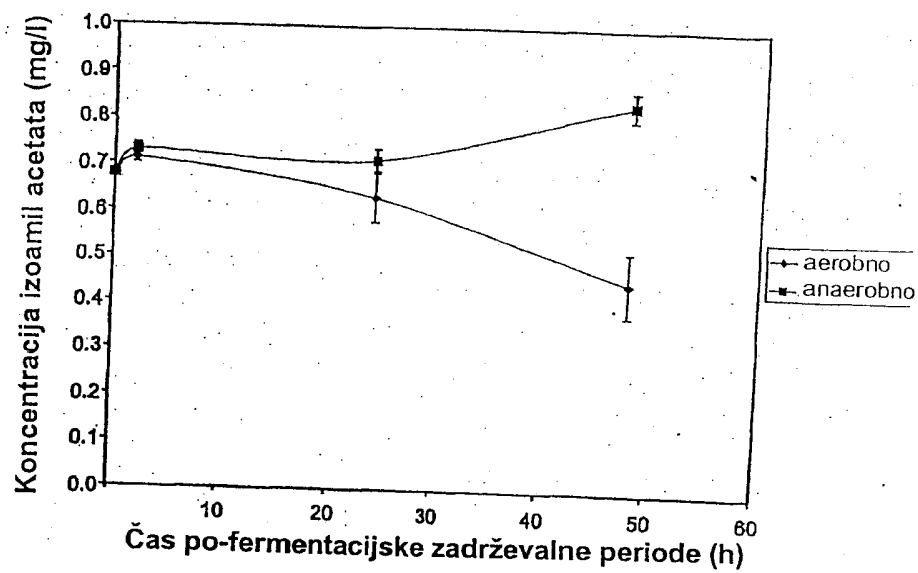
SL. 7.14



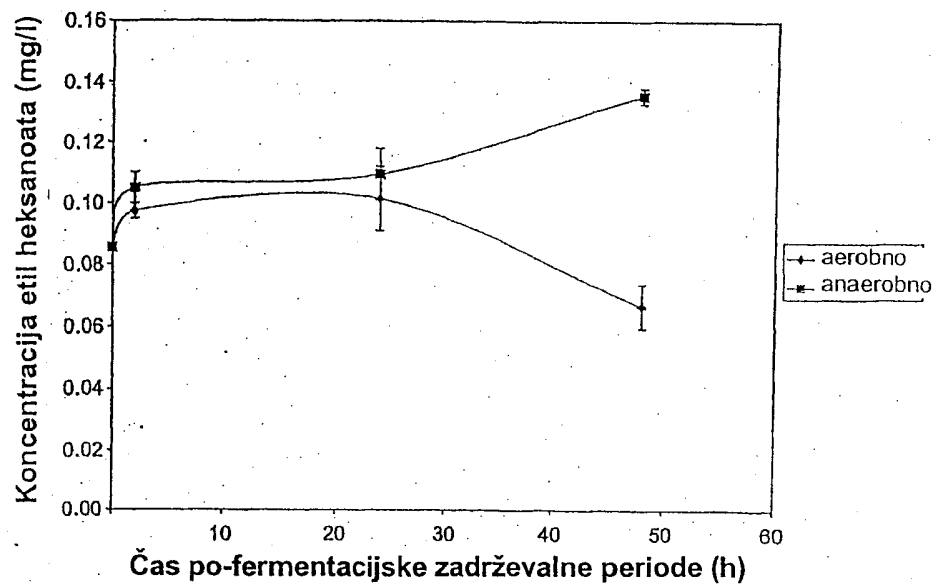
SL 7.15



