



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84536 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12C 11/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПИВА

1

(21) 2004010392
(22) 20.06.2002
(24) 10.11.2008
(86) PCT/CA02/00970, 20.06.2002
(31) 60/299,153
(32) 20.06.2001
(33) US
(31) 60/299,186
(32) 20.06.2001
(33) US
(46) 10.11.2008, Бюл.№ 21, 2008 р.
(72) ПІЛКІНГТОН ФІЛЛІС ХІЗЕР, МЕНСУР НОР-
МАНД ЕНТОНІ
(73) ЛАБАТТ БРЮІНГ КОМПАНІ ЛІМІТЕД
(56) DE C1 4430905, 24.05.1995
EP A 0669393, 30.08.1995
EP A 1106679, 13.06.2001
US 4929452, 29.05.1990
KRONLOF J ET AL: "PRODUCTION OF BEER
USING IMMOBILIZED YEAST ENCODING A-
ACETOLACTATE DECARBOXYLASE", JOURNAL
OF THE INSTITUTE OF BREWING, INSTITUTE OF
BREWING, LONDON, GB, vol.98, no.6, 01.11.1992,
pages 479-491
LINKO M ET AL: "Recent advances in the malting
and brewing industry" JOURNAL OF
BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE
PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol.65, no.2-3,
27.10.1998, pages 85-98
PILKINGTON ET AL.: "Kappa-carragenan gel
immobilisation of lager brewing yeast" JOURNAL OF
THE INSTITUTE OF BREWING, vol.105, no.6, 1999,
pages 398-404
(57) 1. Спосіб одержання пива, в якому на стадії
безперервного бродіння сусло, що містить цукри,
які зброджують, спочатку піддають бродінню з ви-
користанням іммобілізованих дріжджів, який **відрі-
зняється** тим, що іммобілізовані дріжджі являють
собою клітини флокулентних дріжджів, іммобілізо-
ваних шляхом самоагрегації, бродіння здійснюють

2

в газліфтному біореакторі із внутрішньою цирку-
ляцією при обмеженій подачі кисню і потім щонай-
менше частково зброджений продукт, одержаний в
результаті безперервного процесу, піддають заве-
ршальній стадії витримування пива в теплих умо-
вах.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пиво
являє собою світлий сорт пива.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пиво
являє собою лагерне пиво.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пиво
являє собою Північноамериканський сорт пива.
5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дрі-
жджі являють собою високофлокулентні або супе-
рфлокулентні дріжджі.
6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що бро-
діння являє собою головне бродіння.
7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що сус-
ло продувають діоксидом вуглецю перед бродін-
ням.
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що в
реакторі застосовують як газ, який розпилюють,
діоксид вуглецю, що містить приблизно 3 % кисню.
9. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що після
закінчення основного бродіння застосовують ста-
дію витримування партії.
10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що
концентрація вищих спиртів сивушних масел за-
лишається практично незмінною протягом стадії
обробки, яка полягає у витримуванні партії.
11. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що
продукт, одержаний після стадії безперервного
бродіння, переносять за допомогою системи тру-
бопроводів в один або кілька резервуарів для ви-
тримування сусла, в яких здійснюють процес ви-
тримування партій.
12. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що
безперервний процес являє собою процес для
одержання дріжджів, що призначені для подаль-
шого бродіння партії на стадії витримування партії.

Даний винахід відноситься до виробництва ал-
когольних напоїв, насамперед пива, і, зокрема, до
застосування комбінованого процесу, що включає

стадії безперервного та періодичного процесу
бродіння.

Велика кількість публікацій, що з'явилися в

(13) C2

(11) 84536

(19) UA

останні роки в даній області, свідчать про значний інтерес до методу іммобілізації в пивоварній промисловості. У цілому ряді оглядів [Enari, 1995; Iserentant, 1995; Masschelein, 1997; Mensour та ін., 1997; Stewart, 1996; Virkajarvi та Linko, 1999], присвячених загальному стану пивоварної промисловості, обговорювалася можлива революційна роль методу іммобілізації в області виробництва пива. Крім груп дослідників, перерахованих у розділах 3.1-3.5 даного опису, у дослідженні і розробці методів іммобілізації клітин для застосування в пивоварстві брали участь багато організацій. Компанія Miller Brewing [Duncombe та ін., 1996; Tata та ін., 1999] з США, провела ряд попередніх досліджень з використанням випробувальної установки Meura Delta, а також біореактора з псевдозрідженим шаром, який постачається фірмою Schott Engineering. Фірма Coors Brewing також провела попередні експерименти з використанням системи Meura Delta.

Словацький технічний університет разом з фірмою Heineken досліджували застосування кальційпектатного гелю в системі з аерацією (ерліфтній системі) для виробництва пива [Domeny, 1996]. В останні роки група дослідників із Словацького технічного університету опублікувала кілька статей, що стосуються проведеного ними дослідження [Smogrovicova та ін., 1997; Smogrovicova і Domeny, 1999]. Фірма Guinness вперше досліджувала застосування різних абсорбуючих носіїв для іммобілізації і наступного бродіння в біореакторі з псевдозрідженим шаром [Donnelly, 1998]. У 1999 році Donnelly із співробітниками опублікували статтю, у якій описана кінетика метаболізму цукру в біореакторі з псевдозрідженим шаром [Donnelly та ін., 1999]. У їхній експериментальній установці застосовували пористі скляні гранули типу Siran як носій для здійснення іммобілізації дріжджів верхнього бродіння. Фірма Guinness увійшла до складу Immoscon Consortium, що зазначено в розділі 2.2.5.

Фірма Holsten Brauerei AG та Lurgi AG, обидві з Німеччини, спільно розробили і запустили в роботу пілотну установку для безперервного виробництва безалкогольного пива [Dziondzia, 1995]. Для бродіння використовували гранули з альгілату кальцію, які знаходяться в одноконтурному ферментері з псевдозрідженим шаром (130л), при цьому для вилучення спирту з пива використовували колону із сітчастими піддонами (7 сітчастих піддонів). Загальний час одержання продукту за допомогою цього процесу становив 8,5 год.

Група з дослідницької лабораторії Sapporo Breweries Ltd. Brewing Research Laboratories, Японія, вивчала застосування іммобілізованих клітин для основного бродіння при виробництві пива в реакторі з псевдозрідженим шаром. При цих дослідженнях як матриці використовували гелеві гранули з полівінілового спирту [Shindo та Kamimur, 1990], Са-альгілатні гелеві гранули [Shindo та ін., 1994a], гелеві волокна з двошаровим покриттям [Shindo та ін., 1994b] і гелеві хітозанові гранули [Shindo та ін., 1994c]. В останньому дослідженні здійснювали безперервний процес бродіння суслу, обробленого глюкамілазою, у біореакторі з робочим об'ємом 1л, у якому знаходилося 25об.% гранул Chitopearl® тип II (хітозанові

гранули). При такій ферментній обробці в системі іммобілізованих клітин відбувається утворення ефіру ацетату, яке аналогічне його утворенню при загальноприйнятому періодичному процесі бродіння, що на одну стадію коротше при одержанні продукту відповідної якості.

В даний час дослідницька група з Sapporo сфокусувала свою увагу на розробці ферментера з псевдозрідженим шаром, у якому використовуються хітозанові гранули, який працює в періодичному режимі з підживленням. Ця система проробила протягом 75 днів без яких-небудь серйозних проблем і отримане пиво мало якість, аналогічну продукту, що надходить до продажу. Було встановлено, що нефлокулентний штам був істотно більш ефективним, ніж флокулентний штам [Maeba та ін., 2000; Umemoto та ін., 1998].

На конгресі ЕВС, що відбувся в Маастрихті в 1997, були представлені два інших підходи для відновлення діацетилю. Дослідники з Франції [Dulieu та ін., 1997] запропонували застосовувати інкапсульовану α -ацетолактатдекарбоксилазу для швидкого перетворення α -ацетолактату в ацетоїн. Фірма Meura Delta опублікувала попередні результати вивчення застосування алюмосилікату цеоліту як каталізатора для «холодного» і безпосереднього перетворення ацетолактату в ацетоїн [Andries та ін., 1997]. Якщо такі методи обробки виявляться ефективними і прийнятими для споживача, то більш дешеві альтернативні системи дозрівання, запропоновані фірмою Cultor та Alfa Laval, стануть реальними.

Інше дослідження, яке не має промислового значення, в області іммобілізації для цілей виробництва пива було проведено Сінгапурським інститутом стандартів і промислових досліджень (Singapore Institute of Standards and Industrial Research), у якому вивчали застосування нитковидних альгілатних гелевих часток у реакторі з псевдозрідженим шаром, при цьому було встановлено, що вони є більш кращими, ніж альгілатні гранули [Que, 1993]. Mafra із співробітниками з університету Universidade do Minho (Португалія) обговорювали застосування суперфлокулентного штаму дріжджів для безперервного процесу дозрівання пива [Mafra та ін., 1997]. Ця ж група дослідників опублікувала також роботу, у якій описане застосування створених ними флокулентних дріжджів в ерліфтному біореакторі для одержання етанолу [Vicente та ін., 1999; Domingues та ін., 2000].

В останні роки дослідники в різних академічних інститутах проводили вивчення застосування іммобілізації для виробництва пива [Argiriou та ін., 1996; Bardi та ін., 1996; Cashin, 1996; Moll і Duteurtre, 1996; Nedovic та ін., 1996a; Nedovic та ін., 1996b; Norton та ін., 1995; Scott та ін., 1995; Wackerbauer та ін., 1996a; Wackerbauer та ін., 1996b]. Група дослідників з Китаю [Chao та ін., 1990; Yuan, 1987; Zhang та ін., 1988], Росії [Kolpachki та ін., 1980; Sinitsyn та ін., 1986] і Чехословаччини [Chladek та ін., 1989; Curin та ін., 1987; Polednikova та ін., 1981] також розробляли технологію, засновану на використанні іммобілізованих клітин, і опублікували результати в 1980-х роках.

На початку досліджень, на яких оснований даний винахід, були розглянуті численні публікації.

Вони включають:

[Abbott B. J., Immobilized cells. In: Annual Reports on Fermentation Processes, під ред. Perlman D., New York: вид-во Academic Press, 2, 1978: c.91.

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

Anon. 1996. Table Curve 2D. User's Manual, JandelScientific.

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

Anon. 1998. Digox 5 Operating Manual. Dr. Theidigpublication.

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

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

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

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

Austin G.D., Watson R.W.J., Nordstrom P.A., D'Amore T. An on-line capacitance biomass monitor and its correlation with viable biomass. MBAA Technical Quarterly 31, 1994, c.85.

Axcell B.C., O'Connor-Cox E.S.C. The concept of yeast vitality - an alternative approach. Proceedings of Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Sect.). Singapore 24, 1996, c.64.

Axelsson A., Sisak C, Westrin B.A., Szajani B. Diffusion characteristics of a swelling gel and its consequences for bioreactor performance. The Chemical Engineering Journal 55, 1994, B35.

Bailey J.E., Ollis D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. New York: вид-во McGraw-Hill, Inc., 1986.

Bancel S., Hu W. Confocal laser scanning microscopy examination of cell distribution in macroporous microcarriers. Biotechnology Progress 12, 1996, c.398.

Barker M.G., Smart K.A. Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. Journal of the American Society of Brewing Chemists 54(2), 1996, c.121.

Bejar P., Casas C, Godia F., Sola C. 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, 1992, c.467.

Bickerstaff G.F. Immobilization of enzymes and cells. B: Immobilization of Enzymes and Cells, під ред. Bickerstaff G. F., New Jersey, U.S.A., вид-во Humana Press, Inc. 1, 1997.

Birnbaum S., Pendleton R., Larson P., Mosbach K. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of living whole cells. Biotechnology Letters 3, 1981, c.393.

Budac D., Margartis A. Personal communication,

1999.

Büyükgüngör H., Stability of Lactobacillus bulgaricus immobilized in kappa-carrageenan gels. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 53, 1992, c.173.

Chahal P.S. Fluorosensor controlled fed-batch production of Cyclosporin-A from Beauveria nivea. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario, 1992.

Chisti M.Y. Airlift bioreactors. Лондон, вид-во Elsevier Applied Science, 1989.

Chisti Y., Moo-Young M. Improve the performance of airlift reactors. Chemical Engineering Progress 6, 1993, c.38.

Cho G.H., Choi C.Y., Choi Y.D., Han M.H. Ethanol production by immobilised yeast and its carbon dioxide gas effects in a packed bed reactor. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 32, 1982, c.959.

Coutts M.W. Britain Patent No. 872391, 1956.

Curin J., Pardonova B., Polednikova M., Sedova H., Kahler M. Beer production with immobilized yeast. European Brewing Convention Congress, Madrid 433, 1987.

Dale C.J., Hough J.S., Young T.W. Fractionation of high and low molecular weight components from wort and beer by adsorption chromatography using the gel Sephadex LH20. Journal of the Institute of Brewing 92(5), 1986, c.457.

Daoud I.S., Searle B.A. Yeast vitality and fermentation performance. Monograph - XII European Brewery Convention - Symposium on Brewers' Yeast, Helsinki, 1986, c.108.

de Backer L., Willaert R.G., Baron G.V. Modelling of immobilized bioprocesses. B: Immobilized Living Cell Systems Modelling and Experimental Methods, під ред. Willaert R. G., Baron G. V. i de Backer L., Toronto: вид-во John Wiley and Sons, 1996, c.47.

de Beer D., Van den Heuvel J.C., Ottengraaf S.P.P. Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. Applied Environmental Microbiology 59, 1993, c.573.

Debourg A., Laurent M., Goossens E., Borremans E., Van De Winkel L., Masschelein CA. Wort aldehyde reduction potential in free and immobilized yeast systems. Journal of the American Society of Brewing Chemists 52, 1994, c.100.

Dillenhofer W., Ronn D. Secondary fermentation of beer with immobilized yeast. Brauwelt International 14, 1996, c.344.

Doran P.M., Bailey J.E. Effects of hydroxyurea on immobilized and suspended yeast fermentation rates and cell cycle operation. Biotechnology and Bioengineering 28, 1986a, c.1814.

Doran P.M., Bailey J.E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of Saccharomyces cerevisiae attached to gelatin. Biotechnology and Bioengineering 28, 1986b, c.73.

dos Santos V.A.P.M., Bruijnse M., Tramper J., Wijffels R.H. The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized micro-organisms. Applied Microbiology and Biotechnology 45, 1996, c.447.

Driessen W., Habets L., Vereijken T. Novel anaerobic and aerobic process to meet strict effluent plant design requirements. Proceedings of the

Institute of Brewing (Asia Pacific Section), Окленд 148, 1997.

Dulieu C, Boivin P., Dautzenberg H., Poncelet D. Immobilized enzyme system to avoid diacetyl formation: a new tool to accelerate beer maturation. International Workshop on Bioencapsulation, Потсдам 22, 1996.

Dunbar J., Campbell S.L., Banks D.J., Warren D.R. Metabolic aspects of a commercial continuous fermentation system. Proceedings of the Convention of the Institute of Brewing, Брисбан 151, 1988.

Estapé D., Godia F., Solá C. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. Enzyme and Microbial Technology 14, 1992, c.396.

Evans H.A.V., Cleary P. Direct Measurement of Yeast and Bacterial Viability.

Journal of the Institute of Brewing 91, 1985, c.73.

Fan L.-S. Gas-Liquid-Solid Fluidization Engineering. Бостон, вид-во Butterworths, 1989.

Fernandez E. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging. B: Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods. Торонто, вид-во John Wiley and Sons, розділ 6, 1996.

García A.I., García L.A., Díaz M. Prediction of ester production in industrial beer fermentation. Enzyme and Microbial Technology 16(1), 1994, c.66.

Geankoplis C.J. Transport Processes and Unit Operations. Нью-Джерсі, вид-во Prentice Hall P.T.R., 1993.

Gee D.A., Ramirez W.F. A flavour model for beer fermentation. Journal of the Institute of Brewing 100, 1994, c.321.

Geiger K.H., Compton J., канадський патент No. 545867, 1957.

Gekas V.C. Artificial membranes as carriers for the immobilization of biocatalysts. Enzyme and Microbial Technology 8, 1986, c.450.

Gift E.A., Park H.J., Paradis G.A., Demain A.L., Weaver J.C. FACS-based isolation of slowly growing cells: double encapsulation of yeast in gel microdrops. Nature Biotechnology 14, 1996, c.884.

Gikas P., Livingston A.G. Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. Biotechnology and Bioengineering 42, 1993, c.1337.

Gikas P., Livingston A.G. Viability of immobilised cells: use of specific ATP levels and oxygen uptake rates. Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications, Noordwijkerhout 11, 1996, c.264.

Gilson C.D., Thomas A. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 62, 1995, c.38.

Gódia F., Casa C., Castellano B., Solá C. Immobilized cells: behavior of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 26, 1987, c.342.

Gopal C.V., Hammond J.R.M. Application of immobilized yeasts for fermenting beer. Brewing and Distilling International 24, 1993, c.72.

Hannoun B.J.M., Stephanopoulos G. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. Biotechnology and Bioengineering 28, 1986, c.829.

Hardwick W.A. Handbook of Brewing. Нью-Йорк, вид-во Marcel Dekker, Inc., 1995.

Hayat M.A. Basic Electron Microscopy Techniques. Торонто, вид-во van Nostrand Reinhold Co., 1972, c.96.

Heijnen J.J., van Loosdrecht M.C.M., Mulder R., Weltevrede R., Mulder A. Development and scale-up of an aerobic biofilm air-lift suspension reactor. Water Science and Technology 27, 1993, c.253.

Higbie R. 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, 1935, c.365.

Hines A.L., Maddox R.N. Mass Transfer Fundamentals and Applications. США, вид-во Prentice-Hall, Inc., 1985.

Hinfray C., Jouenne T., Junter G. Ethanol production from glucose by free and agar-entrapped batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* at different oxygenation levels. Biotechnology Letters 16, 1994, c.1107.

Hoekstra S.F. Wort composition, a review of known and unknown facts. Proceedings of the European Brewery Convention, Ніцца, 1975, c.465.

Hooijmans C.M., Ras C., Luyben K.Ch.A.M. Determination of oxygen profiles in biocatalyst particles by means of a combined polarographic oxygen microsensor. Enzyme and Microbial Technology 12, 1990, c.178.

Hough J.S., Briggs D.E., Stevens R., Young T.W. Metabolism of wort by yeast. B: Malting and Brewing Science Volume 2 Hopped Wort and Beer, під ред. Hough J. S., Briggs D. E., Stevens R. і Young T. W., Лондон, Великобританія, вид-во Chapman and Hall., 1982, c.566.

Hüsken L.E., Tramper J., Wijffels R. Growth and eruption of gel-entrapped microcolonies. B: Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications, під ред. Wijffels R.H., Buitelaar R.M., Bucke C., Tramper J., Амстердам, вид-во Elsevier Science, 1996, c.336.

Hutter K.J. Flow-cytometric analyses for assessment of fermentative ability of various yeasts. Brauwelt International 1, 1996, c.52.

Hwang S.-J., Fan L.-S. Some design consideration of a draft tube gas-liquid-solid spouted bed. The Chemical Engineering Journal 33, 1986, c.49.

Imai T. Recent advances in the determination of yeast vitality. Proceedings of the Congress of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section), Сінгапур 24, 1996, c.60.

Inloes D.S., Taylor D.P., Cohen S.N., Michaels A.S., Robertson C.R. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. Applied and Environmental Microbiology 46, 1983, c.264.

Inoue T. Possibilities opened by "new biotechnology" and application of immobilized yeast to beer brewing. Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewery Co., Ltd., 1987, c.7.

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

Jepsen S. Using ALDC to speed up fermentation.

Brewers' Guardian., 1993, c.55.

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

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

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

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

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

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

Kasten F.H. Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications. B: Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, під ред. Mason W. T. Лондон, Великобританія, вид-во Academic Press Limited, 1993, c.12.

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

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

Kreger-Van Rij N. The Yeasts: A Taxonomic Study. Амстердам, вид-во Elsevier Science Publishers B.V., 1984.

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

Kunze W. Technology Brewing and Malting. Берлін, вид-во VLB, 1996.

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

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

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

Kurtzman C.P., Fell J.W. The Yeasts, A Taxonomic Study, 2-е вид., Амстердам, вид-во Elsevier, 1998, c.361.

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

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

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

Lentini A., Takis S., Hawthorne D.B., Kavanagh T.E. The influence of trub on fermentation and flavour development. *Proceedings of the 23 Convention of the Institute of Brewing (Asia Pacific Section)*, Сідней, 1994, 89.

Leudeking R. Fermentation process kinetics, y. Biochemical and Biological Engineering, під ред. Blakebrough N., Лондон, вид-во Academic Press, Inc., 1967, c.203.

Leudeking R., Piret E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. *Journal of Biochemical and Microbial Technology and Engineering* 1, 1959, c.393.

Lewandowski Z., Altobelli A., Fukushima E. NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnology Progress* 9, 1993, c.40.

Lewandowski Z., Stoodley P., Altobelli S. Experimental and conceptual studies on mass transport in biofilms. *Water Science Technology* 31, 1995, c.153.

Lewis M., Young T. Brewing. Лондон, вид-во Chapman and Hall, 1995.

Li J., Humphrey A.E. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 1991, c.1043.

Lim H.-S., Han B.-K., Kim J.-H., Peshwa M.V., Hu W.-S. Spatial distribution of mammalian cells grown on macroporous microcarriers with improved attachment kinetics. *Biotechnology Progress* 8, 1992, c.486.

Linko M., Virkajarvi I., Pohjala N. Effect of flocculation characteristics on immobilized yeast performance. *European Brewery Convention Brewing Science Group*, Берлін, 1996, c.102.

Lloyd D., Moran C.A., Suller M.T.E., Dinsdale M.G. Flow cytometric monitoring of rhodamine 123 and a cyanine dye uptake by yeast during cider fermentation. *Journal of Institute of Brewing* 102, 1996, c.251.

Lundberg P., Kuchel P.W. Diffusion of solutes in agarose and alginate gels: ^1H and ^{23}Na PFGSE and ^{23}Na TQF NMR studies. *Magnetic Resonance in Medicine* 37, 1997, c.44.

Margaritis A., te Bokkel D.W., El Kashab M. Repeated batch fermentation of ethanol using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a fluidized bioreactor system. B: Biological Research on Industrial Yeasts, під ред. Stewart G.G., Russell I., Klein R.D., Hiebsch R.R., Боку Ратон, вид-во CRC Press, 1987, c.121.

Margaritis A., Wallace J.B. The use of immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in a novel fluidized bioreactor to produce ethanol. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 1982, c.147.

Margaritis A., Wilke C.R. The rotorfermentor. Part 1: description of the apparatus, power requirements, and mass transfer characteristics. *Biotechnology and Bioengineering* 20, 1978a, c.709.

Margaritis A., Wilke C.R. The rotorfermentor. Part II: application to ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 20, 1978b, c.727.

Marrs W.M. The stability of carrageenans to processing. B: Gums and Stabilizers for the Food Industry 9, Кембрідж, вид-во Royal Society of Chemistry, 218, 1998, c.345.

Martens F.B., Egberts G.T.C., Kempers J., Robles de Medina M.H.L., Welton H.G. European Brewing Convention Monograph XII, Symposium on Brewing Yeast, Хельсінкі, 1986, c.339.

Masschelein C.A. Yeast metabolism and beer flavour. Proceedings of the Third Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling, 1990, c.103.