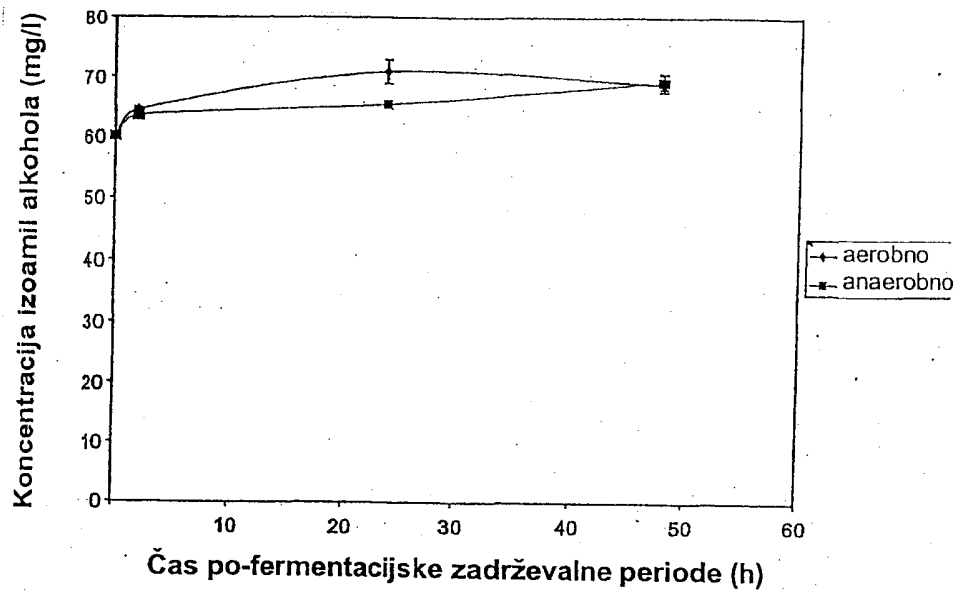
SL. 7.16



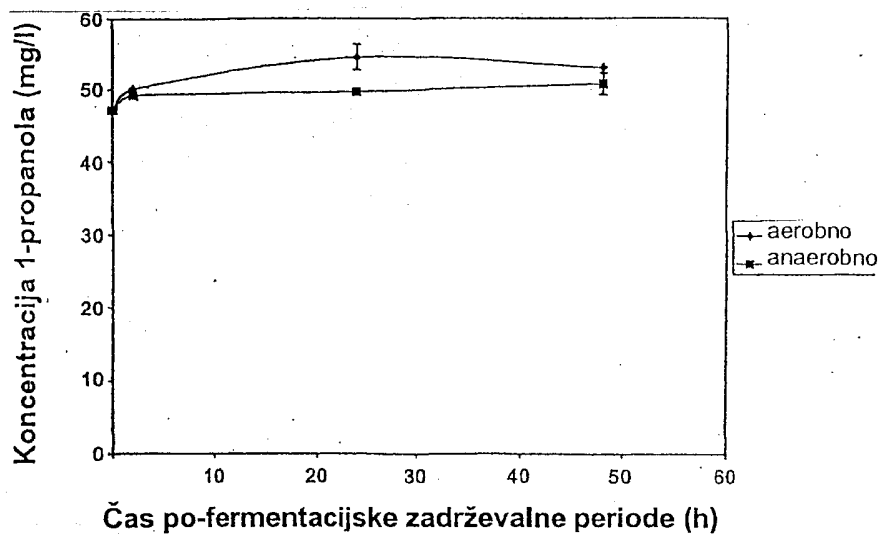
SL. 7.17



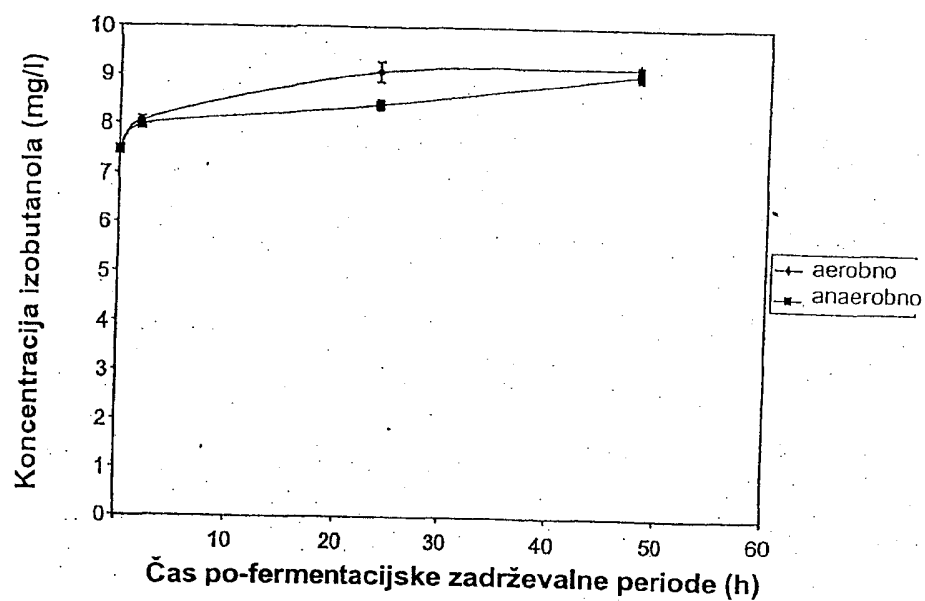