Masschelein C.A., Carlier A., Ramos-Jeunehomme C., Abe I. The effect of immobilization on yeast physiology and beer quality in continuous and discontinuous systems. Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress, Хельсінкі, 1985, c.339.

Masschelein C.A., Ramos-Jeunehomme C. 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, Йоганесбург, 1985, c.392.

Masschelein C.A., Vandenbussche J. Current outlook and future perspectives for immobilized yeast technology in the brewing industry. *Brewers' Guardian* 28(4), 1999, c.35.

Masters B.R., Thaer A.A. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Applied Optics* 33, 1994, c.695.

Meilgaard M. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition, *Brygmesteren*, 1982, c.5.

Mensour N., Margaritis A., Briens C.L., Pilkington H., Russell I. Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. B: Progress in Biotechnology 11, Immobilized Cells: Basics and Applications під ред. Wijffels R.H., Buitelaar R.M., Виске С, Tramper J., Амстердам, вид-во Elsevier Science, 1996, c.661.

Mensour N., Margaritis A., Briens C.L., Pilkington H., Russell I. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing* 103, 1997, c.363.

Merchant F.J.A. Diffusivity Characteristics of Glucose in Alginate Immobilization Matrices. Докторська дисертація. Університет Західного Онтаріо (University of Western Ontario), 1986.

Merchant F.J.A., Margaritis A., Wallace J.B. A novel technique for measuring solute diffusivities in entrapment matrices used in immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 30, 1987, c.936.

Mochaba F.M. A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. *Journal of the Institute of Brewing* 103, 1997, c.99.

Mochaba F., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C. Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 56(1), 1998, c.1.

Muhr A.H., Blanshard J.M.V. Diffusion in gels. *Polymer* 23, 1982, c.1012.

Mulder M.H.V., Smolders C.A. Continuous ethanol production controlled by membrane processes. *Process Biochemistry* 21, 1986, c.35.

Nakanishi K., Murayama H., Nagara A., Mitsui S. Beer brewing using an immobilized yeast bioreactor system. *Bioprocess Technology* 16, 1993, c.275.

Nakanishi K., Onaka T., Inoue T. A new immobilized yeast reactor system for rapid production of beer. Reports of the Research Laboratory of Kirin Brewing Company, 1986, c.13.

Nakatani K., Takahashi T., Nagami K., Kumada J. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (I) formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(2), 1984a, c.73.

Nakatani K., Takahashi T., Nagami K., Kumada J. Kinetic study of vicinal diketones in brewing (II) theoretical aspect for the formation of total vicinal diketones. *MBAA Technical Quarterly* 21(4), 1984b, c.175.

Nakatani K., Fukui N., Nagami K., Nishigaki M. Kinetic analysis of ester formation during beer fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49(4), 1991, c.152.

Narziß L., Miedaner H., Graf P., Eichhorn P., Lustig S. Technological approach to improve flavour stability. *MBAA Technical Quarterly* 30, 1993, c.48.

Nava Saucedo J.E., Roisin C., Barbotin J.-N. Complexity and heterogeneity of microenvironments in immobilized systems. *Progress in Biotechnology* 11, Immobilized Cells: Basics and Applications, Noordwijkerhout, 1996, c.39.

Nedovic A.N., Vunjak-Novakovic G., Leskosek-Cukalovic I., Cutkovic M. 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, 1996, c.474.

Neufeld R. J., Poncelet D. J., Norton S.D. Application for Canadian Patent No. 2133789, 1996.

Norton S., D'Amore T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 1994, c.365.

Norton S., Watson K., D'Amore T. Ethanol tolerance of immobilized brewer's yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 1995, c.18.

O'Connor-Cox E., Mochaba F.M., Lodolo E.J., Majara M., Axcell B. Methylene blue staining: use at your own risk. *MBAA Technical Quarterly* 34(1), 1997, c.306.

O'Reilly A.M., Scott J.A. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 1995, c.636.

Okazaki M., Hamada T., Fujii H., Mizobe A., Matsuzawa S. 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, 1995, c.2235.

Oldshue J.Y., Herbst N.R. A Guide to Fluid Mixing. Нью-Йорк, вид-во Lightrnin, 1992.

Opekarova M., Sigler K. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae* (yeast). *Folia Microbiologia* 27, 1982, c.395.

Øyaas J., Storro I., Svendsen H., Levine D.W. The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 47, 1995, c.492.

Paiva T.C.B., Sato S., Visconti A.E.S., Castro L.A.B. Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58(0), 1996, c.55.

Pajunen E., Makinen V., Gisler R. Secondary fermentation with immobilized yeast. *European Brewery Convention Congress*, Мадрид, 1987, c.441.

Parascandola P., de Alteriis E. 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, 1996, c.7.

Perry R.H., Green D.W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. Нью-Йорк, вид-во McGraw-Hill Book Company, 1984.

Pilkington P.H., Margaritis A., Mensour N.A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology* 18(2 i 3), 1998a, c.237.

Pilkington P.H., Margaritis A., Mensour N.A., Russell I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 104, 1998b, c.19.

Pilkington H., Margaritis A., Mensour N., Sobczak J., Hancock L., Russell I. Kappa-carrageenan gel immobilization of lager brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 105(6), 1999, c.398.

Poison A. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *Journal of Physical and Colloidal Chemistry* 54, 1950, c.649.

Power D.A., McCuen P.J. *Manual of BBL® Products and Laboratory Procedures*, 6-е вид. Maryland: Becton Dickinson Microbiology Systems 249, 1988.

Priest F.G., Campbell I. *Brewing Microbiology* 2-е вид., Великобритания, вид-во Chapman and Hall, 1996.

Rees D. A. Polysaccharide gels: a molecular view. *Chemistry and Industry* 19, 1972, c.630.

Roca E., Camesselle C., Nunez M. Continuous ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilised in Ca-alginate beads hardened with Al^{3+} . *Biotechnology Letters* 9, 1995, c.815.

Roukas T. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59, 1994, c.387.

Russell I., Stewart G.G. Contribution of yeast and immobilization technology to flavour development in fermented beverages. *Food Technology*, 1992, c.148.

Ryder D.S. The growth process of brewing yeast and the biotechnological challenge. *MBAA Technical Quarterly* 22, 1985, c.124.

Ryu D.D., Kim Y.J., Kim J.H. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering* 26, 1984, c.12.

Salmon P.M., Robertson C.R. Mass transfer limitations in gel beads containing growing immobilized cells. *Journal of Theoretical Biology* 125, 1987, c.325.

Schumpe A., Quicker G., Deckwer W.-D. Gas solubilities in microbial culture media. *Advances in Biochemical Engineering* 24, 1982, c.1.

Shindo S., Sahara H., Koshino S. Suppression of alpha-acetolactate formation in brewing with immobilized yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 100, 1994, c.69.

Smart K.A. The importance of the brewing yeast cell wall. *Brewers' Guardian* 124(4), 1995, c.44.

Smart K.A. Ageing in brewing yeast. *Brewers' Guardian*, 1999, c.19.

Smart K.A., Chambers K.M., Lambert I., Jenkins C. Use of methylene violet procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57(1), 1999, c.18.

Sharpe F.R. Assessment and control of beer flavour. *Journal of the Institute of Brewing* 95, 1988, c.301.

Stewart G.G. Fermentation - yesterday, today and tomorrow. *MBAA Technical Quarterly* 14, 1977, c.1.

Stewart G.G., Russell I. The relevance of the flocculation properties of yeast in today's brewing industry. *European Brewery Convention Symposium on Brewers' Yeast*, Хельсінкі, 1986, c. 53.

Stewart G.G., Lyness A., Younis O. The control of ester synthesis during wort fermentation. *MBAA Technical Quarterly* 36(1), 1999, c.61.

Takahashi S. i Kimura Y. Effect of main fermentation parameters on stale flavour. *Brauwelt International* 14 (3), 1996, c.253.

Taylor D.G. Influence of brewhouse practice on wort composition. *Brewer's Guardian* 118(2), 1989, c.30.

Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists (ASBC). *Methods of Analysis*. 8-е вид., Міннесота, вид-во ASBC, 1992.

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

Venancio A., Teixeira J.A. Characterization of sugar diffusion coefficients in alginate membranes. *Biotechnology Techniques* 11, 1997, c.183.

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

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

Vives C., Casas C., Gòdia F., Solà C. 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, 1993, c.467.

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

Wang H.Y., Lee S.S., Takach Y., Cawthon L. Maximizing microbial cell loading in immobilized-cell systems. *Biotechnology and Bioengineering Symp.* No. 12, 1982, c.139.

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

Wheatcroft R., Lim Y.M., Hawthorne D.B., Clarke

B.J., Kavanagh T.E. An assessment of the use of specific oxygen uptake measurements to predict the fermentation performance of brewing yeasts. The Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section) Proceedings of the Twentieth Convention, Брінсбан, 1988, с.193.

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

Wijffels R.H., de Gooijer C.D., Schepers A.W., Tramper J. Immobilized-cell growth: diffusion limitation in expanding micro-colonies. B: Progress in Biotechnology II, Immobilized Cells: Basics and Applications, під ред. Wijffels R.H., Buitelaar R.M., Виске С., Tramper J., Амстердам, вид-во Elsevier Science, 1996, с.249.

Wijffels R.H., Englund G., Hunik J.H., Leenen J.T.M., Bakketun A. i ін. Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying microorganisms at low temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* 45, 1995, с.1.

Aivasidis A., Another Look at Immobilized Yeast Systems. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 1996, с.27.

Aivasidis A., Wandrey C., Eils H.-G. i Katzke, M., Continuous Fermentation of Alcohol-Free Beer with Immobilized Yeast in Fluidized Bed Reactors. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Лісабон, 1991, с.569.

Akiyama-Jibiki M., Ishibiki T., Yamashita H. i Eto M., A Rapid and Simple Assay to Measure Flocculation in Brewer's Yeast. *Master Brewers of the Americas Technical Quarterly*, 34, 1997, с.278.

Alfa Laval Brewery Systems, Immobilized Yeast System Reduces Maturation Time. *Brewers' Guardian*, 126, 1997, с.26.

Alfa Laval Brewery Systems, Continuous Maturation of Beer with Immobilized Yeast, Company Report, 1996.

Al Taweel A.M. i Walker L.D. Liquid Dispersion in Static In-line Mixers. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 61, 1983, с.527.

Andries M., Derdelinckx G., Ione K.G., Delvaux F., van Beveren P.C. i Masschelein CA., Zeolites as Catalysts for the Cold and Direct Conversion of Acetolactate into Acetoin. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Маастріхт, 1997a, постер 48.

Andries M., Van Beveren P.C., Goffin O. i Masschelein CA. 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, Еспо, Фінляндія, 1995, с.134.

Andries M., Van Beveren P.C., Goffin O. i Masschelein CA., Design and Application of an Immobilized Loop Bioreactor for Continuous Beer Fermentation, у Immobilized Cells: Basics and Applications, (під ред. R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke i J. Tramper.), Амстердам, вид-во Elsevier Science, 1996a., с.672.

Andries M., Van Beveren P.C., Goffin O., Rajotte P. I Masschelein CA., Design and Applications of an Immobilized Loop Bioreactor to the Continuous Fermentation of Beer. Proceedings of the 6th

International Brewing Technology Conference, Харпорат, 1996b, с.380.

Andries, M., Van Beveren, P.C., Goffin, O., Rajotte, P. & Masschelein, C.A., 1997b. Practical Results Using the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentation System. *Brewers' Guardian*, 26.

Andries M., Van Beveren P.C., Goffin O., Rajotte P. i Masschelein CA., First Results on Semi-Industrial Continuous Fermentation with the Meura-Delta Immobilized Yeast Fermentor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 34, 1997c, с.119.

Argiriou T., Kanellaki M., Voliotis S. i Koutinas A.A., Kissiris-Supported Yeast Cells: High Biocatalytic Stability and Productivity Improvement by Successive Preservatives at 0°C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1996, с.4028.

Audet P. i Lacroix C., Two Phase Dispersion Process for the Production of Biopolymer Gel Beads: Effects of Barious Parameters on Bead Size and their Distribution. *Process Biochemistry*, 24, 1989, с.217.

Axelsson A. i Persson B., Detemination of Effective Diffusion Coefficients in Calcium Alginate Gel Plates with Varying Yeast Cell Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 18, 1988, с.231.

Bardi E.P., Koutinas A.A., Soupioni M.J. i Kanellaki M.E., Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperature Brewing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1996, с.463.

Berkman P. D. i Calabrese R. V., Dispersion of Viscous Liquids by Turbulent Flow in a Static Mixer. *American Institute of Chemical Engineering Journal*. 34, 1988, с.602.

Borremans E., Secondary Fermentation of Beer with Immobilized Yeast. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 1997, с.33.

Bower J.L. i Christensen C.M., Disruptive Technologies: Catching the Wave. *Harvard Business Review*, 73, 1995, с.43.

Breitenbucher K. i Mistier M., 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, Эспо, Фінляндія, 1995, с.77.

Brewers Association of Canada, About Beer And The Brewing Industry, Оттава, провінція Онтаріо, 1988.

Broderick Harold M., The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry, 2-е вид., вид-во Impressions Inc., Вісконсин, 1979.

Burns J.A., *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 1937, с.31.

Calleja G.B. i Johnson B.F., A Comparison of Quantitative Methods for Measuring Yeast Flocculation. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 1977, с.68.

Carberry J.J., Chemical and Catalytic Reaction Engineering, вид-во McGraw-Hill, 1976.

Carberry J.J. i Varma A., Chemical Reaction and Reactor Engineering, вид-во Marcel Dekker Inc., Нью-Йорк, 1987.

Cashin M.-M., Comparative Studies of Five Porous Supports for Yeast Immobilization by Adsorption/Attachment. *Journal of the Institute of*

Brewing, 102, 1996, c.5.

Champagne C.P., Overview: Immobilized Cell Technology in Food Processing. Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV, Квебек, Канада, 1994, c.33.

Chang C.M., Lu W.J., Own K.S. i Hwang, S.J., Comparison of Airlift and Stirred Tank Reactors for Immobilized Enzyme Reactions. *Process Biochemistry*, 29, 1994, c.133.

Chao X., Ye G. i Shi S., Kinetic Study of the Continuous Fermentative Process of Green Beer Production with Immobilized Yeast. *Huagong Jixie*, 17, 1990, c.18.

Chibata I., Immobilized Microbial cells with Polyacrylamide Gel and carrageenan and their Industrial Applications. *American Chemical Society Series*, 106, 1979, c.187.

Chisti M.Y., *Airlift Bioreactors*, вид-во Elsevier Applied Science, Нью-Йорк, 1991.

Chisti Y. i Moo-Young M., Improve the Performance of Airlift Reactors. *Chemical Engineering Progress*, 6, 1993, c.38.

Chladek L., Voborsky J., Sima J. i Hosek Z., *Prumysl Potravin*, 40, 1989, c.590.

Coe H.S. i Clevenger G.H., Methods for Determining the Capacities of Slime Thickening Tanks. *Transcript of the American Institute of Mechanical Engineering*, 55, 1916, c.356.

Curin J., Pardonova B., Polednikova M., Sedova H. i Kahler M., Beer Production with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention*, Мадрид, 1987, c.433.

Decamps C. i Norton S., New Emulsion Process using Static Mixer for the Production of κ -carrageenan Gel Beads. *Labatt Breweries of Canada Internal Report*, 1994.

Del Pozo M., Briens C.L. i Wild G., Effect of Liquid Coalescing Properties on Mass Transfer, Heat Transfer and Hydrodynamics in a Three-Phase Fluidized Bed. *The Chemical Engineering Journal* 55, 1994, c.1.

Dillenhofer W. i Ronn D., Alfa Laval/Schott System of Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *Brewing & Distilling International*, 27, 1996a, c.35.

Dillenhofer W. i Rom D., Secondary Fermentation of Beer With Immobilized Yeast. *Brauwelt International*, 14, 1996b, c.344.

Dillenhofer W. i Ronn D., Continuous Maturation of Beer. *Beverage World International*, 1996y, c.34.

Domeny Z., Smogrovicova D., Gemeiner P., Malovikova A. i Sturdik E., Calcium Pectate Gel to Immobilize Yeast for Continuous Beer Production. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group V*, Потсдам, Німеччина, 1996, постер 12.

Domingues L., Lima N. i Teixeira J.A., Contamination of a High-Cell-Density Continuous Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 2000, c.584.

Donnelly D., Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers Association of the Americas Annual Convention*, Мінеаполіс, 1998, постер 8.

Donnelly D., Bergin J., Gardiner S. i Cahill G., Kinetics of Sugar Metabolism in a Fluidized Bed Bioreactor for Beer Production. *Master Brewers*

Association of the Americas Technical Quarterly, 36, 1998, c.183.

Dulieu C., Boivin P., Malanda M., Dautzenberg H. i Poncelet D., Encapsulation of α -Acetolactate Decarboxylase to Avoid Diacetyl Formation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Маастріхт, 1997, постер 44.

Duncombe D., Bower P., Bromberg S., Fehring J., Lau V. i Tata M., The Contribution of Free Cells in an Immobilized Yeast System. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1996, презентація у вигляді постера.

Dziondziak K. i Seiffert T., Process for the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Брюссель, 1995, c.301.

Enari T.-M., State of the Art of Brewing Research. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Брюссель, 1995, c.1.

Fix G., *Principles of Brewing Science*. Brewers Publications, USA, 1989.

Fouhy K. i Parkinson G., Brewers Break with Tradition. *Chemical Engineering*, 103, 1996, c.45.

Gil G.H., Continuous Ethanol Production in a Two-Stage, Immobilized and Suspended Cell Bioreactor (Alcohol Dehydrogenase). Докторська дисертація, Технологічний інститут Джорджії (Georgia Institute of Technology), 1991.

Gilliland R.B., The Flocculation Characteristics of Brewing Yeasts During Fermentation. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 8, 1951, c.35.

Groboillot A., D.K. Boadi D. Poncelet i Neufeld R.J., Immobilization of Cells for Application in the Food Industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 1994, c.75.

Haikara A., Virkajarvi I., Kronlof J. i Pajunen E., Microbial Contaminations in Immobilized Yeast Bioreactors for Primary Fermentations. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 1997, c.439.

Heggart H.M., Margaritis A., Pilkington H., Stewart R.J., Dowhanick T.M. i Russell I., Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 1999, c.383.

Heijnen JJ., Mulder A., Enger W. i Hoeks F., Review on the Application of Anaerobic Fluidized Bed Reactors in Waste-Water Treatment. *The Chemical Engineering Journal*, 41, 1989, B 37.

Heijnen JJ., Mulder A., Weltevrede R., Hols J. i van Leeuwen H.L.J.M., Large Scale Anaerobic-Aerobic Treatment of Complex Industrial Waste-Water Using Biofilm Reactors. *Water Science Technology*, 23, 1991, c.1427.

Heijnen JJ., Van Loosdrecht M.C.M., Mulder R.W.R. i Mulder A., Development and Scale-Up of an Aerobic Biofilm Air-Lift Suspension Reactor. *Water Science Technology*, 27, 1993, c.253.

Helm E., Nohr B. i Thorne R.S.W., The Measurement of Yeast Flocculence and its Significance in Brewing. *Wallerstein Laboratories Communications*, 16, 1953, c.315.

Horitsu H., Wang M.Y. i Kawai K., A Modified Process for Soy Sauce Fermentation by Immobilized Yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1991, c.269.

Hryclik Kevin, Gerry Ginter, Jim Helmke i Jim Spiers, The How's And Why's of Brewing, Revision #2, LBOC, 1987.

Hunik J.H., Tramper J. i Wijffels R.H., A Strategy to Scale Up Nitrification Processes with Immobilized Cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering*, 11, 1994, c.73.

Hwang S.-J. i Fan L.-S., Some Design Considerations of a Draft Tube Gas-Liquid-Solid Spouted Bed. *The Chemical Engineering Journal*, 33, 1986, c.49.

Hyttinen L., Kronlof J. i Hartwall P., 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*, Еспо, Фінляндія, 1995, c.55.

Ibrahim Y.A.A., Briens C.L., Margaritis A. i Bergougnou M.A., Hydrodynamic Characteristics of a Three-Phase Inverse Fluidized Bed Column. *Journal of the American Institute of Chemical Engineering*, 42, 1996, c.1889.

Inoue T., Development of a Two-Stage Immobilized Yeast Fermentation System for Continuous Beer Brewing. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Брюссель, 1995, c.25.

Iserentant D., Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. *Fermented Beverage Production*, (під ред. A.G.H. Lea i J.R. Piggott) Лондон, вид-во Chapman & Hall, 1995, c.45.

Kaplan R.S. i Norton D.P., The Balanced Scorecard. *President and Fellows of Harvard College*, вид-во Harvard Business School Press, Масачусетс, США, 1996.

Karamanev D.G., Nagamune T. i Endo I., Hydrodynamic and Mass Transfer Study of a Gas-Liquid-Solid Draft Tube Spouted Bed Bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 47, 1992, c.3581.

Karel S.F., Libicki S.B. i Robertson C.R., The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. *Chemical Engineering Science*, 40, 1985, c.1321.

Katzbauer B., Narodoslawsky M. i Moser A., Classification System for Immobilization Techniques. *Bioprocess Engineering*, 12, 1995, c.173.

Kennard M. i Janekeh M., Two- and Three-Phase Mixing in a Concentric Draft Tube Gas-Lift Fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1991, c.1261.

Kolot F.B., Immobilized Microbial Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications, вид-во Robert E. Krieger Publishing Company, Флоріда, 1988.

Kolpachki A.P., Isaeva V.S., Kazantsev E.N. i Fertman G.I., Intensification of Wort Fermentation with Immobilized Yeasts. *Fermentnaya i Spirtovaya Promyshlennost*, 1980, c.9.

Krikilion Ph., Andries M., Goffin O., van Beveren P.C. i Masschelein C.A., Optimal Matrix and Reactor Design for High Gravity Fermentation with Immobilized Yeast. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Брюссель, 1995, c.419.

Kronlof J., Immobilized Yeast in Continuous Fermentation of Beer, докторська дисертація, VTT Publications, 1994, c.167.

Kronlof J., Linko M. i Pajunen E., Primary

Fermentation with a Two-Stage Packed Bed System Pilot Scale Experiences. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry*, Еспо, Фінляндія, 1995, c.118.

Kronlof J. i Virkajarvi I., Main Fermentation with Immobilized Yeast - Pilot Scale *European Brewery Convention Brewing Science Group Bulletin*, Zoeterwoude, 1996, c.94.

Kronlof J., Virkajarvi I., Storgards E.L., Londesborough J. i Dymond G., Combined Primary and Secondary Fermentation with Immobilized Yeast. *World Brewing Congress*, 2000, постер №56.

Ku W.Y., Fermentation Kinetics for the Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells (Biomass). Докторська дисертація, The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 1982.

Kunze W., Technology Brewing and Malting. Вид-во VLB, Берлін, Німеччина, 1999. Kynch G.J., *Transcripts of the Faraday Society*, 48, 1952, c.166.

Lacroix C., Paquin C. i Arnaud J.P., Batch Fermentation with Entrapped Growing Cells of *Lactobacillus casei*: Optimization of the Rheological Properties of the Entrapment Gel Matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 1990, c.403.

Levenspiel O., *Chemical Reaction Engineering*, вид-во John Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1972.

Linko M., Virkajarvi I., Pohjala N., Lindborg K., Kronlof J. i Pajunen E., Main Fermentation with Immobilized Yeast - A Breakthrough? *Proceedings of the European Brewery Convention*, Маастріхт, 1997, c.385.

Livingston A.G. i Chase H.A., Liquid-Solid Mass Transfer in a Three Phase Draft Tube Fluidized Bed Reactor. *Chemical Engineering Communications*, 92, 1990, c.225.

Livingston A.G. i Zhang S.F., Hydrodynamic Behaviour of Three-Phase (Gas-Liquid-Solid) Airlift Reactors. *Chemical Engineering Science*, 48, 1993, c.1641.

Lommi H., Immobilized Yeast for Maturation and Alcohol-Free Beer. *Brewing and Distilling International*, 21, 1990, c.23.

Lommi H., Gronqvist A. i Pajunen E., Immobilized Yeast Reactor Speeds Beer Production. *Food Technology*, 5, 1990, c.128.

Lorenzen K., Immobilized Yeast Plants for Alcohol-Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention*, Сінгапур, 1996, c.244.

Maeba H., Umemoto S., Sato M. i Shinotsuka K., 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*, 2000, c.82.

Mafra L., Machado Cruz J.M. i Teixeira J.A., Beer Maturation in a Continuously Operating Bioreactor using a Flocculating Brewer's Yeast Strain. *Proceedings of the European Brewery Convention*, 1997, c.509.

Maiorella B.L., Fermentative Ethanol Production (Alcohol, Distillation, Economics). Докторська дисертація, Каліфорнійський університет, Берклі, 1983.

Margaritis A., A Study of the Rotorfermentor and the Kinetics of Ethanol Fermentation. Докторська

дисертація, Каліфорнійський університет, Берклі, 1975.

Margaritis A. i Bajpai P., Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part I. Use of Free Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1982a, c.1473.

Margaritis A. i Bajpai P., Continuous Ethanol Production from Jerusalem Artichoke Tubers, Part II. Use of Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1982b, c.1483.

Margaritis A. i Merchant F., Advances in Ethanol Production Using Immobilized Cell Systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1, 1984, c.339.

Margaritis A. i Rowe G.E., Ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* Immobilized in Different Carrageenan Gels. *Developments in Industrial Microbiology*, 24, 1983, c.329.

Margaritis A., te Bokkel D. i El Kashab M., Repeated Batch Fermentation of Ethanol Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a Fluidized Bioreactor System. *Biological Research on Industrial Yeasts*, том I (під ред. G.G. Stewart, I. Russell, R.D. Klein i R.R. Hiebsch), Боку Ратон, вид-во CRC Press, 1987, c.121.

Margaritis A. i Wallace J.B., 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*, Гатлінбург, Теннесі, 12, 1982, c.147.

Margaritis A. i Wallace J.B., Novel Bioreactor Systems and their Applications. *Bio/Technology*, 2, 1984, c.447.

Margaritis A. Wilke CR., The Rotorfermentor. Part I: Description of the Apparatus, Power Requirements, and Mass Transfer Characteristics. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 1978a, c.709.

Margaritis A. i Wilke CR., The Rotorfermentor: Part II: Application to Ethanol Fermentation. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 1978b, c.727.

Masschelein C.A., A Realistic View on the Role of Research in the Brewing Industry Today. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 1997, c.103.

Masschelein C.A., State-of-the-Art and Future Developments in Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 1994, c.1.

Masschelein C.A. i Andries M., The Meura-Delta Immobilised Yeast Fermenter for the Continuous Production of Beer. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21, 1996a, c.28.

Masschelein C.A. i Andries M., Meura-Delta's Immobilized Yeast Fermenter for Continuous Beer Production. *Brewing & Distilling International*, 27, 1996b, c.16.

Masschelein C.A., Andries M., Franken F., Van de Winkel L. i Van Beveren P.C., 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, 1995, c.377.

Masschelein C.A., Ryder D.S. i Simon J-P., Immobilized Cell Technology in Beer Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 1994, c.155.

Matsuura K., Hirotsune M., Nakada F. i Hamachi

M., A Kinetic Study on Continuous Sake Fermentation. *Hakkokogaku Kaishi*, 69, 1991, c.345.

McCabe J.T., The Practical Brewer: A Manual for the Brewing Industry. Master Brewers Association of the Americas, USA, 1999.

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. i Russell, I., Application of Immobilized Yeast Cells in the Brewing Industry. *Immobilized Cells: Basics and Applications*. (під ред. R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke i J. Tramper) Амстердам, вид-во Elsevier Science, 1996, c.661.

Mensour N., Margaritis A., Briens C.L., Pilkington H. i Russell I., Gas Lift Systems for Immobilized Cell Fermentation. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry*, Еспо, Фінляндія, 1995, c.125.

Mensour N., Margaritis A., Russell I., Briens C.L., Decamps C. i Norton S., Beer Production with Immobilized Yeast Cells in a Pilot Plant Scale Airlift Reactor. *Proceedings of the Bioencapsulation Research Group IV*, Квебек, Канада, 1994, c.49.

Middleman S., Drop Size Distributions Produced by Turbulent Pipe Flow of Immiscible Fluids Through a Static Mixer. *Industrial Engineering and Chemical Process Design and Development*, 13, 1974, c.78.

Mieth H.O., Immobilized Yeast Plants for Alcohol Free Beer Production and Rapid Maturation. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention*, Victoria Falls, 1995, c.166.

Mistier M., Breitenbücher K. i Jaeger R., Continuous Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Porous Glass Carriers. *Brewers Digest*, 70, 1995, c.48.

Moll M. i Duteurtre B., Fermentation and Maturation of Beer with Immobilized Microorganisms. *Brauwelt International*, 3, 1996, c.248.

Motai H., Hamada T. i Fukushima Y., Application of a Bioreactor System to Soy Sauce Production, in *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (під ред. A. Tanaka, T. Tosa i T. Kobayashi), Нью-Йорк, вид-во Marcel Dekker, 1993, c.315.

Muhr A.H. i Blanchard M.V., Diffusion in Gels. *Polymer*, 23, 1982, c.1012.

Mwesigye P.K. i Barford J.P., Transport of Sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 11, 1994, c.687.

Nakanishi K., Murayama H., Nagara A. i Mitsui S., Beer Brewing Using an Immobilized Yeast Bioreactor System. B: *Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts*. (під ред. A. Tanaka, T. Tosa i T. Kobayashi), Нью-Йорк, вид-во Marcel Dekker, 1993, c.275.

Nakanishi K., Onaka T., Inoue T. i Kubo S., A New Immobilized Yeast Reactor System for Rapid Production of Beer. *Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress*, Хельсінкі, 1985, c.331.

Nakatani K., Takahashi T., Nagami K. i Kumada J., Kinetic Study of Vicinal Diketones in Brewing (I) Formation of Total Vicinal Diketones. Master Brewers Association of the Americas Technical Committee,

21, 1984, c.73.

Nedovic V.A., Leskosek-Cukalovic I. i Vunjak-Novaki G., Short-Time Fermentation of Beer in an Immobilization Yeast Air-Lift Bioreactor. Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Singapore, 1996a, c.244.

Nedovic V.A., Vunjak-Novakovic G., Leskosek-Cukalovic I. i Cutkovic M., 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, 1996b, c.474.

Neufeld R.J., Norton S. i Poncelet D.J.C.M., Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. Заявка на канадський патент 2133789, 1994.

Nguyen A.L. i Luong J.H.T., Diffusion in k-Carrageenan Gel Beads. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1986, c.1261.

Nielsen J. i Villadsen J., Bioreactor Modeling. Bioreaction Engineering Principles, вид-во Plenum Press, Нью-Йорк, 1994, c.9.

Norton S. i D'Amore T., Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing. Enzyme and Microbial Technology, 16, 1994, c.365.

Norton S., Neufeld R.J. i Poncelet D.J.C.M., Immobilized-Cell Carrageenan Bead Production and a Brewing Process Utilizing Carrageenan Bead Immobilized Yeast Cells. Заявка на канадський патент 2133789, 1994.

Norton S., Mensour N., Margaritis A., Briens C.L., Decamps C. i Russell I., Pilot Scale Primary Fermentation of Beer with a Gaslift Immobilized Yeast Reactor. Proceedings of the European Brewing Convention, Sub-Committee, Дублін, 1994.

Norton S., Watson K. i D'Amore T., Ethanol Tolerance of Immobilized Brewers' Yeast Cells. Applied Microbiology & Biotechnology, 43, 1995, c.18.

Nothaft A., The Start-Up of an Immobilized Yeast System for Secondary Fermentation at Brahma. European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Еспо, Фінляндія, 1995, c.41.

Nunokawa Y. i Hirotsune M., Production of Soft Sake by an Immobilized Yeast Reactor System, у Industrial Application of Immobilized Biocatalysts. (під ред. А. Tanaka, Т. Tosa i Т. Kobayashi), Нью-Йорк, вид-во Marcel Dekker, 1993, c.235.

Pajunen E., The Behaviour of Immobilized Yeast Cells. Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology, 21, 1996a, c.33.

Pajunen E., Immobilized System in the Brewing Industry. Proceedings of the Institute of Brewing Convention, Сінгапур, 1996b, c.38.

Pajunen E., Immobilized Yeast Lager Beer Maturation: DEAE-Cellulose at Sinebrychoff. European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Еспо, Фінляндія, 1995, c.24.

Pajunen E. i Gronqvist A., Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. Proceedings for the Institute of Brewing Convention, Сідней, 1994, c.101.

Pajunen E., A. Gronqvist i Lommi H., Continuous Secondary Fermentation and Maturation of Beer in an

Immobilized Yeast Reactor. MBAA Technical Quarterly, 26, 1989, c.147.

Pajunen E., Gronqvist A., Simonsen B. i Lommi H., Immobilized Yeast Fermenters for Continuous Lager Beer Maturation. ALAFACE Annual Meeting, Киото, 1994, c.13.

Pajunen E., Ranta B., Andersen K., Lommi H., Viljava T., Bergin J. i Guercia H., Novel Process for Beer Fermentation with Immobilized Yeast. Proceedings of the 26 Convention of the Institute of Brewing, Asia-Pacific Section, 2000a, c.91.

Pajunen E., Viljava T. i Lommi H., Novel Primary Fermentation with Immobilized Yeast System. World Brewing Congress, усне повідомлення, 2000b.

Paul F. i Vignais P.M., 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, 1980, c.281.

Peach M., Fermenting Faster Pints. New Scientist, 2058, 1996, c.23.

Pilkington, P.H., Margaritis, A. & Mensour, N.A., 1998a. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. Critical Reviews in Biotechnology, 18, 237.

Pilkington P.H., Margaritis A., Mensour N.A. i Russell L., Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. Journal of the Institute of Brewing, 104, 1998b, c.19.

Pilkington H., Margaritis A., Mensour N., Sobczak J., Hancock I. i Russell I., Kappa-Carrageenan Gel Immobilization of Lager Brewing Yeast. Journal of the Institute of Brewing, 105, 1999, c.398.

Pirt S.J., Principles of Microbe and Cell Cultivation, вид-во Blackwell Scientific, Оксфорд, 1975.

Pittner H. i Back W., Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly, 32, 1995, c.163.

Pittner H., W. Back, W. Swinkels, E. Meersman, B. van Dieren i Lommi H., Continuous Production of Acidified Wort for Alcohol-Free Beer Using Immobilized Lactic Acid Bacteria. Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress, Осло, 1993, c.323.

Polednikova M., Sedova H. i Kahler M., Immobilized Brewing Yeast. Kvasny Prumysl, 27, 1981, c.193.

Poncelet D., Lencki R., Beaulieu C, Halle J, P., Neufeld R. J. i Fournier A., Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. Applied Microbiology & Biotechnology, 38, 1992, c.39.

Poncelet D., Poncelet de Smet B., Beaulieu C. i Neufeld R. J., Scale Up of Gel Bead and Microcapsule Production in Cell Immobilization, in Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization, під ред. Goosen M.F.A., вид-во CRC Press Inc., Боку Ратон, Флоріда, 1993.

Prakash A., Briens C.L. i Bergougnou M.A., Mass Transfer Between Solid Particles and Liquid in a Three Phase Fluidized Bed. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 65, 1987, c.228.

Prasad K.Y. i Ramanujam T.K., Overall

Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Modified Reversed Flow Jet Loop Bioreactor with Low Density Particles. *Bioprocess Engineering*, 12, 1995, c.214.

Pritchett, Price. *Culture Shift*. Техас, вид-во Pritchett & Associates, Inc., 1993.

Que F., Using a Thread Type of Alginate Gel Particles as Cell-Immobilised Support and Some Concept of Packed Bed Fermenter Design. *Biotechnology Techniques*, 7, 1993, c.755.

Rajotte P., Continuous Fermentation with Immobilized Yeast Cells. *American Brewer*, 76, 1998, c.42.

Rajotte P., Jumping into the Next Millenium Canadian Style. *American Brewer*, 75, 1997, c.42.

Russell I., Norton S., Mensour N., Margaritis A. i Briens C., Immobilized Yeast Cells: Applications for Brewing. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention*, Victoria Falls, 1995, c.159.

Ryder D.S. i Masschelein CA., The Growth Process of Brewing Yeast and the Biotechnological Challenge. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43, 1985, c.66.

Satterfield CN., *Mass Transfer in Heterogeneous Catalysts*, вид-во MIT Press, Кембрідж, 1970.

Scott J.A., O'Reilly A.M. i Kirkhope S., A Fibrous Sponge Matrix to Immobilized Yeast for Beverage Fermentations. *Biotechnology Techniques*, 9, 1995, c.305.

Shindo S. i Kamimur M., Immobilization of Yeast with Hollow PVA Gel Beads. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 1990, c.232.

Shindo S., Sahara H. i Koshino S., Suppression of α -Acetolactate Formation in Brewing with Immobilized Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 100, 1994a, c.69.

Shindo S., Sahara H., Koshino S. i Tanaka H., 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, 1993, c.199.

Shindo S., Sahara S., Watanabe N. i Koshino, S., Main Fermentation with Immobilized Yeast Using Fluidized-Bed Reactor. *Proceedings of the Institute of Brewing Convention*, Сідней, 1994b, c.109.

Sinitsyn A.P., Rajnina E.I., Efremov A.B., Gracheva I.M. i Gernet M.V., Fermentation of Hydrolysed Mash by Yeasts Immobilized on Borosilicate Carriers. *Fementnaya I Spirtovaya Promyshlennost*, 1986, c.31.

Smogrovicova D. i Domeny Z., Beer Volatile By-Product Formation at Different Fermentation Temperature using Immobilized Yeasts. *Process Biochemistry*, 34, 1999, c.785.

Smogrovicova D., Domeny Z. Gemeiner P. Malovikova A i Sturdik E., Reactors for Continuous Primary Beer Fermentation using Immobilized Yeast. *Biotechnology Techniques*, 11, 1997, c.261.

Sodini L., Boquien C.Y., Corrieu G. i Lacroix C., Use of an Immobilized Cell Bioreactor for the Continuous Inoculation of Milk in Fresh Cheese Manufacturing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18, 1997, c.56.

Speers R.A. i Ritcey L.L., Towards an Ideal Flocculation Assay. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1995, c.174.

Stewart G.G., *Brewing Technology for the Future*. The Brewer, 82, 1996, c.348.

Stewart G.G. i Russell L., *Brewer's Yeast*. The Institute of Brewing, England, 2000.

Stewart G.G. i Russell I., *Yeast Flocculation*, y *Brewing Science*, під ред. J.R.A. Pollock, вид-во Academic Press, Нью-Йорк, 1981.

Stratford M., *Yeast Flocculation: Restructuring the Theories in Line with Recent Research*, *Cerevisiae Belgium Journal of Biotechnology*, 1996, c.38.

Sumino T., Nakamura H. i Mori N., Development of a High-Efficiency Wastewater Treatment System Using Immobilized Microorganisms, y *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (під ред. A. Tanaka, T. Tosa i T. Kobayashi), Нью-Йорк, вид-во Marcel Dekker, 1993, c.377.

Tata M., Bower P., Bromberg S., Duncombe D., Fehring J., Lau V., Ryder D. i Stassi P. Immobilized Yeast Bioreactor Systems for Continuous Beer Fermentation. *Biotechnology Progress*, 15, 1999, c.105.

Technical Committee and Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists. *Methods of Analysis*. 8-е вид., Міннесота, вид-во ASBC, 1992.

Teixera J.M., Teixeira J.A., Mota M., Manuela M., Guerra B., Machado Cruz J.M. i Sa Almeida A.M., 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*, 1991, c.241.

Umamoto S., Mitani Y. i Shinotsuka K., Primary Fermentation with Immobilized Yeast in a Fluidized Bed Reactor. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 35, 1998, c.58.

Van de Winkel L., Design and Optimization of a Multipurpose Immobilized Yeast Bioreactor for Brewery Fermentations. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 20, 1995, c.77.

Van de Winkel L. i De Vuyst L., Immobilized Yeast Cell Systems in Today's Breweries and Tomorrow's. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22, 1997, c.27.

Van de Winkel L., McMurrough I., Evers G., Van Beveren P.C. i Masschelein CA., 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*, Еспо, Фінляндія, 1995, c.90.

Van de Winkel L., P.C. van Beveren i CA. Masschelein, The Application of an Immobilized Yeast Loop Reactor to the Continuous Production of Alcohol-Free Beer. *Proceedings of the 23rd European Brewing Convention Congress*, Лісабон, 1991a, c.577.

Van de Winkel L., P.C. van Beveren, E. Borremans, E. Goosens i CA. Masschelein, High Performance Immobilized Yeast Reactor Design for Continuous Beer Fermentation. *Proceedings of the 24th European Brewing Convention Congress*, Осло, 1991b, c.307.

Van Dieren B., *Yeast Metabolism and the Production of Alcohol-Free Beer*. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast*

Applications in the Brewing Industry, Есно, Фінляндія, 1995, с.66.

Van Iersel M.F.M., Meersman E., Swinkels W., Abbe T. i Rombouts F.M., Continuous Production of Non-Alcohol Beer by Immobilized Yeast at Low Temperature. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 1995, с.495.

Van Loosdrecht M.C.M. i Heijnen J.J., Biofilm Bioreactors for Waste-Water Treatment. *Trends in Biotechnology*, 11, 1993, с.117.

Vicente A.A., Dluhy M. i Teixeira J.A., Increase of Ethanol Productivity in an Airlift Reactor with a Modified Draught Tube. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 11, 1999, с.497.

Virkajarvi I. i Linko M., Immobilization: A Revolution in Traditional Brewing. *Naturwissenschaften*, 86, 1999, с.112.

Virkajarvi I. i Kronlof J., Long Term Stability of Immobilized Yeast Columns in Main Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56, 1998, с.70.

Virkajarvi I. i Pohjala N., Profiting from Immobilized Fermentation. *Proceedings of the 5th Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*, 1999, с.290.

Wackerbauer K., Fitzner M. i Gunther J., Technisch-technologische Möglichkeiten mit Immobilisierter Hefe. *Brauwelt*, 136, 1996a, с.2140.

Wackerbauer K., Fitzner M. i Lopsien M., Untersuchungen mit dem Neuen MPI-Bioreaktor-System. *Brauwelt*, 136, 1996b, с.2250.

Webb C., G.M. Black i B. Atkinson, *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System*. England: The Institution of Chemical Engineers, 1986.

Westrin B.A. i A. Axelsson, Diffusion in Gels Containing Immobilized Cells: A Critical Review. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1991, с.439.

Wu W.T., Wu J.Y. i Jong J.Z., Mass Transfer in an Airlift Reactor with a Net Draft Tube. *Biotechnology Progress*, 8, 1992, с.465.

Yamane T., On Approximate Expressions of Effectiveness Factors for Immobilized Biocatalysts. *Journal of Fermentation Technology*, 59, 1981, с.375.

Yamauchi Y. i Kashiwara T., Kirin Immobilized System. *European Brewery Convention Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry*, Есно, Фінляндія, 1995a, с.99.

Yamauchi Y., Kashiwara T., Murayama H., Nagara A., Okamoto T. i Mawatari M., Scaleup of Immobilized Yeast Bioreactor for Continuous Fermentation of Beer. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 31, 1994, с.90.

Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Kajino K., Amikura T., Hiratsu H., Nagara A., Kamiya T. i Inoue T., Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 1. Heat Conversion of α -Acetolactate. *Journal of Biotechnology*, 38, 1995b, с.101.

Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Kajino K., Nagara A. i Noguchi K., Rapid Maturation of Beer Using an Immobilized Yeast Bioreactor. 2. Balance of Total Diacetyl Reduction and Regeneration. *Journal of Biotechnology*, 38, 1995c, с.109.

Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Nagara A. i Kashiwara T., Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System:

Control of Sulfite Formation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 1995d, с.277.

Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Nagara A., Kashiwara T., Yoshida M. i Nakanishi K., Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Balance Control of Extract and Amino Acid Uptake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 1995e, с.245.

Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Nagara A., Kashiwara T., Yoshida M., Yasui T. i Nakanishi K., Rapid Fermentation of Beer Using an Immobilized Yeast Multistage Bioreactor System: Control of Minor Products of Carbohydrate Metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 1995f, с.261.

Yuan X., Application of Immobilization Technique in Brewing Industry. *Shipin Kexue*, 94, 1987, с.8.

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

Даний винахід відноситься до способу виготовлення спиртних напоїв, що включає стадію безперервного бродіння, при якій сушло засівають дріжджами та/або щонайменше здійснюють початкове бродіння сушля, що містить цукри, які зброджують.

Зокрема, у винаході запропонований кращий спосіб, відповідно до якого безперервне бродіння здійснюють у біореакторі газліфтного типу з використанням флокулентного (і насамперед, що має високу здатність до флокуляції (високофлокулентного) або суперфлокулентного) штаму дріжджів і при строгому контролі вмісту кисню.

Відповідно до найбільш кращого варіанта здійснення даного винаходу партію «щонайменше частково збродженого» продукту, одержаного за допомогою безперервного процесу, піддають стадії періодичної обробки (обробки партій) (яка в контексті формули даного винаходу може включати (але не обмежуватись цим) завершення процесу бродіння, у ході якого вуглеводи, які зброджують, перетворюються в спирт).

Даний винахід відноситься до виробництва пива (включаючи, зокрема, світлі види пива, лагєрне пиво і, насамперед, Північно-американські види пива) [див., наприклад, the Essentials of Beer Style - F. Eckhardt].

Спосіб здійснюють за п.1, відповідно до якого безперервну стадію проводять у газліфтному реакторі. Для безперервної стадії, яку використовують в різних варіантах здійснення даного винаходу, переважно застосовують іммобілізовані клітини (на відміну від повністю вільних клітин), і її можна здійснювати з використанням обраного носія іммобілізованих або флокулюючих дріжджів. Незважаючи на вищевикладене краще замість іммобілізованих на носії клітин використовувати флокулюючі дріжджі, причому для розглянутої цілі найбільш кращими є суперфлокулентні дріжджі.

Більш докладно кращі варіанти здійснення і переваги, пов'язані з безперервними процесами, представлені в докладному описі даного винаходу. У цих процесах застосовують штучні (наприклад, з контрольованим складом) газові суміші, що включають азот, діоксид вуглецю і кисень, а також повітря.