SL. 7.18



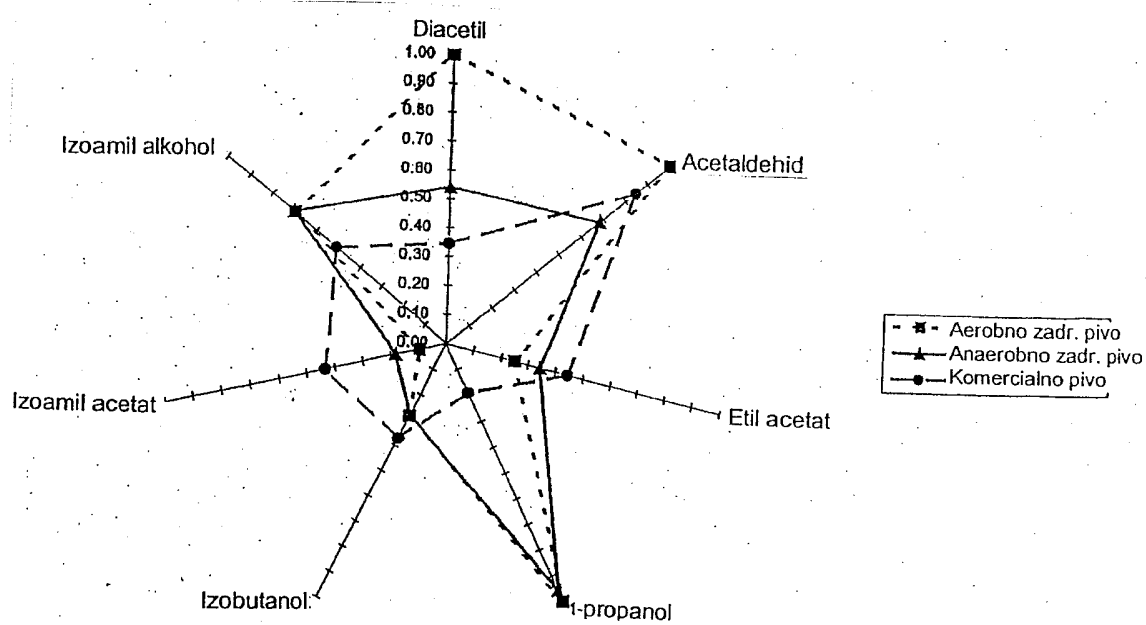
SL. 7.19



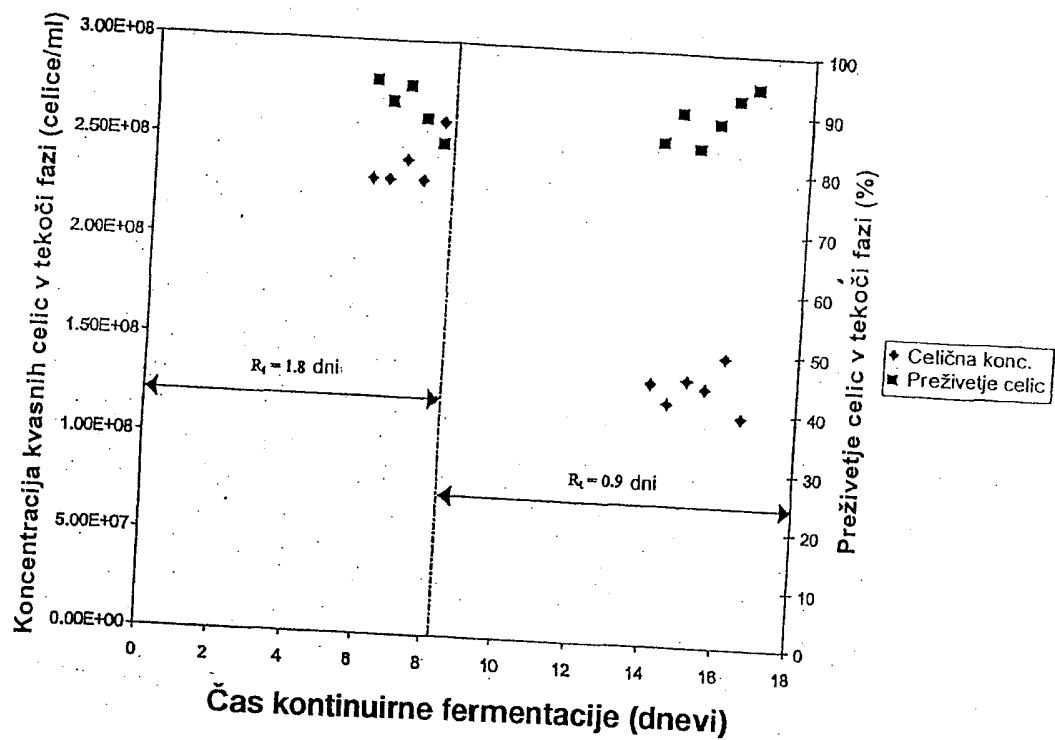
SL. 7.20