Крім того, у даному описі приведені більш до-

кладні дані, що стосуються стадії обробки з використанням витримування партій. Слід зазначити, що у певних варіантах здійснення даного винаходу основна ціль процесу витримування партій виходить за рамки «завершення» перетворення вуглеводів, які зброджують, у спирт (яке суті в будь-якому випадку можна завершити на безперервній стадії обробки). У таких варіантах здійснення основною ціллю процесу витримування партій є додавання відповідного смаку (або корекція), насамперед з погляду вмісту діацетилу й ацетилальдегіду.

У кращих варіантах здійснення даного винаходу після стадії безперервної обробки передбачається розподіл засіяного дріжджами суслу та/або щонайменше частково збродженого суслу за допомогою системи трубопроводів (яка може являти собою фіксовану систему трубопроводів або ланцюг, яку можна вибірково приєднувати або від'єднувати) між декількома резервуарами, що вміщують партію продукту. При серійному процесі розподілу заповнюють один резервуар, потім наступний і т.д. У найбільш кращому варіанті продуктивність реактора безперервної дії і потужність резервуарів для витримування партій продукту, погоджують один з одним, виходячи з розміру і кількості реакторів/резервуарів для витримування партій продукту, так щоб швидкості виробництва продукту відповідали один одному з погляду продуктивності в залежності від часу. В ідеальному варіанті з резервуару, для витримування партії продукту, зливають готовий продукт саме в той момент часу, коли його варто очищати, повторно приєднують до трубопроводу і потім заповнюють продуктом, одержаним на стадії безперервного бродіння.

Ще один об'єкт даного винаходу відноситься до регулювання вмісту кисню в суслі/пиві. Це здійснюють як на безперервній стадії, так і стадії витримування партій. На безперервній стадії концентрація кисню робить різні дії, однак слід зазначити, що може виявитися доцільно мінімізувати його концентрацію для оптимізації перетворення вищих спиртів у важливі з погляду додавання смаку складні ефіри. У цьому зв'язку слід зазначити, що на періодичній стадії обробки концентрації вищих спиртів можна зберігати майже без зміни, якщо застосовувати відповідний строгий контроль вмісту O_2 для регулювання балансу розчинних ефірів, сивушних масел, що додають смак. У цьому зв'язку може виявитися доцільно здійснювати попередню продувку суслу за допомогою CO_2 перед стадією безперервного бродіння.

Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу основною ціллю стадії безперервної обробки є одержання продукту для засіву середовища, що зброджують, яке використовують далі в процесі витримування партій.

Для більшої точності зміст документів, які мають пріоритет, включений в даний опис як посилання у всій їхній повноті, так якби вони були кожний окремо повністю включені в даний опис.

Нижче приведено докладний опис об'єктів даного винаходу, який складається з двох частин.

Опис містить та/або в ньому є посилання на графіки, формули, креслення і т.п., що позначені

поняттям «фігура», що супроводжується певним ідентифікуючим номером, і на креслення, кожний з яких позначений та/або на нього даються посилання за допомогою поняття «Фіг.», що супроводжується певним ідентифікуючим номером. На цих кресленнях може не дотримуватися строга нумерація проілюстрованих пунктів.

На приведених кресленнях показано:

На Фіг.1 - блок-схема процесу для пілотного варіанта системи безперервного бродіння, окремі елементи обладнання якої перераховані в таблиці 5.1 даного опису.

На Фіг.2 - схематичне зображення пілотного варіанта газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування (GLDT).

На Фіг.3 - поперечний переріз реактора, представленого на Фіг.2, де зазначені положення внутрішньої труби для відсмоктування і внутрішнього сепаратора.

На Фіг.4 - докладне креслення верхньої кришки біореактора, представленого на Фіг.2.

На Фіг.5 - докладне креслення корпусу біореактора, представленого на Фіг.2.

На Фіг.6 - докладне креслення конічної нижньої частини біореактора, представленого на Фіг.2.

На Фіг.7 - докладне креслення газової розпилювальної труби біореактора, представленого на Фіг.2. У розпилювальній трубі діаметром 1,27 см було просвердлено в цілому 160 отворів (діаметром 0,16 см) з відстанями між центрами в подовжньому напрямку 0,8 см і по окружності 0,6 см.

На Фіг.8 - схема безперервного процесу виробництва гранул з використанням статичних змішувачів [заявка на патент 2133789 на ім'я фірми Labatt].

На Фіг.9 - фотографія скляних гранул Siran®, що поставляються фірмою Schott Engineering.

На Фіг.10 - фотографія гранул Celite® з діатомової землі, що поставляються фірмою World Minerals.

На Фіг.11 - фотографія гранул з карагінанового гелю, що виробляються фірмою Labatt Brewing Company Limited ("Labatt").

На Фіг.12 - ряд фотографій, на яких представлені нефлокулентні дріжджі, дріжджі, що утворюють ланцюжки і флокулентні дріжджі відповідно. Ці зображення були одержані за допомогою фокусувальної камери, забезпеченої мікроскопом, при 100-кратному збільшенні.

На Фіг.13 - отримана за допомогою мікроскопа при 100-кратному збільшенні фотографія штаму дріжджів LCC3021 з помірно здатністю до флокуляції (помірно флокулентний штам).

На Фіг.14 - отримана за допомогою мікроскопа при 100-кратному збільшенні фотографія суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290.

На Фіг.15 - схематична діаграма процесу одержання гранул з каппа-карагінанового гелю з використанням статичного змішувача. У статичному змішувачі рідина проходить через змішувач (а не змішувач через рідину), що дає можливість змішувати рідини, які накачують через трубопроводи.

На Фіг.16 - ще одне схематичне зображення газліфтного біореакторної системи з трубою для відсмоктування, яка призначена для основного бродіння пива.

На Фіг.17 - фотографія корпусу діючого газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування, схема якого представлена на Фіг.15.

На Фіг.18 - детальне креслення корпусу діючого газліфтного біореактора об'ємом 13л (тобто що має робочий об'єм 8л) із трубою для відсмоктування, схема якого представлена на Фіг.16.

На Фіг.19 - детальне креслення кришки корпусу біореактора, де показаний: 1 - порт виходу рідини для датчика кисню; 2 - термокомірка для датчика температури, з'єднаного з контролером термостата; 3 - температурний зонд; 4 - порт повернення рідини, яку використовують для датчика кисню; 5 - порт для інокуляції; 6 - мембранний порт для зразка, забезпечений кришкою з нержавіючої сталі.

На Фіг.20 - схема порту виходу рідини для датчика кисню, який забезпечений пристроєм для наповнення, зануреним у рідку фазу біореактора.

На Фіг.21 - детальний опис обладнання і функціональна схема безперервного процесу основного бродіння для одержання пива з використанням системи газліфтного біореактора (див. таблицю 5.1, де представлений більш детальний опис обладнання).

На Фіг.22 - схематичне зображення механізму гелеутворення карагінану [взято з роботи Rees, 1972].

На Фіг.23 - схема утилізації компонентів суслу при основному бродінні з використанням іммобілізованих дріжджів.

На Фіг.24 - фотографія гранул з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані лагерні дріжджі, у момент початку бродіння.

На Фіг.25 - фотографія групи клітин лагерних дріжджів, включених у гранулу з каппа-карагінанового гелю, через два дні після початку періодичного процесу бродіння, де на окремих клітинах дріжджів видно брунькові перегородки.

На Фіг.26 - фотографія зовнішнього краю гранули з каппа-карагінанового гелю, на якій представлені клітини лагерних дріжджів через два місяці після початку безперервного процесу бродіння.

На Фіг.27 - фотографія клітин лагерних дріжджів, які знаходяться в зовнішній області гранули з каппа-карагінанового гелю, через два місяці після початку безперервного процесу бродіння.

На Фіг.28 - фотографія клітин лагерних дріжджів, які знаходяться в центрі гранули з каппа-карагінанового гелю, через два місяці після початку безперервного процесу бродіння.

На Фіг.29 - фотографія всієї гранули з каппа-карагінанового гелю, через шість місяців після початку безперервного процесу бродіння; у центрах багатьох зруйнованих гранул є порожнечі.

Частина 1

Одержання штаму дріжджів та інокуляту

У розглянутому варіанті здійснення винаходу бродіння здійснювали з використанням поліплоїдних дріжджів із сімейства *Saccharomyces cerevisiae* (які називають також *Saccharomyces uvarum* та/або *Saccharomyces carlsbergensis*). Як правило, компанії, що займаються пивоварством, використовують ці дріжджі для низового бродіння при виробництві лагерного пива. Це обумовлено здатністю лагерних дріжджів осаджуватися з рідкого

середовища після закінчення процесу бродіння. На відміну від лагерних дріжджів дріжджі для елю піднімаються вгору резервуару для бродіння і тому їх називають штамом дріжджів верхового бродіння. Здатність дріжджів осаджуватися або підніматися не обов'язково залежить від того, чи є дріжджі лагерними дріжджами або дріжджами для елю, але вона є специфічною для штаму. Лагерні дріжджі, як правило, не зброджуються при температурах вище 34°, у той час як дріжджі для елю не можуть зброджувати мелібіозу. Вчені використовують ці характеристики для того, щоб відрізнити лагерні штами від дріжджів для елю [McCabe, 1999].

Штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 3021 з помірною флокулюючою здатністю, одержаний з колекції культур фірми Labatt (Labatt Culture Collection), застосовували як для бродіння з використанням вільних клітин, що самі утворюють агрегати, так і для бродіння з використанням клітин, іммобілізованих за допомогою каппа-карагінану. У дослідях з використанням суперфлокулентних дріжджів як іммобілізовані дріжджі застосовували варіант штаму LCC3021, а саме штам LCC290.

Чисті культури дріжджів зберігали в криогенних умовах при -80°C у рефрижераторі в Labatt Technology Development Department. Перед застосуванням взяті за допомогою стерильної петлі культури дріжджів попередньо вирощували в аеробних умовах при 21°C на пластинах, що містять PYG-агар (3,5г пептону, 3,0г екстракту дріжджів, 2,0г KH_2PO_4 , 1,0г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20,0г глюкози та 20,0г агару, розчинених у дистильованій воді до об'єму 1л). Потім виділені колонії дріжджів переносили в лабораторні пробірки, що містять 10мл пастеризованого суслу, і інкубували при перемішуванні при 21°C протягом 24 годин. Цей інокулят послідовно доводили до об'єму 5л шляхом додавання однржаної як зазначено вище культури у відповідний об'єм суслу (10мл у 190мл, 200мл у 800мл і 1л у 4л). Потім інокулят дріжджів переносили в центрифужні колби і центрифугували протягом 10хв при 10000об./хв і 4°C. З утворених вологих пеллетів дріжджів (30% мас./об.) відбирали необхідну масу дріжджів для всіх наступних дослідів з бродіння.

Середовище для бродіння

Як живильне середовище для всіх дослідів з бродіння використовували застосоване для промислового виробництва лагерне сусло пивоварної фірми Labatt London. У даному описі вказується питома вага суслу, виражена в градусах Плато (°P).

Співвідношення між питомою вагою і °P описується формулою 4.1.

$$^{\circ}\text{P} = 135,997 \cdot \text{SG}^3 - 630,272 \cdot \text{SG}^2 + 1111,14 \cdot \text{SG} - 616,868 \quad (4.1)$$

Розглянуте в даному описі сусло мало 17,5°P, що відповідає питомій вазі 1,072.

У таблиці 4.1 представлений типовий профіль вуглеводів цього суслу, визначений методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), описаним у розділі 4.7.2. Приблизно 73% вуглеводів у цьому суслі мали здатність до зброджування, хоча пивні дріжджі, які застосовували в даному дослідженні, не можуть включати більш 27% вуглеводів з довгим ланцюгом.

Таблиця 4.1

Типовий склад вуглеводів у суслі, які використовували в дослідях з бродіння.
Сусло було зроблено пивоварною компанією Labatt London і мало питому вагу 17,5°P.

	Середній вміст (г/л)	Коефіцієнт варіації (%)	Зброджуємість (%)	Незброджуємість (%)
Фруктоза	3,3	18,0	1,9	
Глюкоза	16,5	4,3	9,3	
Мальтоза	87,7	10,1	47,8	
Мальтотриоза	25,2	10,8	14,2	
Мальтотетроза	6,4	18,3		3,6
Полісахариди	41,1	9,1		23,2
Всього	177,2		73,2	26,8

Коефіцієнт варіації для більшості проаналізованих субстанцій становив 10-20%. Така варіабельність в основному обумовлена особливостями застосовуваного процесу промислового виробництва, а також варіабельністю характеристик вихідних продуктів, які застосовують при виробництві різних партій пива.

Види іммобілізації

При роботі над даною докторською дисертацією були вивчені три типи іммобілізації - захоплення, абсорбція і самоагрегація. Для носіїв, які використовували при промисловому виробництві, спочатку приведені дані фірми-постачальника, які потім доповнені даними лабораторного аналізу. В інших розділах представлені фотографії і розподіли досліджених носіїв (якщо це було можливе).

На пілотному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування тестували два типи адсорбційних матриць. Фотографії обох зазначених носіїв приведені в даному описі. Від фірми Schott Engineering був одержаний носій у вигляді гранул із спеченого скла, Siran®. Вибрані частки мали діаметр 1-2мм, відкриті пори для іммобілізації дріжджів з об'ємом пор 55-60% і розподілом розмірів пор від 60 до 300мкм, які є придатним розміром для клітин дріжджів. Відомо, що такий тип носія є біологічно і хімічно стабільним, його легко очищати, можна використовувати повторно, здійснювати стерилізацію за допомогою пари, він не злипається і не має смаку і тому дозволений для застосування в харчовій промисловості.

Від фірми World Minerals of California був одержаний носій у вигляді гранул сферичної форми з діатомової землі. Перевагою цього носія є теплостійкість і хімічна стабільність, механічна міцність і твердість. Діатоміт, який являє собою основний вихідний продукт, широко застосовується в пивоварній промисловості для фільтрації пива. Носій Celite® R-632 був спеціально розроблений для іммобілізації цілих клітин.

Постачальником були надані наступні характеристики:

Діапазон розмірів: 0,595-1,41мм (межа проходу через сито 14/30меш);

Середній діаметр пор: 7,0мкм;

Загальний об'єм пор: 1,19см³/г;

Щільність спресованого шару: 0,334кг/м³;

Гранули з каппа-карагінанового гелю, які представляють собою носій, що захоплює, виготовляли в лабораторії пивоварної компанії Labatt

Brewing Company Ltd. Процес виготовлення описаний у розділі 5.2, а результати, одержані при здійсненні цього процесу виготовлення, представлені в розділі 6.2.1.

Шляхом вибору певних штамів дріжджів, здатних до флокуляції, можна здійснювати найбільш просту форму іммобілізації, а саме самоагрегацію. Застосовуваний у промисловості штам лагерних дріжджів LCC3021 має природну здатність до флокуляції і розглядається як штам з помірною здатністю до флокуляції. У процесі зброджування в рідкому середовищі утворюються невеликі згустки дріжджів розміром 0,5-1,0мм. Штам дріжджів LCC290, що являє собою варіант штаму LCC3021 лагерних дріжджів, може утворювати пластівці (флокуляти) більшого розміру (від 1,0 до 5,0мм у залежності від інтенсивності перемішування) і тому його класифікують як суперфлокулентні дріжджі. У даному описі представлені фотографії флокулятів, утворених різними видами дріжджів.

Протокол відбору зразків

У процесі бродіння було необхідно відбирати зразки із рідини, яку зброджують, через численні інтервали часу. Для здійснення цього від фірми Scandi-brew® були одержані стерильні клапани для відбору зразків. Ці клапани виготовлені з нержавіючої сталі і забезпечені камерою (обмеженою верхнім і нижнім портами), у якій можна зберігати етанол для створення асептичних умов. Перед відбором зразка етанол випускали з камери шляхом вилучення заслінки з нижнього зливального отвору. Через камеру пропускали свіжий етанол (75об.%) і потім заслінку поміщали на верхній порт клапана. Після цього натискали на важіль клапана і збирали приблизно 50мл зразка рідини в стерилізований контейнер. Другий зразок відбирали при процесі бродіння з використанням суперфлокулентних дріжджів, так що до підрахунку клітин можна було здійснювати відповідну дефлокуляцію. Після завершення відбору зразка забезпечену клапаном камеру промивали гарячою водою і пероцтовою кислотою і, в кінці етанолом. Заслінку поміщали на нижній зливальний отвір і камеру потім заповнювали етанолом для підготовки до відбору наступного зразка.

Метод підрахунку вільних клітин дріжджів і оцінки життєздатності з використанням барвника метиленового синього

Спочатку відбирали зразки рідини із середовища, яке зброджують, що містить вільно суспен-

довані клітини дріжджів, за допомогою описаної вище процедури відбору зразків. Для підрахунку кількості клітин використовували гематиметр фірми Hauser Scientific Company з робочим об'ємом 10^{-4} мл, що був з'єднаний із світловим мікроскопом. Зразки рідини необхідно було розбавляти дистильованою водою для того, щоб загальна кількість клітин дріжджів у полі підрахунку становила 150-200 клітин. Heggart із співробітниками (1999) описали всі фактори, що впливають на життєздатність і характеристики життєздатності дріжджів.

Для оцінки ступеня життєздатності клітин дріжджів у зразку використовували метод фарбування барвником метиленовим синім, описаним Американським товариством хіміків, що працюють у пивоварній промисловості (American Society of Brewing Chemists) (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Живі клітини залишаються безбарвними при фарбуванні метиленовим синім, оскільки вони окислюють його. На відміну від цього загині клітини зафарбовуються в синій колір. При оцінці життєздатності при готуванні препаратів на основі барвника метиленового синього використовували наступні реагенти:

розчин А: 0,1г метиленового синього в 500мл дистильованої води;

розчин Б: 13,6г KH_2PO_4 у 500мл дистильованої води;

розчин В: 2,4г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ у 100мл дистильованої води.

Потім готували забуферений по Фінку-Кулеса (Fink-Kuhles) розчин метиленового синього шляхом змішування 500мл розчину А з 498,75мл розчину Б і 1,25мл розчину В, одержуючи кінцеву суміш із рН 4,6.

У лабораторній пробірці готували суміш розведеної суспензії клітин і метиленового синього і ретельно перемішували. Після вистоявання цієї суміші протягом декількох хвилин (для забезпечення контакту клітин з барвником), краплю рідини поміщали між предметним склом і покривним склом гематиметра (певний об'єм). Відсоток живих клітин визначали шляхом підрахунку як живих, так і мертвих клітин у полі підрахунку та наступного ділення кількості живих клітин на загальну кількість клітин.

4.5.2 Підрахунок іммобілізованих клітин дріжджів - самоагрегація

При використанні клітин дріжджів, що мають тенденцію утворювати флокуляти, важко точно оцінювати кількість клітин, які присутні у рідкому зразку, оскільки клітини мають тенденцію до осадження в посудині для відбору зразка. Для одержання репрезентативного зразка застосовували дефлокулентний агент. У цих експериментах використовували 0,5об.% розчин сірчаної кислоти для дестабілізації флокульованих клітин дріжджів, завдяки чому можна було проводити репрезентативний підрахунок клітин дріжджів. Таку ж процедуру підрахунку клітин і оцінки життєздатності, що описана в розділі 4.5.1, застосовували у випадку заміни сірчаної кислоти дистильованою водою, яку використовують як розріджувач.

Підрахунок іммобілізованих клітин дріжджів - гелеві гранули

Перед здійсненням підрахунку клітин дріжджів, захоплених гелем, було необхідно зруйнувати гелеву матрицю за допомогою пристрою Polytron® (фірма Brinkmann Instruments). Зразок, що містить гранули, спочатку пропускали через стерильне сито (розмір отворів 500мкм) і потім промивали стерильною водою. У контейнер для зразка вносили 1мл гелевих гранул із захопленими клітинами і 19мл дистильованої води. Потім застосовували Polytron® для фізичного руйнування гелю, у результаті чого дріжджові клітини вивільнювалися в розчин. Після цього для зразка із зруйнованим гелем здійснювали підрахунок клітин і оцінку їхньої життєздатності відповідно до методів, описаних у розділі 5.5.1.

Моніторинг забруднення

При здійсненні всіх процесів бродіння, результати яких представлені в даному описі, регулярно здійснювали моніторинг забруднення. Програма моніторингу передбачала щонайменше щотижневу перевірку рідини у ферментерах безперервної дії об'ємом 50л і сусла в резервуарах для збереження. Зразки рідини відбирали в асептичних умовах і потім вносили в культуральні планшети, що містять універсальний пивний агар (Universal Beer Agar) (UBA, фірма Difco Laboratories) і 10мг/л циклогексимида. Потім ці зразки, які тестують, інкубували при 28°C протягом періоду часу до 10 днів як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Необхідні анаеробні умови культивування створювали, поміщаючи відібрані планшети в посудини, що містять пакет AnaeroGen (фірма Oxoid), що поглинає весь кисень, який присутній у посудині. Для перевірки того, чи були умови дійсно анаеробними, застосовували індикаторну смужку (вона стає рожевою в присутності кисню). Таким чином, цим способом можна виявляти бактеріальні забруднення, якщо вони присутні в рідкому зразку.

Для виявлення дріжджів дикого типу або неживих дріжджів необхідно використовувати спеціальне живильне середовище, яке не стимулює ріст бактерій та/або пивних дріжджів. Для виявлення будь-яких потенційних штамів дикого типу використовували пористі планшети, що містять дріжджове середовище (YM, фірма Difco Laboratories), доповнене 0,4г/л CuSO_4 (інкубація при 25°C протягом 7 днів). Інкубація рідкого зразка, висіяного на PYN-агар (лептонний дріжджовий живильний екстракт, фірма Difco Laboratories), протягом 7 днів при 37°C дозволяла виявляти пивні дріжджі нелагерного типу. Ріст лагерних дріжджів інгібується при температурах вище 34°C, таким чином, будь-який ріст клітин на цих планшетах може служити індикатором забруднення дріжджами елевого типу.

Аналітичні методи

Для всього використаного обладнання були проведені відповідні калібрування відповідно до стандартних інструкцій, які застосовуються при промисловому виробництві.

Етанол

Концентрацію етанолу в пиві і зразках, відібраних у процесі бродіння, аналізували за допомогою методу газової хроматографії, описаного в настанові Технічного комітету і Редакційного комі-

тету Американського товариства хіміків-пивоварів (Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists) (1992). Дегазований зразок рідини об'єднували з 50б.%-ним ізопропанолом, що використовували як внутрішній стандарт, після чого 0,2мл цієї суміші вносили в газовий хроматограф (ГХ) типу Perkin Elmer 8500. Нижче приведені додаткові відомості про більш точні параметри ГХ:

Полум'яно-іонізаційний детектор (FID)

Пристрій для автоматизованого відбору зразків типу Dynatech;

Chromosorb 102, для набивання колонки, розмір часток 80-100меш;

Газ-носії - гелій, швидкість потоку 20мл/хв;

Температура інжектора 175°C, температура детектора 250°C і температура колонки 185°C, режим ізотермічний.

Вуглеводи

Концентрації глюкози, фруктози, мальтози, мальтотриози, мальтотетрози, полісахаридів і гліцерину вимірювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням системи Spectra-Physics SP8100XR. Для розділення цих вуглеводів при їх злиюванні через систему застосовували катіонообмінну колонку (Bio-Rad Aminex HPX-87K) з використанням біфосфату калію як рухливу фазу. Після цього концентрацію сполук визначали з використанням детектора показника заломлення для виявлення піків відповідних сполук. ВЕРХ проводили при протитиску 800фунтів/кв. дюйм, температурі колонки 85°C і температурі детектора 40°C. Зразки дегазували і розбавляли до відповідних концентрацій. Потім у систему вносили шляхом ін'єкції 10мл зразка при швидкості потоку 0,6мл/хв.