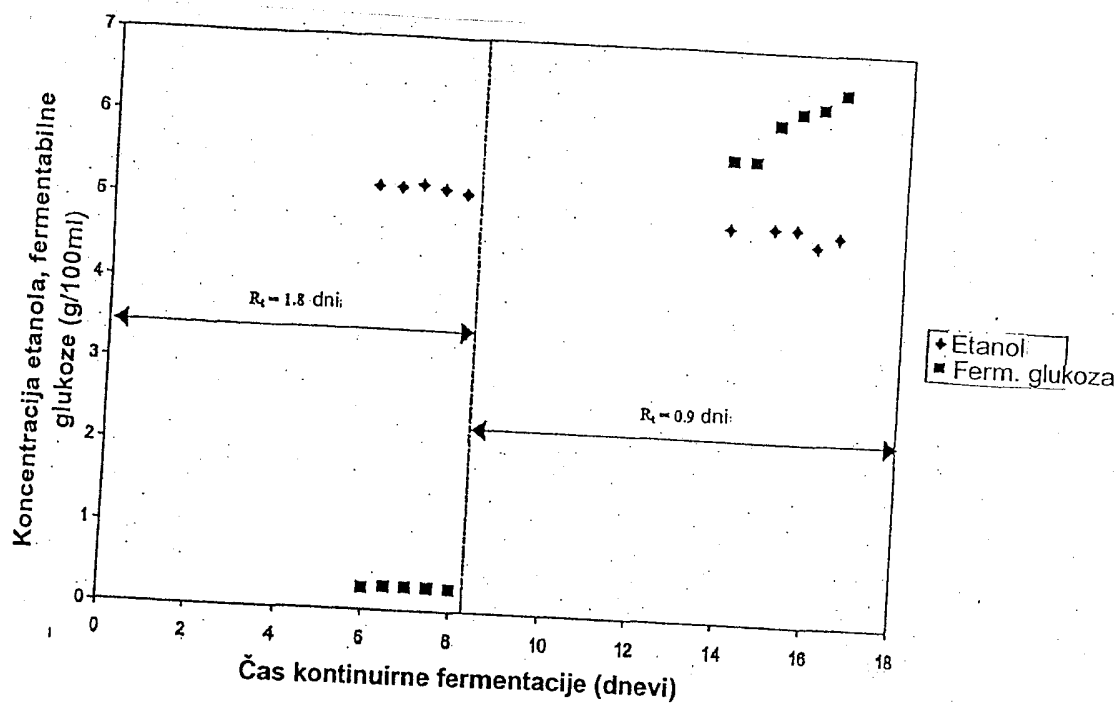
SL. 7.21



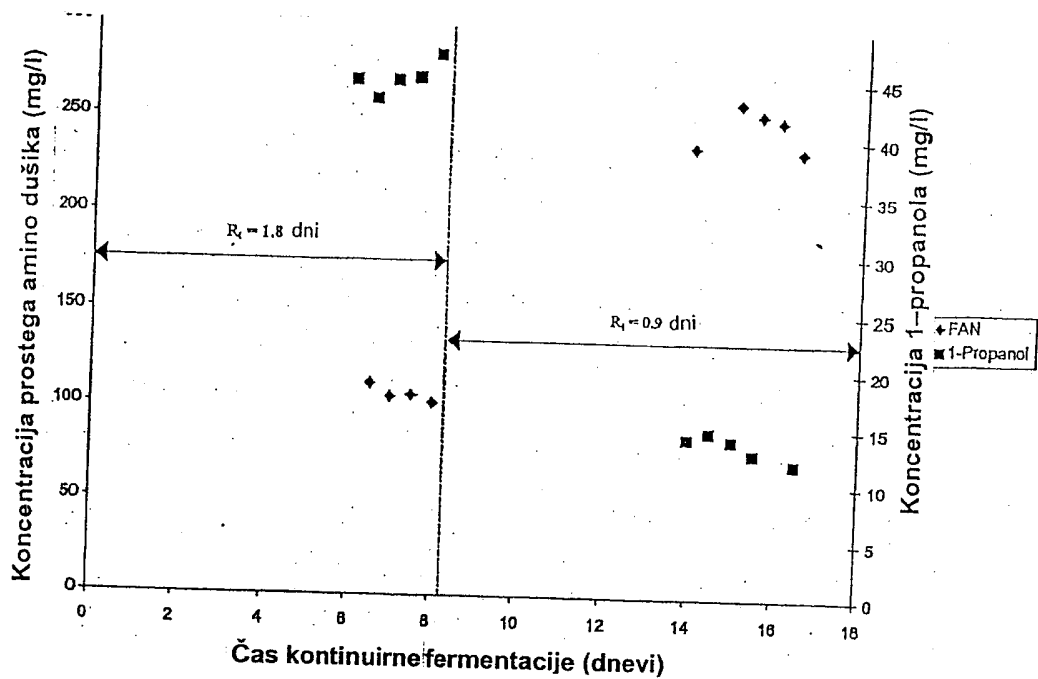
SL. 7.22



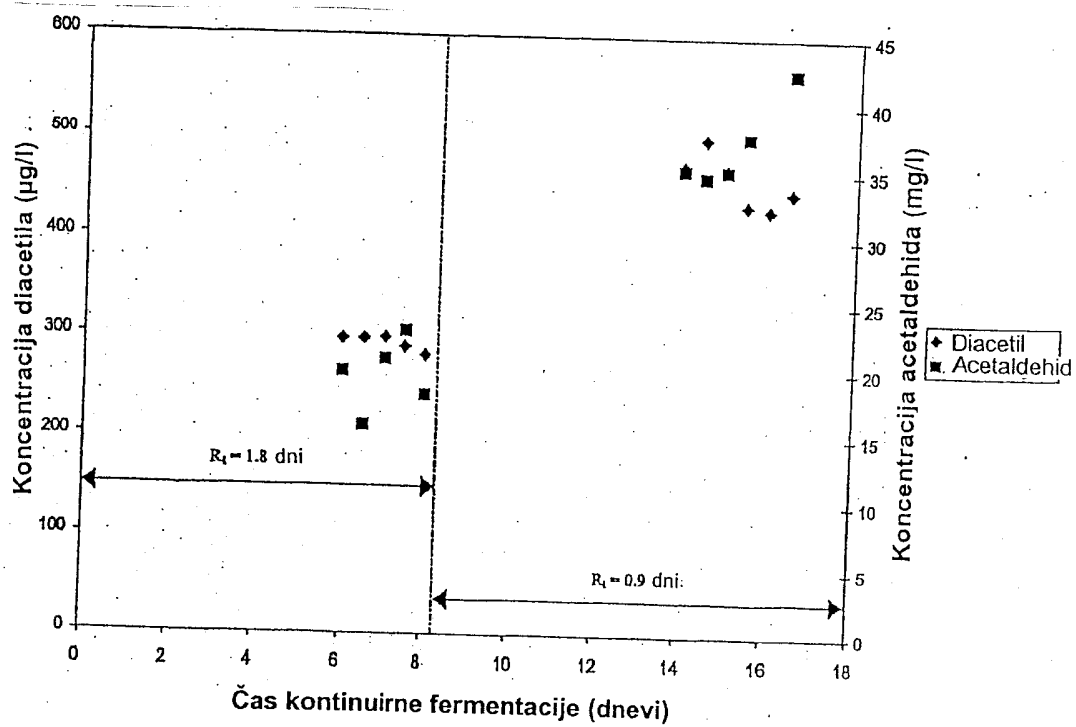
SL. 7.23



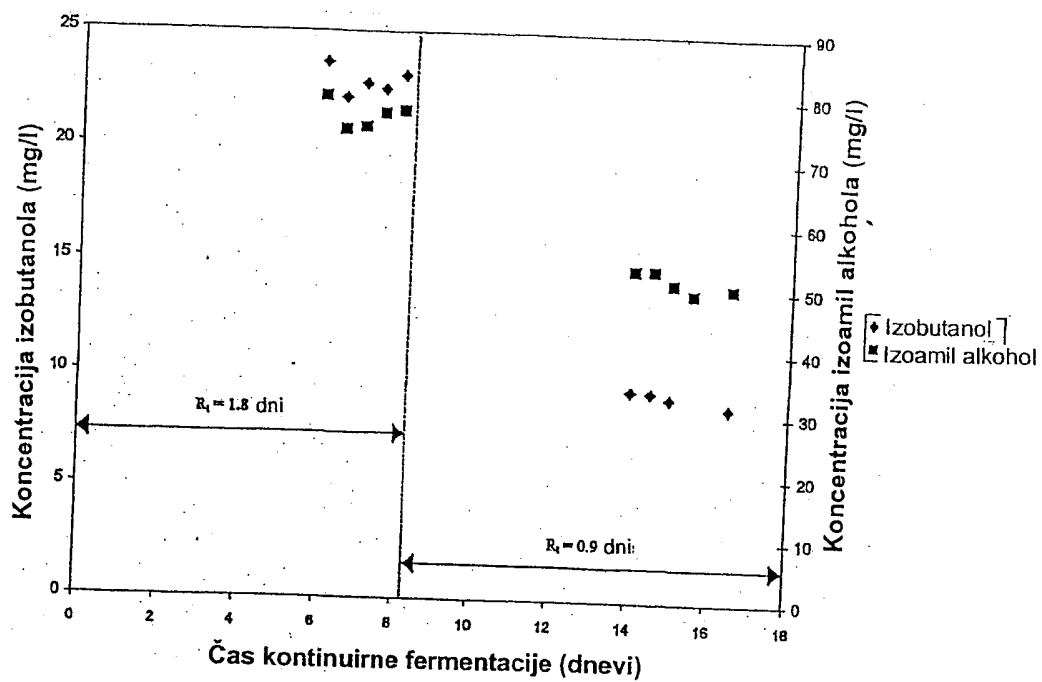
SL. 7.24



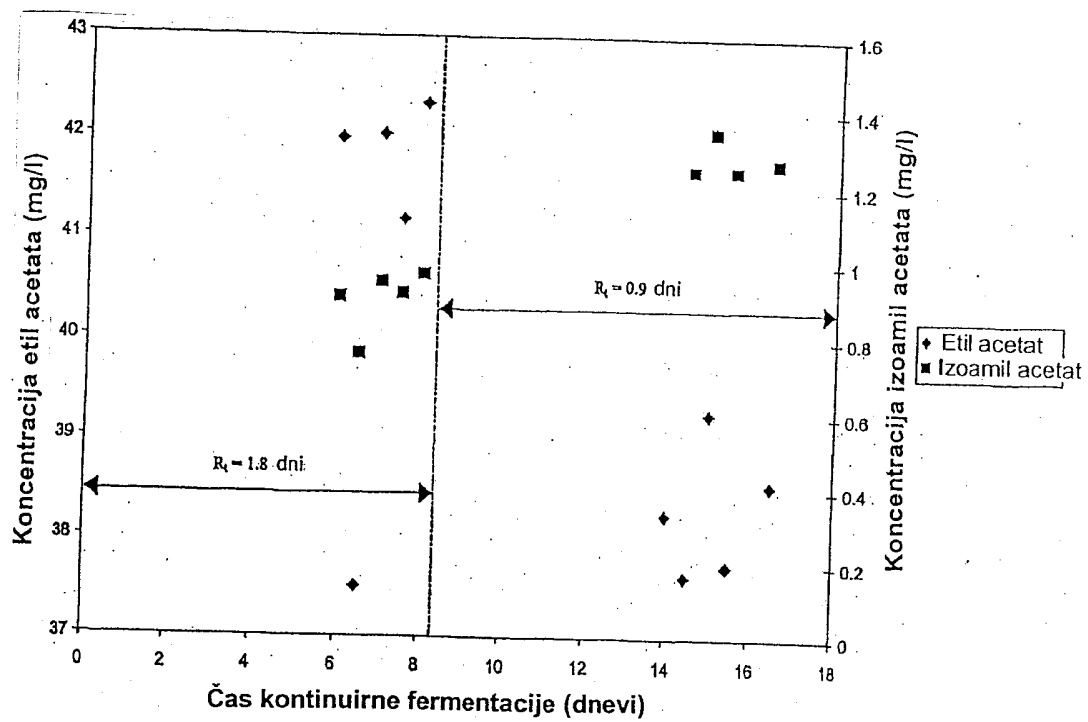