У пивоварній промисловості, як правило, використовують інший метод оцінки загального вмісту вуглеводів у рідині. Питому вагу рідини, виражену в градусах Плато, вимірюють за допомогою денситометра типу Anton Paar DMA-58. Профільтровані і дегазовані зразки поміщають у спеціальні скляні U-подібні пробірки, що потім піддають коливанням за допомогою електронного пристрою. Вимірюють частоту коливань рідини і потім по ній визначають питому вагу рідини (г/100г або °P). Слід зазначити, що результати цих вимірів дають приблизне значення загальної концентрації вуглеводів у зразку (або питому щільність), оскільки калібрування здійснюють у водному розчині сахарози при 20°C, питома вага якої така ж, як й у розглянутого сусла.

Близькі за будовою дикетони

Загальні концентрації діацетил(2,3-бутандіону) і 2,3-пентандіону визначали за допомогою газового хроматографа типу Perkin Elmer 8310, забезпеченого електронзахватним детектором. Як газ-носії використовували 5%-ний метан в аргоні при швидкості потоку 1,0мл/хв і зразок пропускали через колонку типу J & W DB-Wax. Температуру інжектора підтримували на рівні 105°C, а темпера-

туру детектора встановлювали на рівні 120°C. Аналіз здійснювали з використанням автоматизованого пристрою типу Hewlett Packard 7694E для відбору зразків у просторі над рідиною. Кількісну оцінку робили шляхом визначення площі піка конкретного компонента зразка і зіставлення його з каліброваною величиною для внутрішнього стандарту, 2,3-гександіону.

Для оцінки «загальної» концентрації зазначених сполук спочатку необхідно врівноважувати ці зразки при 65°C і потім витримувати їх протягом 30 хвилин при цій температурі. Така обробка, що передує аналізу зразка, приводить до перетворення α -ацетоллактату і α -гідроксибутирату в їхні відповідні дикетони, діацетил і 2,3-бутандіон.

Складні ефіри і вищі спирти

Вміст деяких з найбільш важливих смакових речовин, виявлених у пиві, вимірювали за допомогою методу газової хроматографії у вільному просторі над рідиною. Вміст ацетальдегіду, етилацетату, ізобутанолу, 1-пропанолу, ізоамілацетату, ізоамілового спирту, етилгексаноату й етилоктаноата оцінювали, використовуючи як внутрішній стандарт н-бутанол. Для цього застосовували газовий хроматограф типу Hewlett Packard 5890, оснащений полум'яно-іонізаційним детектором, автоматичний пристрій типу HP 7994 для відбору зразка у вільному просторі над рідиною і капілярною колонкою типу J&W DB-Wax. Температуру інжектора задавали на рівні 200°C, а температура детектора становила 220°C. Профіль термостатування був наступним: 40°C протягом 5хв, градієнт від 40°C до 200°C із швидкістю 10°C/хв, градієнт від 200°C до 220°C із швидкістю 50°C/хв і, нарешті, витримання при 220°C протягом 5хв. Вводили одержаний відповідно до стандарту газоподібний гелій із швидкістю 30мл/хв (при тиску 28фунтів/кв.дюйм), водень із швидкістю 50мл/хв (при тиску 25фунтів/кв.дюйм) і повітря із швидкістю 300мл/хв (при тиску 35фунтів/кв.дюйм) на додаток до потоку газу-носія, гелію, що вводили із швидкістю 6,0мл/хв. Повний цикл ГХ для зразка об'ємом 1мл становив 40хв.

Інші аналізи

При необхідності проводили інші аналітичні вимірювання для зразків рідини, яку зброджують, в процесі дозрівання й упакування. Аналізи кінцевого продукту проводили у відділенні контролю якості фірми Labatt (Labatt Quality Control department) відповідно до стандартів, що діють для готового пива. Ці виміри проводили відповідно до методів, описаних у настанові Технічного комітету і Редакційного комітету Американського товариства хіміків, що працюють у пивоварній промисловості (Technical Committee and the Editorial Committee of the American Society of Brewing Chemists) (1992). Перелік проведених аналізів, а також короткий опис характеристик цих методів наведено в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Аналізи контролю якості і їх опис

Перелік	Опис
Повітря	Загальна кількість повітря, що виділилося в процесі упаковування; по специфікації менше 1мл
Діоксид вуглецю	Рівень карбоксилування продукту; який визначають у %, по специфікації становить 2,75%
Діоксид сірки	Вміст діоксиду сірки в пиві вимірюють за допомогою ГХ; потрібно, щоб він становив <10мг/л
Диметилсульфід	Вміст диметилсульфіду (який додає запах вареної кукурудзи) у пиві вимірюють за допомогою ГХ; потрібно, щоб він становив <70мкг/л
Гіркота	Рівень гіркоти, обумовлений присутністю хмелю в пиві; визначають шляхом вимірювання вмісту альфа-кислот у пиві; 1 одиниця гіркоти (BU) еквівалентна ~1мг/л альфа-кислот
Колір	Колір пива вимірюють за допомогою спектрофотометрії; по величині абсорбції в зразку при довжині хвилі 430нм на довжині шляху світлового променя 0,5 дюйма
pH	Вимірюють за допомогою каліброваного pH-метра; $pH = -\log_{10}[H^+]$
Удаваний вміст екстракту	Вміст придатної розчинної маси в рідині без корекції на вплив спирту на відносну щільність рідини; вимірюють за допомогою гігрометра і виражають у °P; AE
Дійсний вміст екстракту	Те ж, що і для удаваного вмісту екстракту, за винятком того, що при цих вимірах враховують вміст спирту, RE
Розрахований вихідний вміст екстракту	На основі експерименту Баллінга (Balling) вважається, що з 2,0665г екстракту виробляється 1,0000г спирту; $COE = 100 * [(2,0665 * (\text{мас. \% спирту}) + RE) / (100 + 1,0665 * (\text{мас. \% спирту}))]$
Тепле помутніння	Каламутність присутня в пиві при кімнатній температурі (21°C) без збівтування осаду; оцінюють нефелометричним методом на основі розсіювання світла і виражають в одиницях мутності формазину (FTU); потрібно, щоб воно становило <200 FTU
Початкове холодне помутніння	Каламутність, що утвориться в пиві при його охолодженні від кімнатної температури (21°C) до 0°C без збівтування осаду; використовують описаний вище метод вимірювання; потрібно, щоб воно становило <100 FTU
Піна	Здатність пива до піноутворення вимірюють за допомогою пристрою типу NIBEM; піну утворюють контрольованим образом і реєструють швидкість руйнування піни; потрібно, щоб вона становила >170с

Протокол дослідження осадження штаму дріжджів LCC290

Одержання зразка для тестування дріжджів

Суперфлокulentний штам дріжджів (LCC290) вирощували в суслі відповідно до методу, описаному в розділі 4.1. Потім цей інокулянт центрифугували при 4°C і 10000об./хв протягом 15хв для одержання пеллетів дріжджів для наступної інокуляції. Сусло, як описано в розділі 4.2, пастеризували при 100°C протягом 60хв і потім 1л переносили в асептичних умовах у 6 стерилізованих колб, що струшуються, об'ємом по 2л кожна. Кожну колбу, що струшується, інокулювали за допомогою 4г дріжджів, які піддали центрифугуванню. Колби поміщали на шейкер, що працює при 135об./хв (при кімнатній температурі 21°C), і давали зброджуватися. Через 24, 40, 48, 64, 71 та 192 год, брали по одній колбі. Для кожного інтервалу часу відбирали невеликий зразок рідини для аналізу вуглеводів і вимірювання концентрації дріжджів і оцінки життєздатності (відповідно до методів, описаних у главі 4). Суміш, що залишилася, рідина/дріжджі піддавали осадженню відповідно до протоколу, описаному в розділі 4.7.2.

Протокол осадження дріжджів

Швидкість осадження суперфлокulentних

штамів дріжджів LCC290 вимірювали наступним методом. Кожному зразку давали зброджуватися протягом певних періодів часу, зазначених у розділі 4.7.1. У заздалегідь визначений момент часу відбирали колбу, що містить відповідний зразок. Зразки перемішували для того, щоб гарантувати суспендування всіх часток. Вміст колби відразу переносили в градуйований циліндр об'ємом 1000мл. У процесі осадження флокулятив через кожні 30с вимірювали відстань між поверхнею рідини і внутрішньою поверхнею поділу флокулятивної рідини. Швидкість осадження розраховували за допомогою наступного рівняння:

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

З використанням стандартного методу Кінха (Kynch) (1952) для кожного із зразків, взятих через зазначені проміжки часу, будували залежності швидкості осадження від концентрації клітин.

Методи оцінки швидкості циркуляції і змішування

Для вимірювання часу змішування і швидкості циркуляції в трифазному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування використовували систему ін'єкції кислоти, об'єднану із системою збору даних. При імпульсному введенні сильної кислоти

в біореактор можна на основі моніторингу зміни значення pH з часом і використовуючи рівняння, приведені в розділі 3.2.2, розраховувати як швидкість циркуляції, так і час змішування. Система збору даних включала:

Зонд для вимірювання значення pH типу Ingold (фірма Cole-Palmer, каталожний номер P-05990-90), з'єднаний з датчиком pH типу Ingold (модель 2300) на основі мікропроцесора

Карту трансляції даних DT2805

Персональний комп'ютер 386DX

і програму збору даних Quick Basic (створену C. Hudson та J. Beltrano у 1994 і модифіковану N. Mensour у 1998).

10мл 10н. соляної кислоти ін'єктували в кільцеву секцію газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування (діаграма приведена на Фіг.5.5) безпосередньо під місцем розташування зонда pH. Це положення знаходилося на відстані 26см нижче верхньої кришки. Перед всіма експериментами по змішанню зонд для вимірювання значення pH піддавали двоточковому калібруванню з використанням сертифікованих стандартних буферів (зелений буфер фірми Beckman з pH 7,0 і червоний буфер фірми Beckman з pH 4,0). Електричний струм силою 4-20мА, який виробляється рН-метром, надходив на пригвинчений з'єднувальний щиток, де струм перетворювався в напругу, яку потім вимірювали за допомогою плати для збору даних, вбудованої в комп'ютер. Програма збору даних починала працювати в момент ін'єкції кислоти. Тривалість збору даних становила 5хв при частоті збору 50Гц. Розмір масиву в програмі був встановлений рівним 3750 (загальна кількість зібраних відліків становила 15000), що відповідало одержанню 1 набору (серії) даних для плати збору даних.

Зібрані дані переносили з лабораторії на більш потужний комп'ютер (мікропроцесор Pentium II) для подальшого аналізу. Для аналізу даних широко застосовували програмне забезпечення TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, фірма Labtronics, Канада) завдяки тому, що воно дозволяє обробляти великі масиви даних, а також має численні вбудовані функції для обробки даних (згладжування даних, апроксимація кривими і т.д.). Для усунення шуму з вихідних даних застосовували алгоритм Савитського-Голая (Savitzky-Golay), тобто алгоритм згладжування тимчасової залежності, оснований на використанні апроксимації по методу найменших квадратів за допомогою полінома четвертого порядку у вікні, що рухається. Потім згладжені дані упорядковували для того, щоб оцінювати вплив зміни значення pH, а не дійсні значення pH. Впорядковані дані апроксимували з використанням розкладання по синусоїдальних функціях (ряд Фур'є). Після цього на основі параметрів апроксимації розраховували час змішування і швидкості циркуляції.

Ці експерименти з вивчення змішування проводили при реальних процесах зброджування в 50-літровому газліфтному біореакторі в присутності одного з трьох іммобілізуючих носіїв (суперфлюкулентний штаб дріжджів LCC290, штаб дріжджів з помірної флокулентністю LCC3021 або гранули з к-карагінанового гелю). Рідку фазу зброджували до одержання пива з питомою вагою 2,5°P, при цьому газова фаза складалася з діоксиду вуглецю, який вводять. Температуру зброджування підтримували на рівні 15°С. Приведені швидкості газу, який розпилюють, варіювалися від 2,0 до 6,0мм/с. При даній швидкості потоку системі давали врівноважитися протягом 10хв. Потім починали тест із використанням ін'єкції кислоти і повторювали його три рази. Вибирали наступну величину швидкості потоку газу і значення pH суміші в реакторі доводили до вихідного рівня.

Конструкція пілотного варіанта системи газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування

Система бродіння в газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування

Системи на основі псевдозрідженого шару з трубою для відсмоктування (DTFB), виявилися ефективними при їх використанні для трифазних систем. Були сконструйовані, виготовлені і встановлені в експериментальному пивоварному заводі компанії Labatt Brewing Company Ltd. два ідентичних пілотних біореактори для здійснення експериментальних робіт для даної дисертації. Крім того, було модифіковано кілька існуючих резервуарів для збереження суслу і збору пива. На Фіг.1 представлена блок-схема процесу, який використовували в пілотних експериментах по безперервному бродінню, а в таблиці 5.1 приведений більш докладний опис обладнання, зазначеного на Фіг.1.

Сусло отримували від Лондонського пивоварного заводу (London Brewing plant) через трубопроводи з нержавіючої сталі діаметром 5,08см і його перекачували в резервуари для збереження сусла з робочим об'ємом 1600л (WT1 та WT2). За допомогою системи, що складається з двох резервуарів, можна забезпечувати безперервну подачу живильного середовища у пілотні ферментери безперервної дії (R1 і R2). Кожен резервуар для витримання був оснащений системою розпилення діоксиду вуглецю для контролю вмісту кисню і гомогенності та системою, що включає охолоджуваний за допомогою гліколя кожух для контролю температури. Це центральне джерело живильного середовища було з'єднане за допомогою колекторної системи, оснащеної клапанами (V7, V8 та V9), з 3 незалежними ферментерами. Для забезпечення надходження заздалегідь визначеного потоку сусла в пілотні біореактори (R1 і R2) використовували шлангові насоси типу Masterflex (P1 і P2).

Таблиця 5.1

Опис окремих типів обладнання, зазначених на Фіг.5.1

Найменування	Опис
Повітря	Повітря під тиском 100фунтів/кв. дюйм, що надходить від Лондонського заводу
CO ₂	Діоксид вуглецю під тиском 100фунтів/кв. дюйм, що надходить від Лондонського заводу
F1	Стерильний фільтр на отворі для впуску діоксиду вуглецю
F2	Стерильний фільтр на отворі для впуску діоксиду вуглецю
F3	Стерильний фільтр на випускному клапані WT1
F4	Стерильний фільтр на випускному клапані WT2
F5	Стерильний фільтр на отворі для впуску газу, який розпилюють
F6	Стерильний фільтр на отворі для впуску газу, який розпилюють
F7	Стерильний фільтр на отворі для випуску WBT1
GLR	Зворотний трубопровід для гліколя; 25фунтів/кв. дюйм
GLS	Трубопровід для подачі гліколя; 45фунтів/кв. дюйм
NV1	Голчастий клапан для діоксиду вуглецю
NV2	Голчастий клапан для діоксиду вуглецю
NV3	Голчастий клапан в отворі для впуску повітря
NV4	Голчастий клапан в отворі для впуску діоксиду вуглецю
NV5	Голчастий клапан в отворі для впуску повітря
NV6	Голчастий клапан в отворі для впуску діоксиду вуглецю
P1	Шланговий насос типу Masterflex для живлення R1
P2	Шланговий насос типу Masterflex для живлення R2
PR1	Регулятор тиску діоксиду вуглецю
PR2	Регулятор тиску діоксиду вуглецю
PR3	Регулятор тиску повітря
PR4	Регулятор тиску діоксиду вуглецю
PR5	Регулятор тиску повітря
PR6	Регулятор тиску діоксиду вуглецю
R1	Пілотний газліфтний біореактор із трубою для відсмоктування; робочий об'єм 50л
R2	Пілотний газліфтний біореактор із трубою для відсмоктування; робочий об'єм 50л
RM1	Ротаметр діоксиду вуглецю; шкала 0-20 scfh
RM2	Ротаметр діоксиду вуглецю; шкала 0-20 scfh
RM3	Ротаметр повітря; шкала 0-2,5 scfh
RM4	Ротаметр діоксиду вуглецю; шкала 0-10 scfh
RM5	Ротаметр повітря; шкала 0-2,5 scfh
RM6	Ротаметр діоксиду вуглецю; шкала 0-10 scfh
V1, V2, V3	Дросельний клапан на вході/виході WT1
V4, V5, V6	Дросельний клапан на вході/виході WT2
V7, V8, V9	Кульовий клапан на розподільній головці впуску сусла
V10, V11	Кульові клапани на отворі для впуску сусла в R1
V12	Клапан швидкого роз'єднання на отворі для впуску газу, який розпилюють
V13	Дросельний клапан на виході R1
V14, V15	Кульові клапани на вході в R2 для подачі сусла
V16	Клапан швидкого роз'єднання на отворі для впуску газу, який розпилюють
V17	Дросельний клапан на виході R2
V18	Дросельний клапан на вході WBT1
WBT1	Резервуар для збору відходів при виробництві пива; робочий об'єм 200л
WT1	Резервуар для збереження сусла, оснащений заповненими гліколем пристіночними кожухами і пристроями для розпилення; робочий об'єм 1600л
WT2	Резервуар для збереження сусла, оснащений заповненими гліколем пристіночними кожухами і пристроями для розпилення; робочий об'єм 1600л

Газоподібний діоксид вуглецю і повітря розпо-
рошували в газліфтній системі через трубчасті
розпилювачі газу з нержавіючої сталі (Фіг.7). Для
моніторингу швидкостей потоків, які ін'єктують у
систему, застосовували ротаметри (RM3, RM4,
RM5 та RM6). Для того, щоб гарантувати, що в
біореактори не будуть внесені забруднення, на
газові трубопроводи були встановлені стерильні
фільтри (розмір отворів 0,2мкм). Продукт випуска-

ли з реактора через зливну систему (Фіг.4). Таким
чином, за допомогою одного живильного насоса
контролювали час проходження рідини через апа-
рат. Обидва реактори (R1 та R2) були приєднані
до резервуару для збору відходів, що утворюється
при виробництві пива (WBT1), для збору рідини,
що витікає. Для збору продукту й обробки відпові-
дно до встановлених вимог використовували спе-
ціальні резервуари для збору об'ємом 50л.

Більш докладні схеми і точні розміри пілотного біореактора, що має об'єм 50л, приведені в розділі 5.1.1. Протокол обробки і збереження сусла представлений у розділі 5.1.2, а протоколи очищення і стерилізації стосовно системи безперервного бродіння описані в розділі 5.1.3. У розділі 5.1.4 наведений протокол процесу бродіння, використаний при роботі над даною дисертацією.

Конструкція реактора і специфікація

Біореактор, що має робочий об'єм 50л, створений при проведенні даного дослідження, був виготовлений повністю з нержавіючої сталі 304L і в його корпусі були чотири плексигласові вікна для того, щоб була можливість спостерігати рух часток і рідини. Матеріал конструкції був вибраний виходячи з вимог його стійкості до дії хімічних речовин (каустіку і кислоти), які використовують у санітарних цілях, а також його довговічності при стерилізації паром. Іншим важливим аспектом при розробці конструкції була мінімізація кількості фітингів, що мають різьбу, які знаходяться в безпосередньому контакті із середовищем, яке зброджують. На практиці порти присднували за допомогою зварювання і при необхідності використовували задовольняючі санітарним нормам фітинги типу TriClover. Реактор був спроектований таким чином, що він мав збільшену верхню частину (область над рідиною) для того, щоб максимізувати вихід газу і тим самим стимулювати більш інтенсивний перехід твердих продуктів у рідину (Chisti та Moo-Young, 1993). Нижня частина реактора була спроектована таким чином, щоб вона мала конічну форму з кутом розчину 90° для того, щоб мінімізувати кількість будь-яких твердих часток, що скопичуються на дні.

На Фіг.2 представлена схема пілотних систем об'ємом 50л, встановлених в експериментальному пивоварному заводі фірми Labatt (Labatt Experimental Brewery). На цій схемі зазначене положення отвору для впуску газу, який розпилюють, отвір для впуску рідини, що охолоджує кожух, який містить гліколь, отвір для випуску продукту, система вимірювання і контролю температури, а також положення двох портів для відбору зразків у санітарних цілях. На Фіг.3 представлена схема того ж GLDT-біореактора з зазначенням розмірів у сантиметрах. На Фіг.4-Фіг.6 представлені докладні креслення перетинів газліфтного біореактора об'ємом 50л з трубою для відсмоктування, а на Фіг.7 - схема пристрою для розпилення газу, що застосовували в зазначених експериментах.

На Фіг.3 показані внутрішня труба для відсмоктування і сепаратор часток (дефлектор). Діаметр труби для відсмоктування, що становить 2/3 діаметра реактора, був вибраний на основі літературних даних [Chisti, 1991]. Розмір сепаратора часток був вибраний таким, щоб як найкраще відокремлювати газ від суміші тверді частки - рідини. Шляхом збільшення діаметра цього дефлекто-

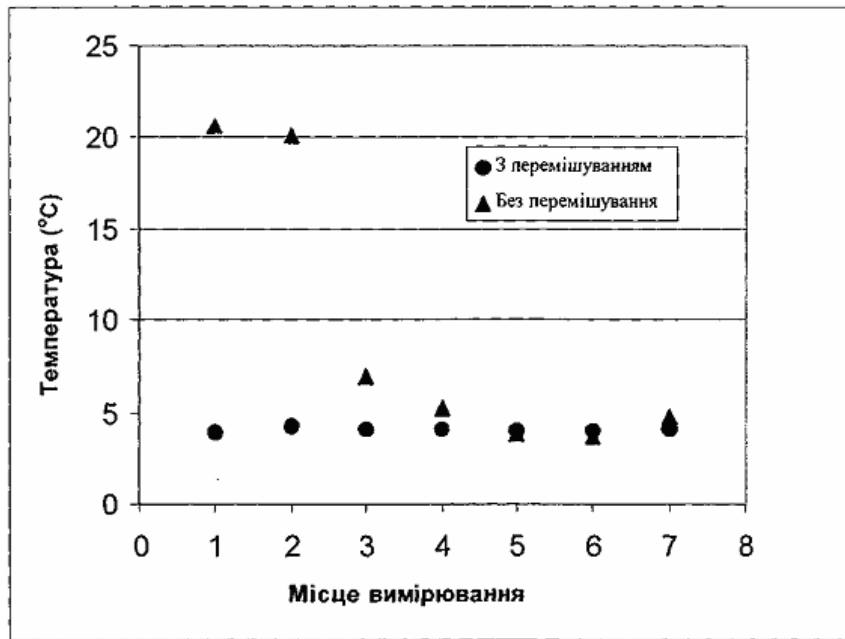
ра (20,32см у порівнянні з діаметром труби для відсмоктування, що становить 10,16см) можна досягати більшої різниці між швидкістю спливання бульбашок і швидкістю осадження суміші рідини - тверді частки. Зменшення надходження газу в кільцеву частину системи труби для відсмоктування поліпшує масообмін тверді частки - рідини.