SL. 7.25



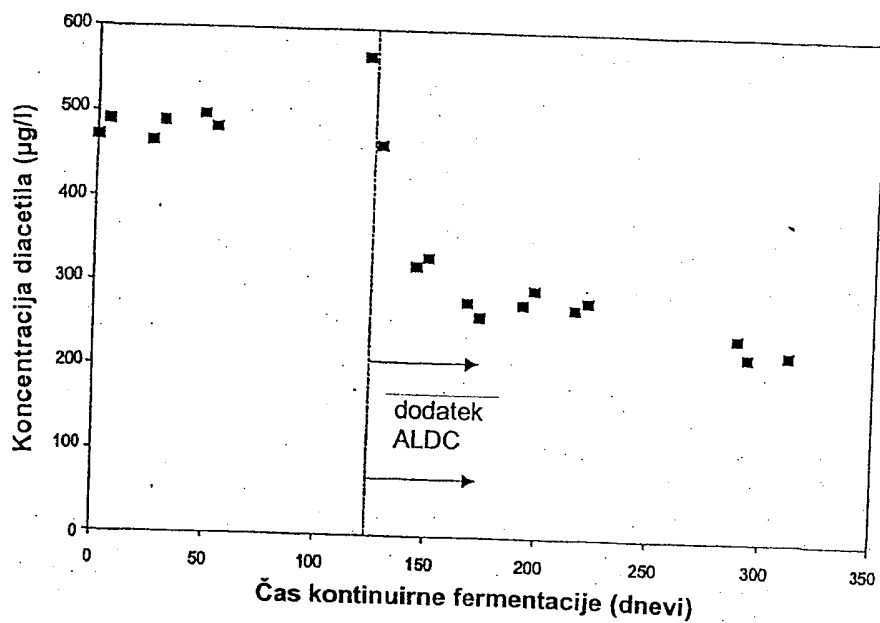
SL. 7.26



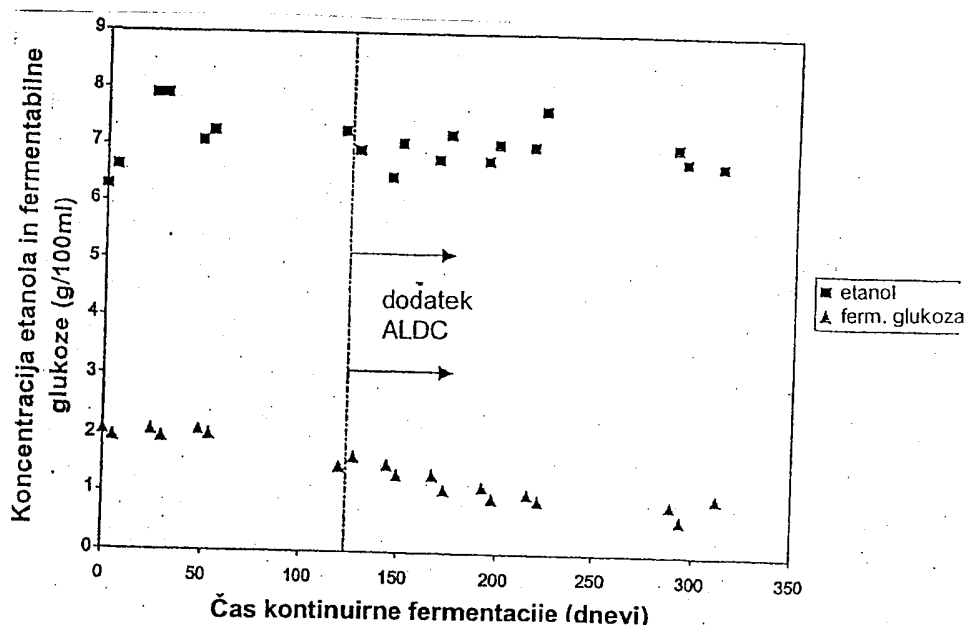
SL. 7.27