Для ін'єкції призначеного для перемішування газоподібного діоксиду вуглецю в секцію труби для відсмоктування був сконструйований трубчастий розпилювач (Фіг.7). У розпилювачі діаметром 1,27см були просвердлені в цілому 160 отворів діаметром 0,16см. Отвори були розташовані з відстанями між центрами 0,8см у подовжньому напрямку і відстанями між центрами 0,6см по окружності (8 рядів по 20 отворів). Оскільки основною функцією газу, який розпилюють, є перемішування, то був вибраний діаметр отворів для розпилення, рівний 0,16см.

Протокол обробки і збереження сусла

При використанні традиційних методів збродження сусло не витримують протягом тривалих періодів часу без засівання дріжджами. Оксигеноване сусло являє собою дуже гарне живильне середовище для багатьох організмів, включаючи дріжджі. Оскільки протокол бродіння для безперервних газліфтних систем передбачає витримування великих кількостей сусла, виявилось необхідним розробити протоколи переносу і витримування сусла. Існувала думка фахівців, що неоксигеноване холодне сусло можна зберігати до двох тижнів без побоювання, що воно буде заражене, якщо сусло було перенесене відповідним чином у резервуар для витримування.

Вважалося також, що температуру сусла необхідно контролювати відповідним чином, коли воно знаходиться в резервуарі для витримування сусла. Придатні для використання резервуари, які мав Експериментальний пивоварний завод, споконвічно призначалися для бродіння, а не для витримування сусла. Було проведене тестування цих резервуарів у відношенні здатності підтримувати температуру рідини, що знаходиться в спокої. Приведені на Фіг.2 результати чітко свідчать про те, що ці резервуари не можна використовувати без перемішування, якщо потрібно підтримувати постійну температуру 4°C. У ці резервуари спочатку вносили сусло при температурі 4°C. Вимірювання температури проводили в декількох областях всередині резервуару для того, щоб одержати більш чітке уявлення про дійсну температуру. Після того, як рідини залишали в посудині на 24 години без перемішування, температура рідини поблизу кришки піднімалася приблизно до 20°C. Відбувалося також слабе підвищення температури рідини в середній частині резервуару ($\Delta T \sim 3^\circ$), у той час як температура в кінцевій частині резервуару залишалася близькою до вихідної, рівною 4°C.



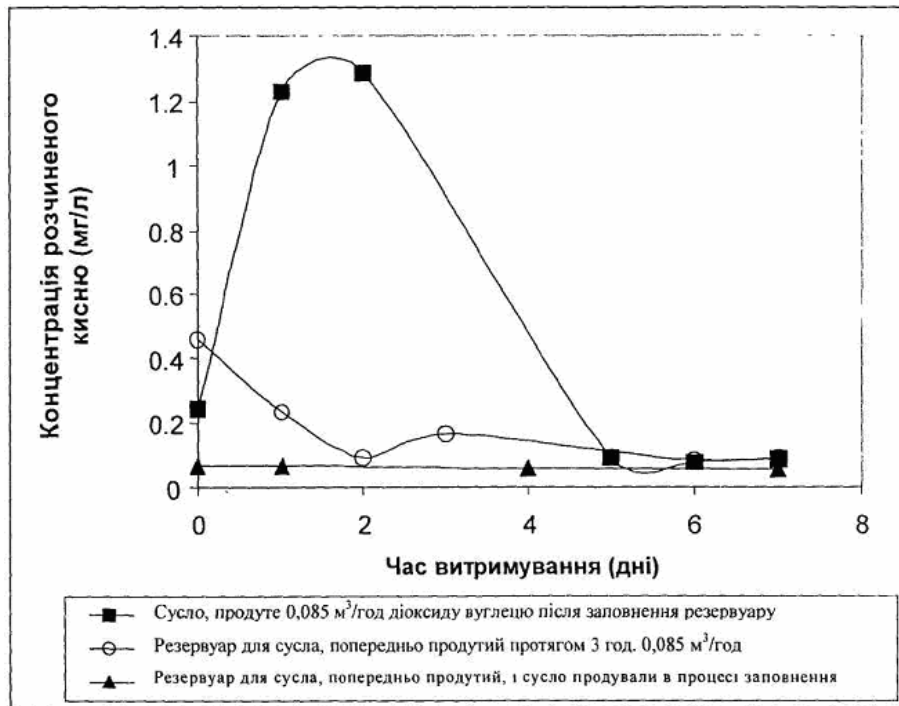
Фіг. 5.8 Вплив перемішування за допомогою розпилювання газу на профіль температури в резервуарі для витримання суслу, що має циліндричну форму з конічною нижньою частиною (циліндроконічний резервуар). Сусло вносили в резервуар при температурі 4°C. Вимірювання проводили через 24 годин після заповнення резервуару. Газоподібний діоксид вуглецю розпоршували в посудині з витратою 0,113см³/год. Температура навколишнього середовища становила 19,8°C. Області, у яких проводили вимірювання: (1) верхня частина резервуару поблизу стінки; (2) верхня частина резервуару в центрі; (3) середня частина резервуару поблизу стінки; (4) середня частина резервуару в центрі; (5) у верхній частині конічної ділянки поблизу стінки; (6) у верхній частині конічної ділянки в центрі; (7) на дні конуса

Шляхом слабого перемішування за допомогою ін'єкції діоксиду вуглецю з витратою 0,133см³/год, можна було підтримувати температуру суслу в резервуарі для збереження на рівні 4°C. На основі одержаних даних до основи конічної частини обох посудин для збереження були приєднані задовольняючі санітарним вимогам трубопроводи діаметром 2,54см, які використовували для перемішування.

Потім сусло, що не піддавалося аерації, яке надходить із заводу Labatt London, вносили через трубопровід з нержавіючої сталі діаметром 5,08см у буферний резервуар. З цього резервуару сусло пропускали через пастеризатор миттєвої дії і поміщали в один з резервуарів для збереження (WT1 або WT2), де його зберігали при 2°C до двох тижнів. Цю стадію пастеризації здійснювали як попереджувальну міру для того, щоб гарантувати відсутність небажаних мікроорганізмів у суслі протягом усього періоду витримання. При використанні неокисенованого суслу можна мінімізувати шкідливу дію кисню на гаряче сусло (утво-

рення альдегідів, що мають неприємний смак). Крім того, за допомогою повітря, що вводиться разом з газом, який розпилюють, можна здійснювати строгий контроль вмісту кисню у ферментах безперервної дії.

Вимірювання розчиненого кисню в суслі здійснювали безпосередньо всередині резервуару для витримання. На Фіг.5.9 представлено залежність концентрації розчиненого кисню в суслі від часу для трьох протоколів переносу. У першому варіанті сусло переносили в резервуар для витримання і для забезпечення відповідного контролю температури починали розпилення діоксиду вуглецю (0,085м³/год). Вміст розчиненого кисню протягом першого дня зростав до величини приблизно 1,3мг/л, а потім на п'ятий день знижувався приблизно до 0,1мг/л. У другому досліді резервуар для витримання суслу перед заповненням продували протягом 3 годин діоксидом вуглецю з витратою 0,85м³/год. Вихідний вміст кисню істотно зменшувався і через 2 дні одержували сусло з необхідною концентрацією кисню (<0,1мг/л).



Фіг 5.9. Контроль вмісту розчиненого кисню в суслі після одержання від Лондонського заводу. Три протоколи заповнення резервуарів оцінювали шляхом зіставлення з третім протоколом, що являв собою просто комбінацію перших двох методів. Температуру сусла підтримували на рівні 4°C.

В останньому досліді резервуар попередньо продували як описано вище і безупинно розпилювали діоксид вуглецю (0,085 м³/год) як у процесі заповнення, так і протягом періоду витримування. Протягом фази витримування вміст розчиненого кисню підтримували на мінімальному рівні (<0,1 мг/л). Згодом цей метод був прийнятий як протокол для всіх наступних зборів сусла.

5.1.2. Протокол очищення і стерилізації

Резервуари для витримування сусла піддавали циклу очищення, що включає попереднє промивання гарячою водою (85°C), що очищує, промивання каустиком (40%-ний розчин каустику при 60°C) і потім наступне промивання гарячою водою (85°C). Дезинфекцію цих резервуарів проводили шляхом обробки стінок розчином пероцтової кислоти (2% мас/об.). Трубопроводи системи подачі сусла піддавали такому ж процесу очищення і дезинфекції.

Для біореакторів об'ємом 50л застосовували інший протокол очищення і стерилізації. Системи промивали гарячою водою (60°C) і потім заповнювали доверху теплою водою (40°C). Потім у цю воду додавали використовуваний у промисловості очищуючий агент Diversol CX/A (фірма DiverseyLever, Канада) до одержання 2% мас/об., розчину. У нижню частину реактора вводили повітря із зведеною швидкістю газу 5 мм/с для забезпечення відповідного розчинення і відповідного контакту в реакторі. Після здійснення контакту протягом 1 години реактор спорожняли і заповнювали свіжою водопровідною водою. Цю процедуру очищення повторювали ще раз, і завершували двома циклами заповнення-спорожнювання холодною водопровідною водою.

Резервуар для відходів, що утворюються при

виробництві пива, очищали 2% мас/об., розчином Diversol CX/A. На відміну від газліфтих біореакторів розпилення не застосовували, оскільки WBT не був обладнаний розпилювачем. Механічне перемішування здійснювали шляхом перекочування цього резервуару на боці. Цикл повторювали двічі і потім здійснювали два цикли заповнення - спорожнення водою.

Перед стерилізацією парою біореактори об'ємом 50л приєднували до резервуару для відходів при виробництві пива, і від'єднували трубопровід подачі сусла, а також трубопровід подачі газу, який розпилюють. Клапани V10, V11, V12, V13, V14, V15, V16, V17 та V18 відкривали і видаляли фільтри F5, F6 і F7. Ці трубопроводи для подачі газу і фільтри автоклаували окремо протягом 15хв при 121°C. Систему подачі пари з'єднували з клапанами V12 і V16. Клапан подачі пари відкривали повільно для того, щоб мінімізувати ушкодження обладнання і здійснювали ретельне спостереження за температурою усередині реактора. Після досягнення температури 100°C проводили стерилізацію протягом 1 години. Спочатку закривали клапани V10, V11, V14, V15 і V18. Потім відключали подачу пари і приєднували стерилізований фільтр F7. Відразу після цього до трубопроводу подачі газу приєднували стерилізовані фільтри F5 і F6 і починали подачу газоподібного діоксиду вуглецю із зведеною швидкістю 3 мм/с. Цей потік газу не тільки гарантував, що реактори не деформуються при їх охолодженні, але і витісняв будь-які кількості повітря, що були присутні в газліфтих біореакторах об'ємом 50л.

Трубопровід подачі сусла підключали до біореактора після того, як температура усередині нього досягала 20°C. При закритих клапанах V2,

V5, V10 і V14 і відкритих клапанах V6, V7, V8, V9, V11 та V15 трубопровід подачі пару приєднували або до V3, або до V6 у залежності від того, який трубопровід для подачі суслу використовували. Обробку парю здійснювали протягом 1 години, після чого клапани V9, V11 та V15 закривали одночасно з припиненням подачі пари. Після того, як температура в трубопроводах досягала кімнатної температури (20°C), закривали клапани V3 та V6 і від'єднували систему подачі пари. З цього часу вся система безперервного бродіння, включаючи систему подачі суслу, біореактори об'ємом 50л і резервуар для відходів при виробництві пива, була стерилізована і готова для здійснення процесу бродіння.

5.1.3. Протокол бродіння

Для безперервного бродіння пивного суслу з одержанням пива застосовували пілотні газліфтні біореактори об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. Для підтримки температури рідини на рівні 15°C, яка була необхідна для проведення дослідів з бродіння, використовували тепловий кожух, що містить гліколь. Кожен реактор був оснащений температурним зондом для цілей вимірювання і термопарою й електромагнітним клапаном у системі подачі гліколю для регулювання подачі гліколю в реактор. Газліфтні ферментери були оснащені також системою подачі основного призначеного для перемішування газу (діоксиду вуглецю або азоту), а також повітря для здійснення дозування кисню. Необхідну газову суміш відбирали, використовуючи регулювання відповідної комбінації ротаметр/голчастий клапан, і потім цю газову суміш пропускали через стерильний фільтр (фірма Millipore, Millex®-FG50, фільтр із розміром отворів 0,2мкм) і вводили в трубу для відсмоктування біореактора. Для усіх варіантів бродіння газ вводили в реактор із зведеною швидкістю 0,39мм/с (0,4 scfh), при цьому швидкість потоку основного газу, призначеного для перемішування, регулювали так, щоб вона відповідала конкретному типу іммобілізації.

Перед початком безперервного процесу в газліфтний біореактор завантажували стандартну партію сировини. Після очищення і стерилізації як описано в розділі 5.1.2, у газліфтний біореактор завантажували 50л суслу з резервуарів для витримання суслу (WT1 або WT2) і потім ін'єктували 200г дріжджів (4г/л) через стерильний порт для зразків типу Scandi-Brew®. У варіанті з використанням гранул з к-карагінанового гелю в реактор ін'єктували 20л гранул, що забезпечувало початкову концентрацію помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021 4г/л. З біореакторів щодня відбирали зразки і здійснювали ретельний моніторинг за виділенням діацетилю і питомою вагою рідини. Як тільки питома вага досягала свого мінімального значення і концентрація діацетилю ставала менше 30мкг/л, то вважалося, що система готова для здійснення безперервного процесу.

Середовище (сусло), яке зброджують, безперервно підживлювали через дно реактора, у той час як «зелене» пиво витікало через ліжку у верхній частині реактора. Оскільки робочий об'єм реактора був фіксований, то шляхом вибору швидкості потоку, який подають в реактор свіжого суслу кон-

тролювали середній час перебування рідини в реакторі. Щодня з вихідного отвору через стерильний клапан для відбору зразків (Scandi-Brew®) відбирали зразки рідини з реактора для хімічних і мікробіологічних аналізів (методи описані в главі 4).

Через певні проміжки часу з основного біореактора об'ємом 50л, у якому відбувалося бродіння, відбирали великі кількості продукту, одержаного шляхом безперервного бродіння (у стерильні чани з нержавіючої сталі об'ємом 40л), і його піддавали обробці після бродіння для одержання кінцевого придатного для продажу пива з метою його оцінки і порівняння з пивом, одержаним промисловим методом, яке використовували як контроль. Вибраний біореактор об'ємом 50л від'єднували від резервуара для відходів при виробництві пива і відразу ж приєднували до резервуара для збору пива. Після збору необхідної рідини біореактор знову з'єднували з резервуаром для відходів при виробництві пива. Зібране «зелене» пиво після зброджування витримували протягом певного періоду часу для зниження рівня діацетилю нижче 30мкг/л. Дріжджам, перенесеним разом з рідиною, давали осадитися і рідину (концентрація клітин ~1-5млн. клітин/мл) поміщали в холодне сховище для дозрівання (7 днів при 2°C). Після періоду дозрівання рідину фільтрували, розбавляли до досягнення концентрації спирту 50б. % і насичували вуглекислим газом перед запаковуванням у пляшки для пива об'ємом 341мл. Потім усю партію упакованої рідини піддавали пастеризації за допомогою обладнання заводу фірми Labatt.

5.2. Безперервний процес виробництва гелевих гранул

Ціллю даного етапу експериментальної роботи було оцінити безперервний процес виробництва гранул з погляду виготовлення гелевих гранул з інокульованими клітинами дріжджів, призначених для внесення іммобілізованих клітин штаму дріжджів LCC3021 в описані в розділі 5.1 газліфтні біореактори безперервної дії об'ємом 50л з трубою для відсмоктування.

Процес виготовлення (Fig.8) передбачав насамперед одержання емульсії, що містить неводну безперервну фазу (рослинну олію) і водну дисперговану фазу (розчин к-карагінанового гелю, змішаного з клітинами дріжджів), за допомогою статичних змішувачів. Після цієї стадії здійснювали швидке охолодження для того, щоб індукувати гелеутворення полімеру. Потім гранули, що утворилися, вносили в розчин хлориду калію, що сприяло як отвердінню, так і виділенню гранул з олійної фази.

Отримання емульсії к-карагінанових гелевих гранул здійснювали при температурі 37°C, яку контролювали за допомогою водяної бані, для попередження передчасного гелеутворення карагінанового гелю. Стерилізований полімер витримували при температурі 37°C, яку підтримували за допомогою водяної бані, а інокулянт дріжджів витримували при 20°C до іммобілізації. За допомогою шлангових насосів типу Masterflex (фірма Cole Pamer Company, США), гель і суспензію дріжджів пропускали через 24 елемента статичного змішувача діаметром 6,4мм для рівномірного

диспергування клітин у гелі. У баню з гарячою водою накачували стерилізовану олію, що зберігалося при кімнатній температурі (з використанням шлангового насоса типу Masterflex), для того, щоб також досягти температури 37°C.

Підданий інокуляції полімер (водна фаза) потім змішували з олією (безперервна фаза) за допомогою іншого набору статичних змішувачів для одержання необхідної емульсії. Цю емульсію, що утворилася, швидко охолоджували до 5°C у бані вода/лід, ініціюючи гелеутворення крапель полімеру з утворенням гранул. Потім гранули переносили в стерильний розчин хлориду калію з концентрацією 22г/л, що сприяло їх отвердінню і виділенню з олійної фази. Застосовуване в цьому процесі олію використовували повторно, а водну фазу (гранули і розчин хлориду калію) переносили в окремий резервуар для класифікації по розмірах перед завантаженням у 50-літрові біореактори.

5.2.1. Статичний змішувач типу Kenics

Основним елементом у даному новому процесі виготовлення гранул були статичні змішувачі типу Kenics (фірма Cole Pamer Instrument Company, Нілс, Іллінойс, США). Вони складаються з ряду стаціонарних елементів, які знаходяться в трубі з внутрішнім діаметром, рівним діаметрові статичного змішувача. Ці елементи утворюють перехресні канали, що забезпечують розділення і повторне з'єднання рідини, що протікає в подовжньому напрямку через статичний змішувач. Крім того, ця система змішування стимулює поперечне руйнування тонких струмків, які утворюються в емульсії, що підвищує її гомогенність. У таблиці 5.2 перераховані три типи статичних змішувачів, що застосовували в даному дослідженні.

Таблиця 5.2

Опис застосовуваних статичних змішувачів типу Kenics (поставляються фірмою Cole Partner)

Модель	Діаметр статичного змішувача D (мм)	Кількість елементів (N _r)
G-04667-04	6,4	12
G-04667-06	9,5	12
G-04667-08	12,7	12

5.2.2. Матеріали для одержання гелю

Двома основними матеріалами, що використовували для одержання гелевих гранул, була олія і полімер κ-карагінан (тип X-0909, партія 330360, фірма Copenhagen Pectin, Данія), що являє собою полісахаридний полімер, екстрагований з червоної водорості, люб'язно наданий фірмою Copenhagen Pectin A/S. Цей полімер має унікальну властивість термогелеутворення, причому температура, при якій відбувається гелеутворення, залежить від концентрації як κ-карагану ([Kar]), так і хлориду калію ([KCl]). Полімер розчиняли при 80°C до концентрації 30г/л у дистильованій воді, що містить 2,0г/л KCl. Розчин гелю, що утворився, мав температуру гелеутворення 28°C. Гель автоклаували протягом 1 години при 121°C і потім поміщали у водяну баню при 40°C для того, щоб він не тверднув. Кукурудзяна олія з чистотою, що відповідає продукту, що надходить до продажу (фірма

Pasquale Bros. Inc., Канада) також стерилізували протягом 1 години при 121°C і потім зберігали при кімнатній температурі (20°C) до використання. Суспензію дріжджів підготовлювали як описано в розділі 4.1.

5.2.3 Вимірювання діаметра гранул

Зразки гранул збирали на виході теплообмінника при 5°C у колби, що містять 100мл розчину KCl з концентрацією 22г/л. Гранулам давали просочитися цим розчином протягом 2 годин для того, щоб стимулювати їх отвердіння. Олію видаляли з водної фази шляхом послідовних промивань розчином хлориду калію. Потім зразки зберігали при 4°C для попередження зараження мікроорганізмами до проведення аналізу.

Вимірювання діаметра гранул здійснювали за допомогою відеокамери (типу Pentax Macro 50мм), що працює з використанням програмного забезпечення для аналізу зображень Optimas (версія 4.02, фірма BioScan, Inc, США). Зразок гранул переносили в чашку Петрі, що містить тонкий шар води (який використовували для розділення гранул) і потім поміщали під камеру. Ця система дозволяла вимірювати 300-400 гранул. Програмне забезпечення Optimas дозволяє визначати розміри від 100мкм до декількох міліметрів з максимальною абсолютною погрешністю 30мкм. Потім дані, одержані за допомогою Optimas, аналізували з використанням програми Microsoft Excel. Одержані розподілення розмірів зразків виражали у вигляді середнього діаметра зразка (D_v) і коефіцієнта варіації (COV).

5.2.4 Оцінка системи гранул - план експерименту

Для оцінки того, який тип гранул (з погляду вимірюного розподілення середнього діаметра гранул і коефіцієнта варіації) можна одержувати, порівнювали характеристики 3 статичних змішувачів, що мають різні діаметри (D_s=6,4мм, 9,5мм і 12,7мм). Кількість елементів статичного змішувача (N_s) варіювалася від 12 до 120 елементів, а вивчена об'ємна фракція полімеру (ε_c) становила від 8,3 до 50об.% гелю в олійному розчині. При ε_c понад 50% диспергована (гель) і безперервна (олійна) фази міняються місцями, це означає, що крапельки олії виявляються включеними в полімерну матрицю, а гелеві крапельки включеними в олійну матрицю. Зведену швидкість рідини для емульсії олія/гель у секції, що містить емульсію, регулювали так, щоб вони становили від 3,6 до 17,8см/с. Зведену швидкість рідини (V_{SL}) в статичному змішувачі, що містить емульсію, розраховували за наступною формулою:

$$V_{SL} = (Q_{олія} + Q_{кар.}) / S$$

де S являє собою площу поперечного перерізу трубопроводу, у якому знаходиться статичний змішувач, Q_{олія} об'ємна витрата олійної фази, а Q_{кар.} являє собою об'ємну витрату розчину караганового гелю.

Результати й обговорення: бродіння і динаміка змішування в газліфтих біореакторах об'ємом 50л

Раніше було описано застосування іммобілізованих клітин для виробництва етанолу. В останні два десятиліття дослідники робили спроби оптимізувати процес виробництва етанолу шляхом

поєднання технології іммобілізованих клітин і процесу безперервної обробки [Kui, 1982; Gil, 1991; Maiorella, 1983]. Багато з них виявилися дуже успішними і системи безперервного виробництва з використанням іммобілізованих клітин застосовуються в промисловому масштабі для виробництва етанолу. Однак виявилось, що застосувати такий безперервний процес для основного бродіння пива в пивоварній промисловості не так просто. Пиво складається не тільки з етанолу, воно включає також величезну кількість смакових речовин, що додають складний і насичений смак кінцевому продукту. У наступній главі наведені одержані при створенні винаходу результати, що стосуються розробки способу одержання добре збалансованого пива в пілотному GLDT-ферментері.

6.1 Періодичне бродіння в пілотній GLDT-системі

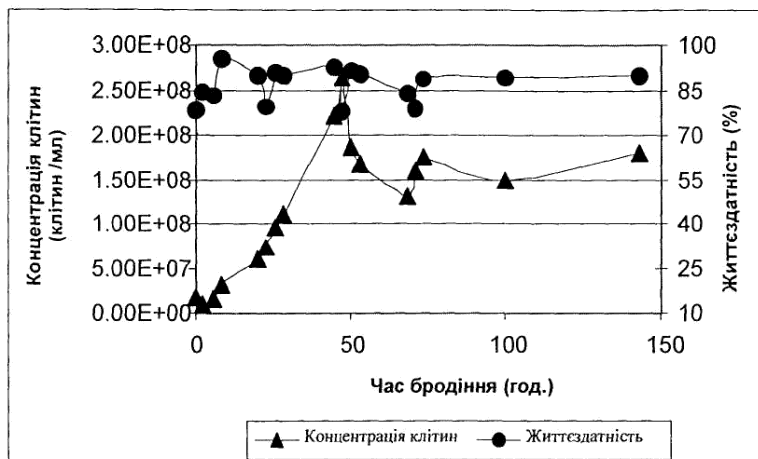
Періодичне бродіння з використанням вільно суспендованих клітин дріжджів проводили в 50-літровому пілотному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування. Результати цих дослідів дозволили оцінити придатність такої системи для зброджування сусла в пиво. Крім того, досліді дозволили визначити орієнтири для майбутнього порівняння з рідинами, отриманими шляхом безперервного бродіння. У біореакторі об'ємом 50л були проведені два досліді по періодичному бродінню з використанням лагерного штаму дріжджів, одержаного з колекції культур фірми Labatt (Labatt Culture Collection) (LCC3021). У процесі бродіння здійснювали моніторинг швидкості росту дріжджів, а також поглинання живильних речовин і виділення продуктів.

На Фіг.6.1 і 6.2 приведені профілі концентрації і життєздатності дріжджів для варіантів 1 і 2 періодичного бродіння відповідно. В обох випадках швидкість росту дріжджів відповідала класичним даним, описаним в літературі. Життєздатність, що оцінювали з використанням фарбування метиленовим синім, залишалась високою, її рівень був близький до 90%. Профілі концентрації вуглеводів для партій 1 і 2 представлені на Фіг.6.3 та 6.4. Спочатку дріжджі поглинали прості цукри, глюкозу і фруктозу, після чого відбувалося поглинання мальтози і мальтотетрози. Рівні мальтотетрози, а також більш великих полісахаридів у процесі бродіння не змінювалися.

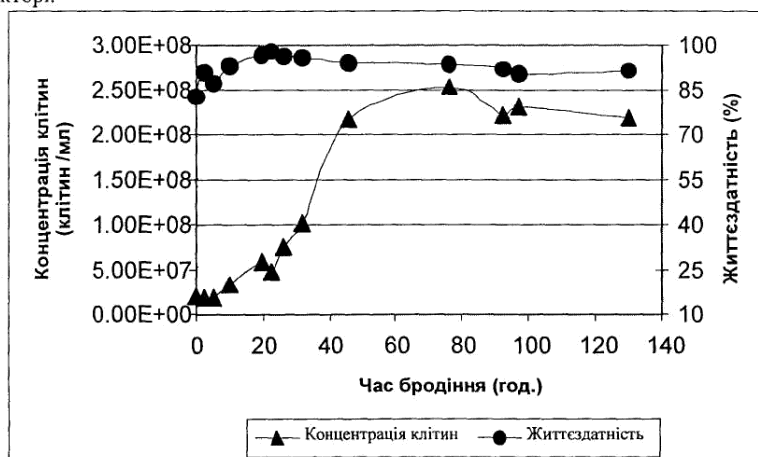
Етанол являє собою один з найбільш важливих побічних продуктів метаболізму дріжджів. В оптимізованих умовах анаеробного бродіння одержують приблизно 48г етанолу і 47г діоксиду вуглецю на 100г метаболізованої глюкози. При цьому утворюються також невеликі кількості гліцерину (3,3г на 100г глюкози), оскільки цей побічний продукт використовується в підтримці окислювально-відновного балансу дріжджів, які здійснюють бродіння, а також він підтримує осмотичний баланс клітин, насамперед у гіпертонічних середовищах. На Фіг.6.5 і Фіг.6.6 представлено дані про виділення етанолу і концентрації гліцерину в залежності

від тривалості бродіння. Рівні етанолу підвищувалися дуже повільно на початку процесу бродіння внаслідок присутності кисню в середовищі, яке зброджують, оскільки клітини дріжджів перебували в стадії їх аеробного росту. Після вичерпання кисню рівні етанолу зростали по експонентному закону до вичерпання цукрів, які зброджують, після чого зростання концентрації припинялося. Близькі за будовою дикетони також є дуже важливими побічними продуктами метаболізму дріжджів. Загальні концентрації діацетилю і пентандіону для партій 1 і 2 представлені на Фіг.6.7 і 6.8. Вміст цих сполук зростав у процесі зброджування приблизно протягом 40 годин, що відповідало максимальним рівням концентрації дріжджів, і воно було обумовлено синтезом амінокислот дріжджами на їх стадії росту. На останній фазі бродіння діацетил, пентандіон і їх попередники α -ацетолактат і α -кетобутират, перетворюються дріжджами в їх відповідні діоли, що мають менш виражений смак.

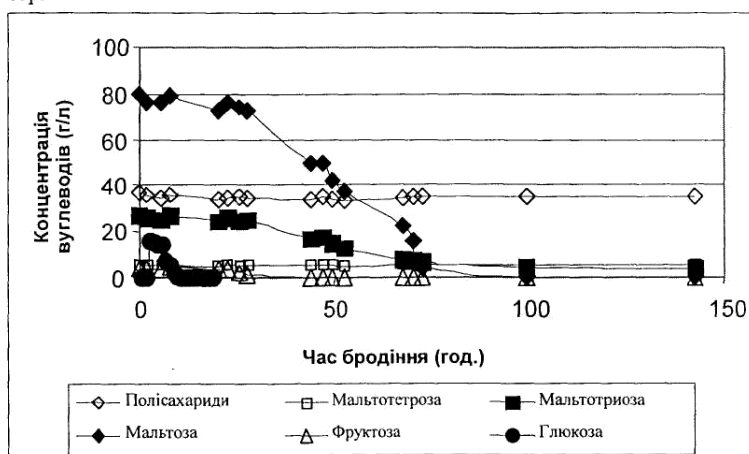
Результати, представлені в даному розділі, свідчать про те, що в обох випадках періодичний процес бродіння в газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування протікав нормально. Ріст дріжджів і поглинання вуглеводів, а також утворення побічних продуктів, етанолу, діацетилю і пентандіону відбувалися очікуваним чином. Зіставлення даних, одержаних для кожної партії, свідчить про те, що бродіння обох партій відбувалося практично однаково. На Фіг.6.9 представлено порівняння концентрацій етанолу, що утворився при бродінні партій 1 і 2. Індивідуальні криві мають той самий профіль і багато точок накладаються одна на одну, що характеризує рівень повторюваності. Хоча послідовність поглинання субстратів і наступного виходу продуктів не змінювалася при використанні газліфтною системи, швидкість зброджування зазнавала змін. Для обох партій завершення процесу основного бродіння, що характеризується піком концентрації етанолу, відбувалося через приблизно 80-85 годин. Зниження вмісту діацетилю до рівня нижче 30мкг/л відбувалося ще через 20 годин. Ці результати дозволяють припустити, що основне бродіння сусла з великою питомою вагою може бути закінчене протягом приблизно 100 годин на відміну від 120-168 годин при використанні традиційного періодичного процесу лагерного бродіння. Таке зменшення часу бродіння обумовлено перемішуванням, що відбувається в газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування, що приводить до посиленого переносу мас у таких системах. На основі цієї інформації подальші дослідження проводили з впевненістю в тому, що газліфтний біореактор із трубою для відсмоктування істотно не впливає на метаболізм дріжджів і що тривалість процесу бродіння вільно суспендованих дріжджів при використанні такої системи можна зменшити щонайменше на 20 годин.



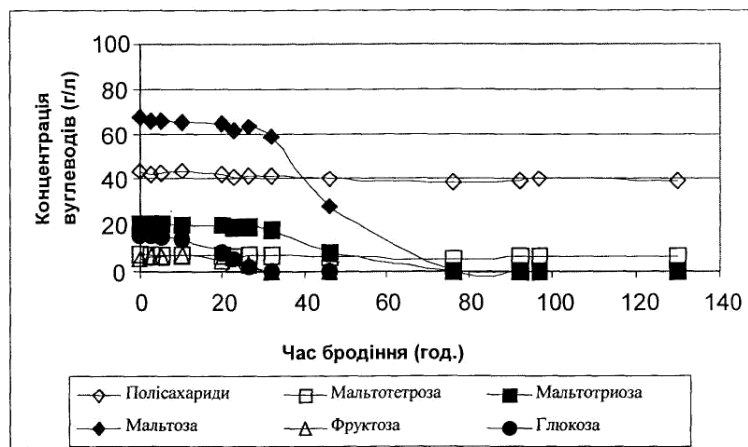
Фіг. 6.1 Залежність загальної концентрації і життєздатності клітин від часу бродиння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродиння 1 у пілотному GLDT-біореакторі.



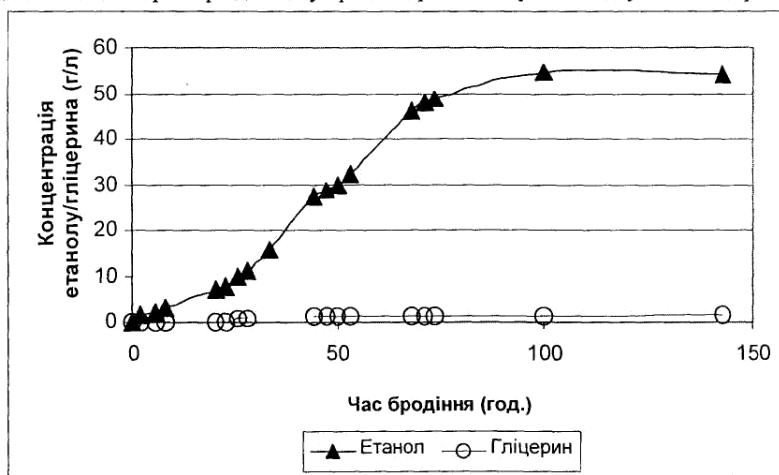
Фіг. 6.2 Залежність загальної концентрації і життєздатності клітин від часу бродиння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродиння 2 у пілотному GLDT-біореакторі.



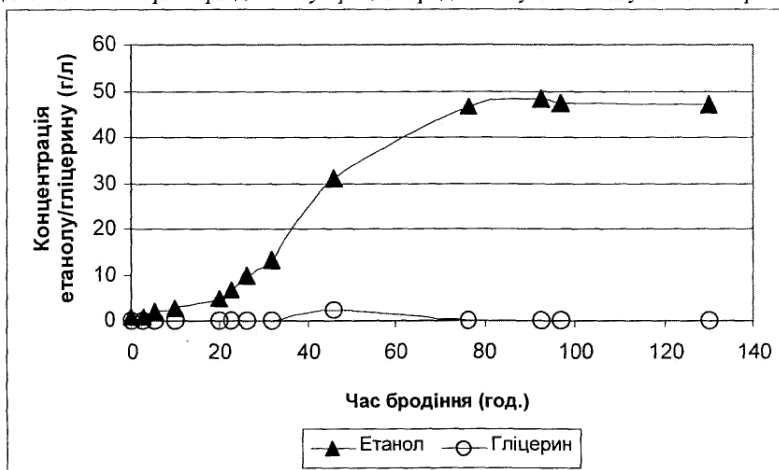
Фіг. 6.3 Залежність профілів концентрації вуглеводів від часу бродиння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродиння 1 у пілотному GLDT-біореакторі.



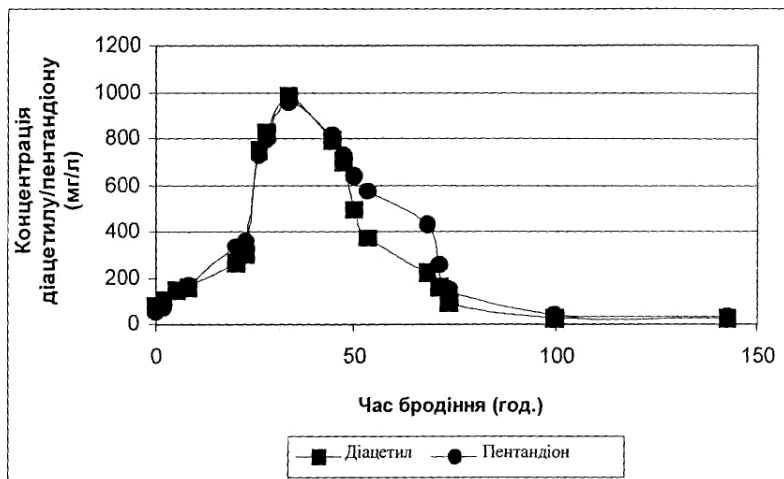
Фіг. 6.4 Залежність профілів концентрації вуглеводів від часу бродіння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродіння 2 у пілотному GLDT-біореакторі.



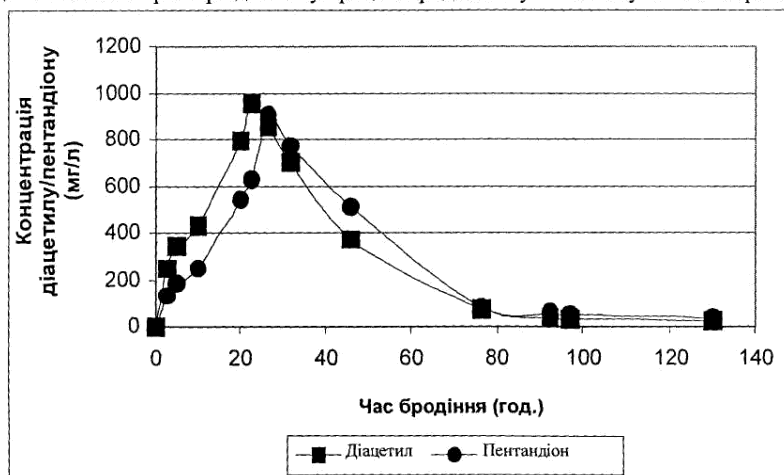
Фіг. 6.5 Залежність концентрацій етанолу і гліцерину від часу бродіння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродіння 1 у пілотному GLDT-біореакторі.



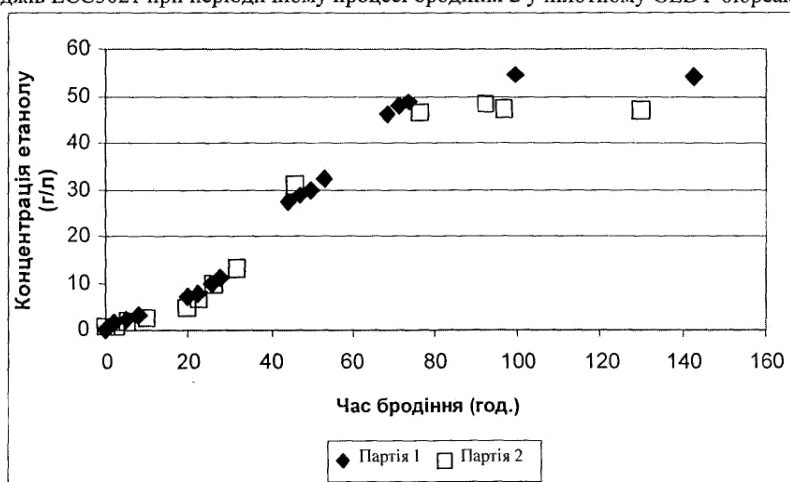
Фіг. 6.6 Залежність концентрацій етанолу і гліцерину від часу бродіння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродіння 2 у пілотному GLDT-біореакторі.



Фіг. 6.7 Залежність концентрацій діацети́лу і пентандіону від часу бродиння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродиння 1 у пілотному GLDT-біореакторі.



Фіг. 6.8 Залежність концентрацій діацети́лу і пентандіону від часу бродиння для штаму дріжджів LCC3021 при періодичному процесі бродиння 2 у пілотному GLDT-біореакторі.



Фіг. 6.9 Порівняння залежності концентрації етанолу для партії 1 і партії 2 від часу бродиння. Для пілотного GLDT-біореактора застосовували штам дріжджів LCC3021.

6.2 Імобілізуючі носії

При реалізації розглянутого дослідницького проекту були вивчені декілька носіїв з метою виявлення найбільш перспективних варіантів для наступних розробок. У газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування тестували три різні форми імобілізації. Оцінювали два, адсорбційних носія, що надходять до продажу, які мають розміри від 1 до 2мм. Тестували носій Siran®, що являє собою скляні гранули, які поставляються фірмою Schott Engineering (Fig.9), і Celite®, що являє собою гранули з діатомової землі, які поставляється фірмою World Minerals (Fig.10), внаслідок передбачуваної простоти їх використання і їх комерційної доступності. Носії адсорбційного типу дозволяють здійснювати операції в більш асептичних умовах, оскільки в реактор можна спочатку завантажувати носій, після чого на місці проводити стерилізацію і, нарешті, здійснювати інокуляцію дріжджів безпосередньо в реактор. З погляду промислового виробництва цей варіант є дуже привабливим, оскільки не потрібно створення спеціальних умов для збереження носія і для заводу не потрібно істотно змінювати технологію інокуляції.

Перші результати з бродіння в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування при використанні обох носіїв виявилися невтішними. Проблеми, які виникли, в основному були обумовлені високою густиною часток Siran® і Celite® у порівнянні з рідким середовищем. Трифазні газліфтні системи з трубою для відсмоктування працюють найкращим чином тоді, коли відношення густини носія і рідини близьке до одиниці. У випадку використання Siran® це відношення становило 1,34, а у випадку використання Celite® воно становило 1,31. Внаслідок таких великих розходжень густини твердої і рідкої фази було потрібно істотно збільшувати мінімальну швидкість псевдозрідження газу, необхідну для роботи газліфтного біореактора об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. При використанні 4л носія Siran® (що відповідає завантаженню твердими частками 80б.%), для забезпечення циркуляції була потрібна швидкість газу 21,5мм/с (швидкість залежить від діаметра труби для відсмоктування). Така висока швидкість газу не являла собою істотну проблему, коли тестування проводили у водному розчині, однак у тому випадку, коли як рідке середовище використовували сусло, то в газліфтній системі з трубою для відсмоктування (GLDT) виникав катастрофічний збій. Необхідна швидкість газу викликала надлишкове піноутворення в реакторі, що в підсумку приводило до зниження рівня рідини нижче труби для відсмоктування й істотно сповільнювало циркуляцію рідини і твердих часток. Збій, аналогічний тому, що відбувався при використанні Siran®, виникав і в тому випадку, коли як матеріал для імобілізації використовували Celite®. Одержані результати привели до того, що в подальших дослідках з бродіння з газліфтною системою обидва ці носії адсорбційного типу не застосовували.

З використанням носія захоплюючого типу, такого як к-карагінан, виявилось можливим заванта-

жувати систему твердими частками до 40об.% і для забезпечення псевдозрідження і наступної циркуляції була потрібна витрата газу приблизно 0,17 стандартних кубічних метрів на годину (зведена швидкість 5,8мм/с). Позитивні результати, одержані при роботі із системою, яка базується на використанні карагінанових гранул із захопленими клітинами дріжджів, пояснюються низькою густиною носія (приблизно 1100кг/м³) і як наслідок легкістю здійснення псевдозрідження. Аналогічно цьому необхідне завантаження твердими частками при використанні штаму самоагрегуючих дріжджів LCC 3021 (помірно флокулентний) і штаму LCC 290 (суперфлокулентний) одержували при швидкостях псевдозріджувачого газу приблизно 3мм/с, які необхідні для забезпечення необхідної циркуляції. У розділі 6.2.1 наведений більш докладний опис носія на основі к-карагінанового гелю, а в розділі 6.2.2 описаний процес утворення флокулатів самоагрегуючим штамом дріжджів LCC3021 і флокулатів, утворених штамом дріжджів LCC290, що оцінювали з погляду використання як матриці для імобілізації при безперервному процесі основного бродіння в GLDT-ферментері об'ємом 50л.

6.2.1. Гранули з к-карагінанового гелю

Методи імобілізації, які ґрунтуються на захопленні, передбачають включення клітин дріжджів у матрицю перед їх внесенням у резервуар для бродіння. Оскільки в даний час неможливо здійснювати інокуляцію в реакторі in-situ, необхідно одержувати такі гелеві гранули до початку процесу бродіння. В даний час невідомо, які впливи робить тривале зберігання на інокульовані гелеві гранули. Для мінімізації будь-яких можливих негативних впливів, пов'язаних із зберіганням, було прийнято рішення робити великі кількості гелевих гранул протягом короткого проміжку часу (8 годин). Для цієї цілі використовували описаний у розділі 5.2 процес одержання гранул з використанням статичного змішувача. В ідеальному варіанті гранули повинні були мати діаметри часток (D_p) від 0,8 до 1,4мм, при цьому коефіцієнт варіації (COV) розподілу розмірів повинен бути мінімальним. Для одержання необхідної кількості гранул, що мають необхідну консистенцію, виявилось необхідним відрегулювати деякі параметри процесу виготовлення гранул. У наступному розділі приведено узагальнення результатів вибору параметрів процесу виготовлення гранул, а в розділі 6.2.1.2 описані гранули, які застосовували в дослідках з використанням безперервного процесу бродіння.

6.2.1.1 Процес виготовлення гранул: вибір параметрів

Вибір параметрів процесу виготовлення гранул здійснювали у співробітництві з іншими дослідниками, при цьому в основному розглядалися наступні параметри процесу: діаметр статичного змішувача (D_s), кількість елементів статичного змішувача (N_s), зведена швидкість (V_{SL}) і об'єм полімерної фракції (ϵ). На Фіг.6.12-6.21 узагальнено результати, одержані при проведенні експерименту.

На Фіг.6.12 представлено типовий розподіл розмірів гранул, одержаних за допомогою процесу

з використанням статичного змішувача для іммобілізації клітин дріжджів у карагінановому гелі. У цьому прикладі використовували наступні параметри: діаметр статичного змішувача 12,7 мм, кількість елементів статичного змішувача 60, зведена швидкість рідини 10,5 см/с і об'єм полімерної фракції 0,25. Виміряний середній діаметр гранул становив 701 мкм із коефіцієнтом варіації 45%. Кумулятивний розподіл розмірів, проілюстрований на Фіг.6.13, очевидно, описується нормальним кумулятивним законом розподілу, розрахованим для зразка з використанням середнього значення і стандартного відхилення. Для перевірки відповідності нормального закону використовували метод Колмогорова-Смірнова (Kolmogorof-Smirnov) (Scheaffer і McClave, 1990). Було розраховано, що максимальна розбіжність між експериментальними даними й апроксимуючою залежністю (величина D у статистиці K-S) становила 0,0274. Величина модифікованого коефіцієнта D для даних, які описуються нормальним законом розподілу, повинна бути менше 0,895 при рівні значимості 95%. У розглянутому випадку розрахована величина модифікованого коефіцієнта D становила 0,174, що істотно менше граничного значення 0,895, і тому можна вважати, що одержані дані підпорядковуються нормальному закону розподілу.