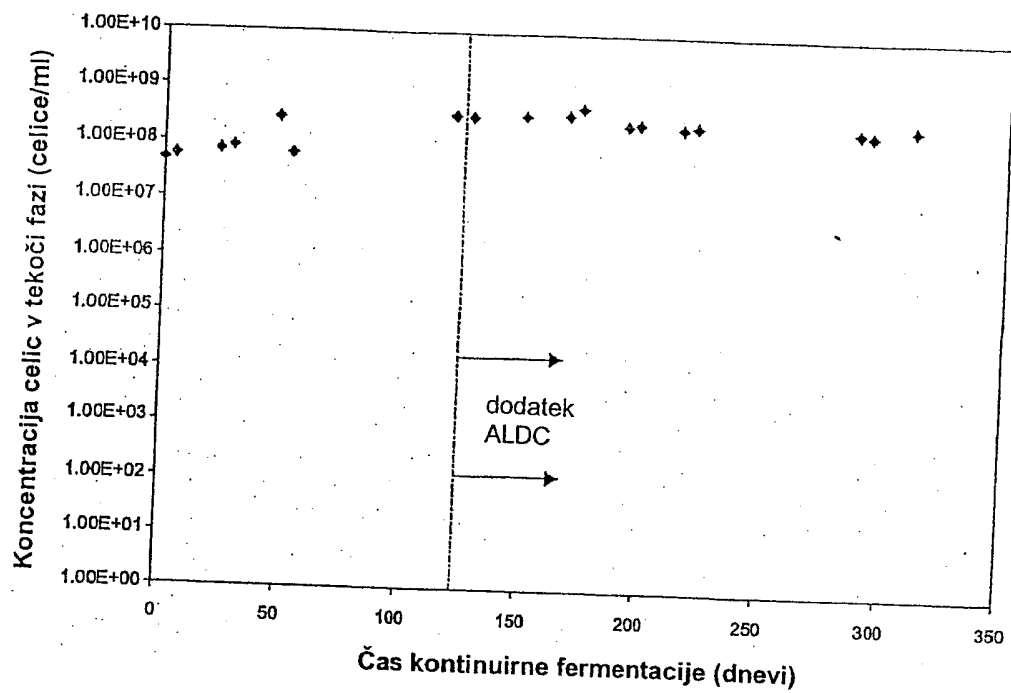
SL. 7.28



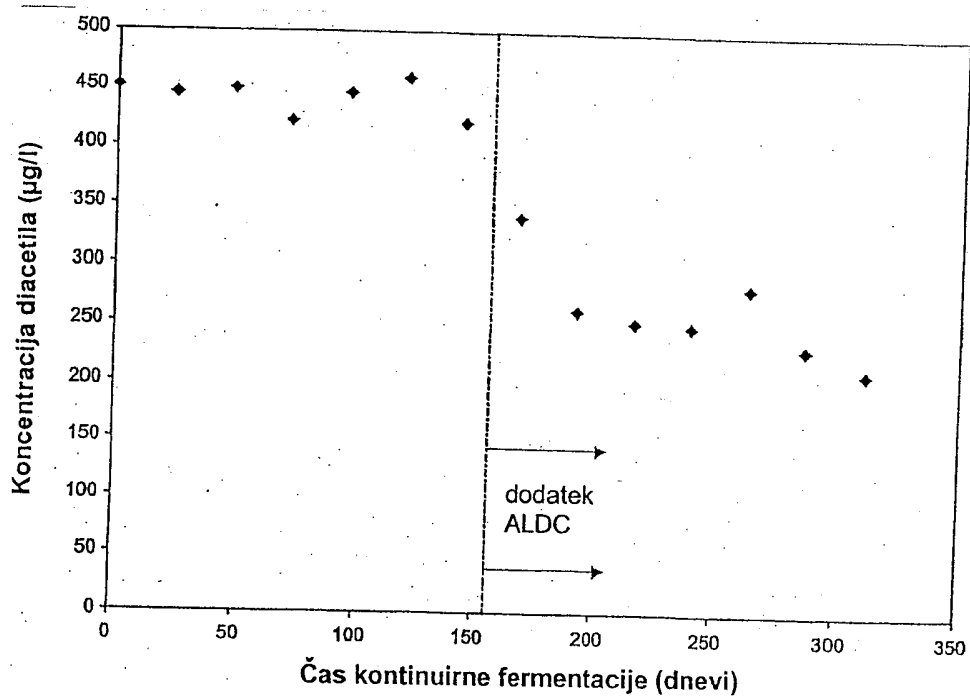
SL. 7.29



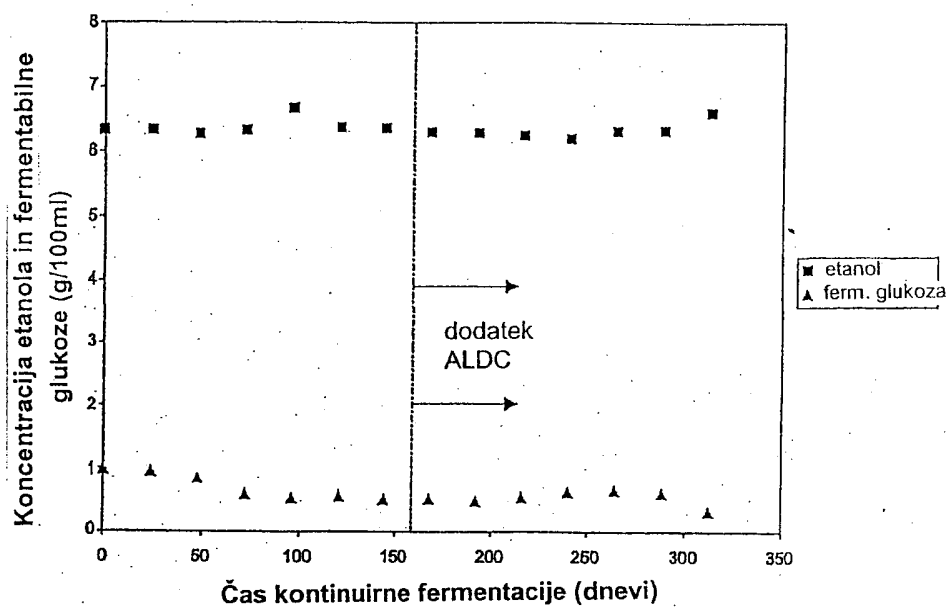
SL. 7.30



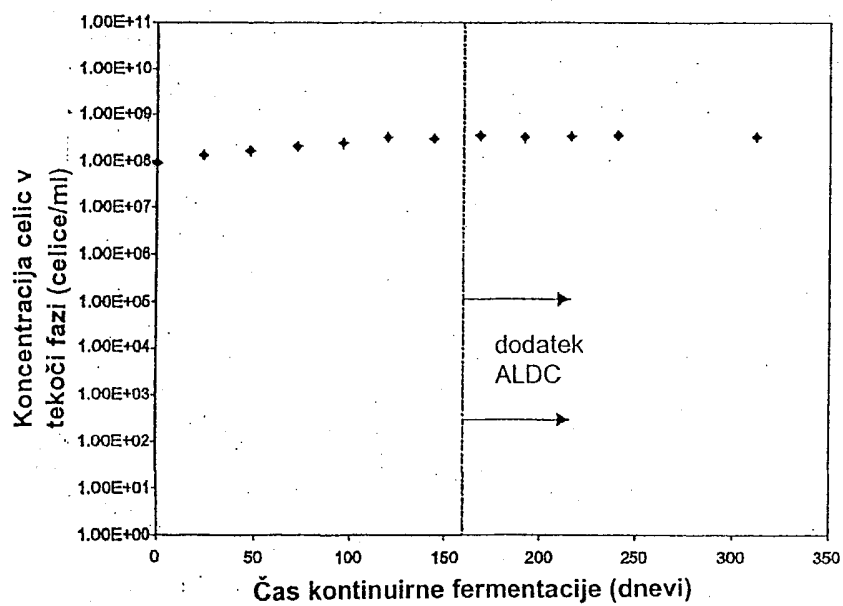
SL. 7.31



SL. 7.32



SL. 7.33



SL. 7.34