Усі дані, одержані з використанням розглянутого процесу виготовлення гранул, характеризуються розподілом розмірів, що мають тільки один пік. Однак Poncelet із співробітниками (1992) виявили для альгінатних гранул, які одержували шляхом диспергування в резервуарі при перемішуванні, наявність сателітних піків та/або вторинного піка, що відповідає гранулам з діаметрами менше 200 мкм. Можливо, що більш дрібні гранули, що одержували відповідно до процесу за винаходом, просто втрачалися на стадії промивання гранул і тому не робили впливу на результати вимірювання розподілу розмірів, одержані при створенні винаходу.

Вплив зведеної швидкості рідини і діаметра статичного змішувача на середній діаметр гранул і коефіцієнт варіації розподілу розмірів представлено на Фіг.6.14 і 6.15 відповідно. Для всіх трьох діаметрів статичних змішувачів середній діаметр гранул зменшувався при збільшенні зведеної швидкості рідини, причому найбільш виражений вплив був виявлений при використанні статичного змішувача з діаметром 12,7 мм. При усіх вивчених швидкостях рідини в статичних змішувачах, що мають менший діаметр (6,4 і 9,5 мм), не відбувалося утворення гранул із середнім діаметром більше 700 мкм, у той час як у статичному змішувачі діаметром 12,7 мм при швидкості рідини менше 11 см/с відбувалося утворення гранул, що мають розмір більше 700 мкм. При використанні всіх трьох статичних змішувачів із зазначеними діаметрами одержували гранули, для яких коефіцієнти варіації розподілу розмірів становили від 38 до 58%. В усіх трьох випадках встановлено також, що при збільшенні швидкості коефіцієнт варіації зменшувався. Коефіцієнт варіації змінювався в залежності від діаметра статичного змішувача, причому його найменші значення одержували при використанні статичного змішувача з найменшим

діаметром.

При зведеній швидкості рідини 3,5 см/с об'єм полімерної фракції, очевидно, впливає на середній діаметр гранул, у той час як швидкості, що перевищують 7 см/с, практично не робили впливу при експериментальних значеннях α у діапазоні від 0,083 до 0,5 (Фіг.6.16). Об'єм полімерної фракції, очевидно, впливав або не робив ніякого впливу на коефіцієнт варіації при збільшенні приведених швидкостей рідини (Фіг.6.17).

На Фіг.6.18 та 6.19 представлений вплив зведеної швидкості рідини і кількості елементів статичного змішувача на середній діаметр гранул. При збільшенні швидкості рідини середній діаметр гранул зменшувався для усіх варіантів кількості елементів статичного змішувача (Фіг.6.18). При заданій швидкості рідини середній діаметр гранул був близький один до одного для всіх варіантів, що містять від 24 елементів до 120 елементів, у той час як з використанням конфігурації, що містить 12 елементів, одержували гранули, що мають більші діаметри, ніж при використанні п'яти інших тестованих конфігурацій. На Фіг.6.19 представлені також дані, що свідчать про те, що середній діаметр гранул досягає мінімуму при використанні більше 24 елементів статичного змішувача.

На Фіг.6.20 представлено вплив зведеної швидкості рідини на коефіцієнт варіації для ряду статичних змішувачів з різними кількостями елементів. Очевидно, що швидкість рідини не впливала на коефіцієнт варіації для всіх тестованих конфігурацій. Вплив кількості елементів статичного змішувача на коефіцієнт варіації був більш вираженим (Фіг.6.21). Коефіцієнт варіації зменшувався при збільшенні кількості елементів статичного змішувача і досягав мінімуму, що становить 45%, при 60 і більше елементах. Ці результати відносяться до приведених швидкостей рідини в діапазоні від 3,6 до 17,8 см/с.

Було зроблено припущення про те, що збільшення діаметра статичного змішувача (D_s) повинно приводити до неоднорідності зсувних зусиль у змішувачі, викликаючи збільшення дисперсії розмірів, що виражають за допомогою коефіцієнта варіації. У той же час збільшення D_s повинне зменшувати інтенсивність зсувних зусиль, приводячи тим самим до збільшення середнього діаметра гранул. Обидва ці ефекти були виявлені в експериментах з використанням статичного змішувача, що має найменший діаметр, який дозволяв одержувати гранули з найменшим середнім діаметром гранул (400-500 мкм) і найменшим коефіцієнтом варіації (приблизно 40%) або дисперсії розмірів.

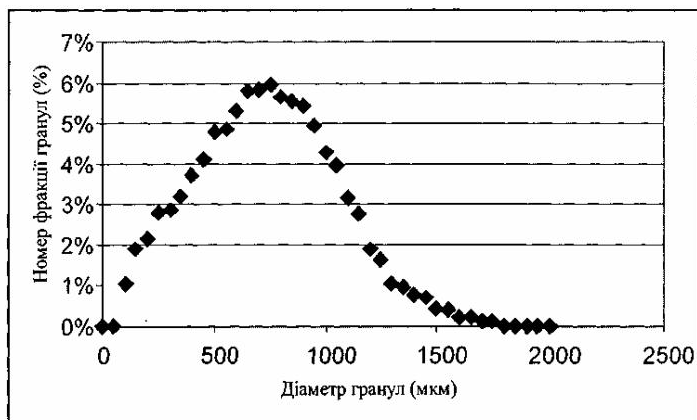
Енергія, необхідна для утворення емульсії, пропорційна площі міжфазної поверхні, утвореною полімерною і олійною фазами. Чим менше розмір гранул, тим більше енергії потрібно для їх утворення. Berkman і Calabrese (1988) встановили, що збільшення середньої зведеної швидкості рідини (V_s) викликає збільшення дисипованої енергії на одиницю маси рідини, що сприятливо з погляду зменшення розміру гранул. Збільшення середньої зведеної швидкості рідини (дослідження проводили в діапазоні від 3,6 до 17,8 см/с) приводило до зменшення середнього розміру гранул. Таке збільшення швидкості приводить до різниці тиску на

вході і на виході статичного змішувача. Ця різниця тиску пропорційна дисипованій енергії на одиницю маси рідини. Таким чином, підвищення швидкості викликає збільшення дисипованої енергії в системі, що сприяє зменшенню розміру гранул. При збільшенні приведених швидкостей рідини було виявлене зменшення діаметра гранул D_B . Al Taweel та Walker (1983) встановили, що при високих швидкостях, що відповідають значним рівням турбулентності, встановлюється динамічна рівновага між утворенням гранул і коалесценцією (злиттям) гранул. При постійному діаметрі статичного змішувача (D_S) і кількості елементів (N_S), зведена швидкість впливає на коефіцієнт варіації. Таким чином, швидкість є параметром, за допомогою якого можна регулювати і вибирати середній розмір гранул, не роблячи при цьому істотного впливу на дисперсію їх розмірів.

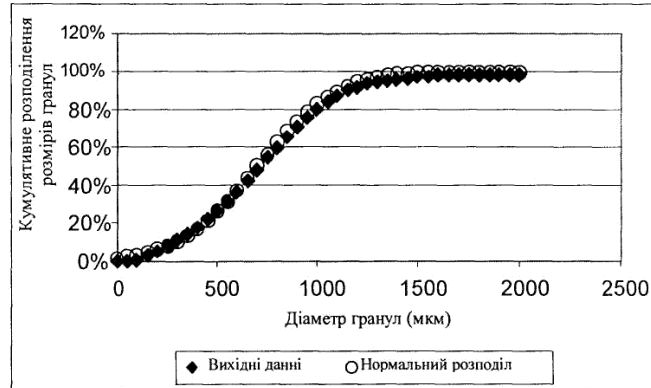
При створенні даного винаходу було встановлено, що об'єм фракції караганового гелю (ε_c) впливає як на середній діаметр гранул, так і на коефіцієнт варіації, за винятком випадку, коли випробування проводили при найменшій швидкості 3,6 см/с, при якій середній діаметр гранул зменшувався при зменшенні ε_c . Audet та Lacroix (1989) досліджували вплив цього параметра на виробництво караганових гранул у двофазній дисперсійній системі (періодичний процес з перемішуванням у резервуарі, але не безперервний процес з використанням статичного змішувача) і вони зробили висновок про те, що величина ε_c не робить впливу на середній діаметр гранул для розчину полімеру з концентрацією карагану 3%мас/об. Специфіч-

ний вплив концентрації к-караганового гелю на розподіл розмірів гранул було вивчено Audet та Lacroix (1989), що встановили, що цей параметр істотно впливає на розподіл розмірів. Підвищення концентрації гелю приводило до збільшення середнього діаметра гранул (D_B) і коефіцієнта варіації (COV). Зазначений вплив був обумовлений підвищеною в'язкістю гелю при більш високих концентраціях, що приводило до менших зсувних зусиль в емульсії і тим самим до утворення гранул більшого розміру. Хоча в даній дисертації вплив концентрації гелю на розмір гранул не вивчався, при необхідності цей фактор можна використовувати як ще один засіб контролю розміру гранул.

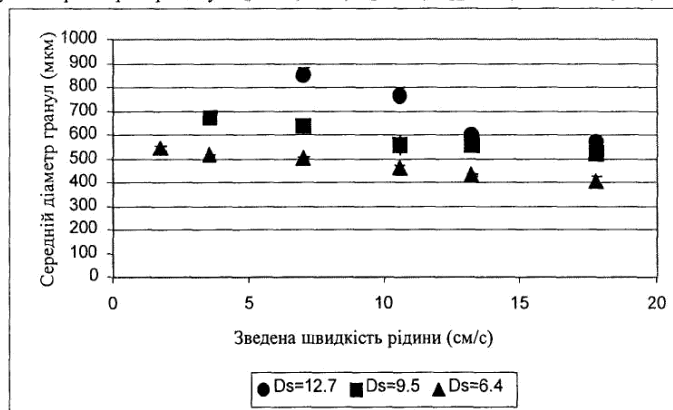
При збільшенні кількості змішувачів елементів (N_S) зростає середній час утримання, протягом якого рідкий компонент знаходиться в статичному змішувачі, що приводить до одержання більш гомогенної суміші і тим самим до утворення гранул, що мають менші розміри і більш диспергованих з більшою густиною. В експерименті було встановлено, що рівновага в дисперсії (яку оцінювали за допомогою коефіцієнта варіації) досягалася при використанні 60-72 елементів. Middleman (1974) встановив, що у випадку емульсій, що мають низьку в'язкість (0,6-1,0дП), для досягнення такої рівноваги досить 10 елементів. У розглянутих експериментах використовували карагановий розчин [3%мас./об.], що має середню в'язкість 200сП, а в'язкість олії становила 25дП. Таким чином, внаслідок більш високої в'язкості для досягнення псевдогомогенного стану був потрібен більш тривалий час утримання в змішувачі.



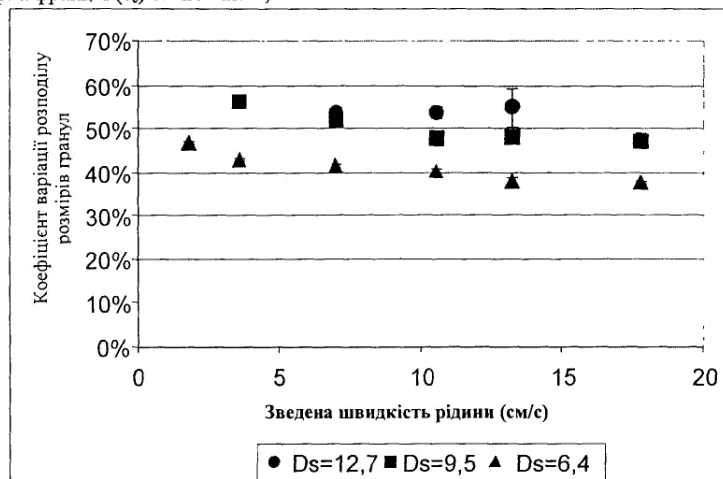
Фіг. 6.12. Типовий розподіл розмірів гранул, одержаних за допомогою процесу з застосуванням статичного змішувача. У цьому процесі використовувалися наступні параметри процесу: $D_S = 12,7$ мм, $N_S = 60$, $V_{SL} = 10,5$ см/с та $\varepsilon_c = 0,25$.



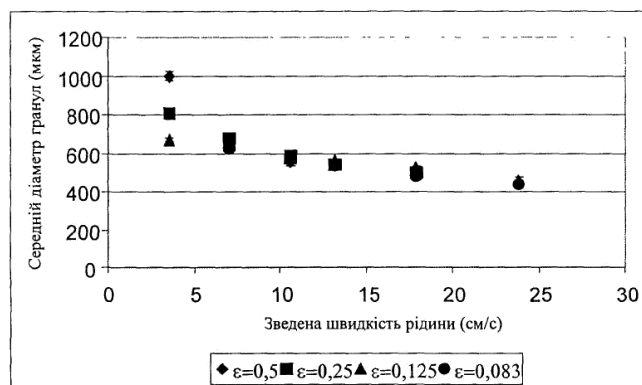
Фіг. 6.13. Типове кумулятивне розподілення розмірів гранул, одержаних за допомогою процесу з застосуванням статичного змішувача. У цьому процесі використовувалися наступні параметри процесу: $D_s = 12,7$ мм, $N_s = 60$, $V_{SL} = 10,5$ см/с та $\epsilon_c = 0,25$.



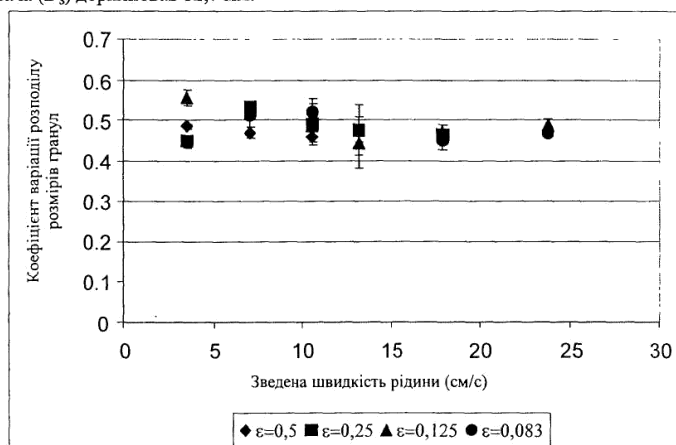
Фіг. 6.14. Залежність середнього діаметра гранул (μm) від зведеної швидкості рідини (см/с). Оцінювали три статичні змішувачі з різними діаметрами ($D_s = 12,7$ мм, 9,5 мм і 6,4 мм). Кількість елементів статичного змішувача (N_s) була постійною і становила 48, а полімерна фракція (ϵ_c) становила 0,25.



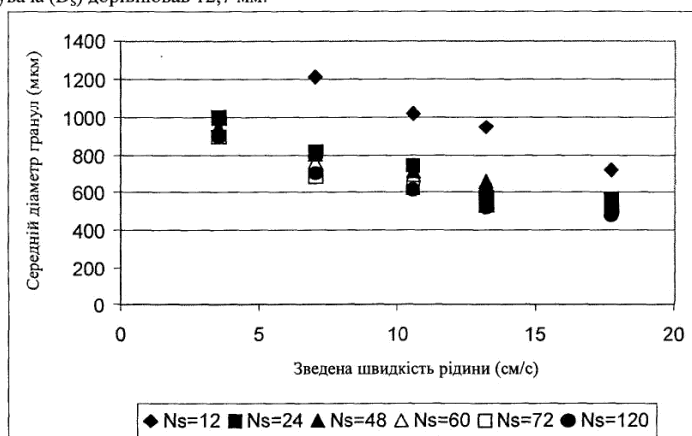
Фіг. 6.15. Залежність коефіцієнта варіації діаметра гранул (%) від зведеної швидкості рідини. Оцінювали три статичних змішувача з різними діаметрами ($D_s = 12,7$ мм, 9,5 мм та 6,4 мм). Кількість елементів статичного змішувача (N_s) була постійною і становила 48, а полімерна фракція (ϵ_c) становила 0,25.



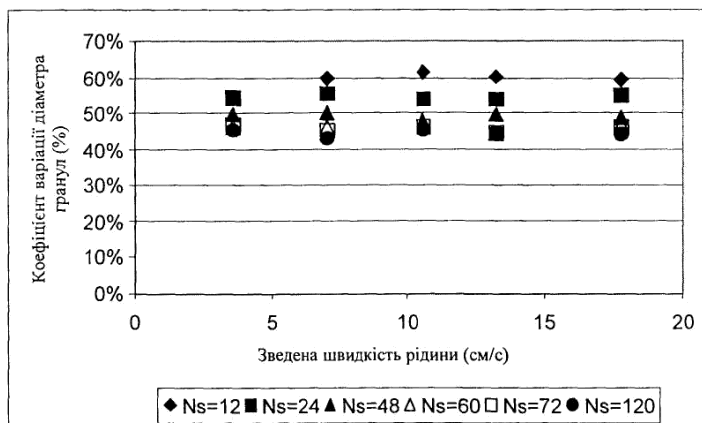
Фіг. 6.16. Залежність середнього діаметра гранул (мм) від зведеної швидкості рідини (см/с). Оцінювали чотири полімерні фракції ($\epsilon_c = 0,5, 0,25, 0,125$ і $0,083$). Кількість елементів статичного змішувача (N_s) була постійною і становила 48, а діаметр статичного змішувача (D_s) дорівнював 12,7 мм.



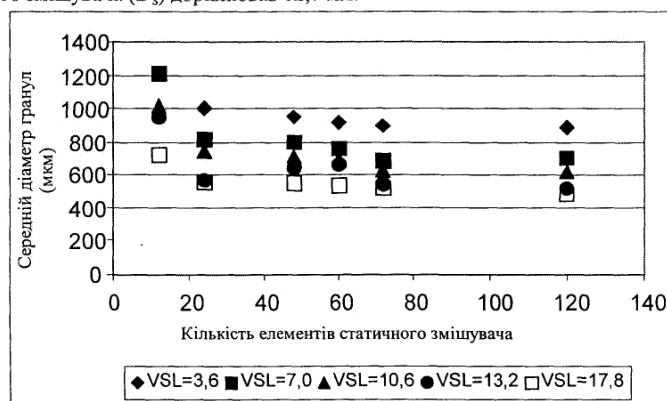
Фіг. 6.17. Залежність коефіцієнта варіації діаметра гранул (%) від зведеної швидкості рідини (см/с). Оцінювали чотири полімерні фракції ($\epsilon_c = 0,5, 0,25, 0,125$ і $0,083$). Кількість елементів статичного змішувача (N_s) була постійною і становила 48, а діаметр статичного змішувача (D_s) дорівнював 12,7 мм.



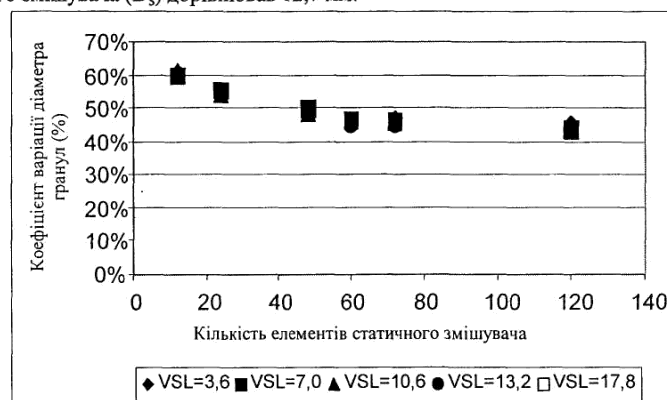
Фіг. 6.18. Залежність середнього діаметра гранул (мм) від зведеної швидкості рідини (см/с). Варіювали кількість елементів статичного змішувача (N_s), вона становила 12, 24, 48, 60, 72 та 120. Полімерну фракцію (ϵ_c) підтримували на постійному рівні 0,25, а діаметр статичного змішувача (D_s) дорівнював 12,7 мм.



Фіг. 6.19. Залежність коефіцієнта варіації діаметра гранул (%) від зведеної швидкості рідини. Варіювали кількість елементів статичного змішувача (N_s), вона становила 12, 24, 48, 60, 72 та 120. Полімерну фракцію (ϵ_c) підтримували на постійному рівні 0,25, а діаметр статичного змішувача (D_s) дорівнював 12,7 мм.



Фіг. 6.20. Залежність середнього діаметра гранул (мкм) від кількості елементів статичного змішувача (N_s). Варіювали зведену швидкість рідини (см/с), вона становила 3,6, 7,0, 10,6, 13,2 та 17,8. Полімерну фракцію (ϵ_c) підтримували на постійному рівні 0,25, а діаметр статичного змішувача (D_s) дорівнював 12,7 мм.



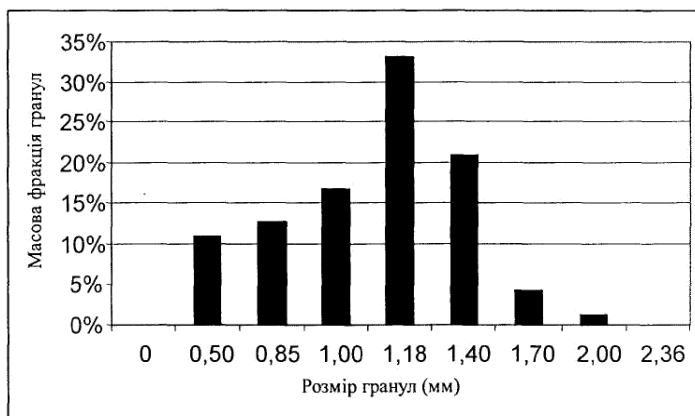
Фіг. 6.21. Залежність коефіцієнта варіації діаметра гранул (%) від кількості елементів статичного змішувача (N_s). Варіювали зведену швидкість рідини (см/с) у діапазоні від 3,6 до 17,8. Полімерну фракцію (ϵ_c) підтримували на постійному рівні 0,25, а діаметр статичного змішувача (D_s) дорівнював 12,7 мм.

6.2.1.2 Процес виготовлення гранул: характеристики к-карагінанових гранул

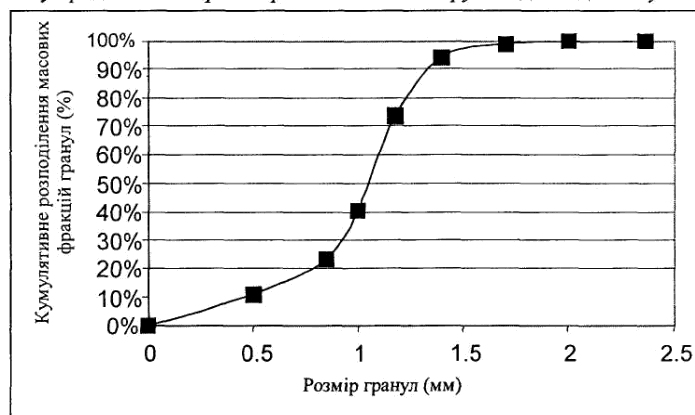
На основі приведених у попередньому розділі даних виявилось можливим вибирати параметри процесу виготовлення гранул, що забезпечують одержання гранул, які мають необхідні характеристики для дослідів з бродіння. Для мінімізації коефіцієнта варіації для конкретного діаметра статичного змішувача, що використовували для одержання дисперсії олія - гель, була вибрана кількість змішувачих елементів рівна 60. Для мінімізації переносу зовнішньої маси і полегшення відділення механічним шляхом від рідини, у якій відбувалося бродіння, був вибраний середній розмір гранул, що становить приблизно 1 мм. Для досягнення цього були обрані змішувач, що має найбільший розмір з числа тестованих змішувачів (12,7 мм), і найменша швидкість у досліджуваному діапазоні швидкостей (3,6 см/с). Оскільки полімер-

на фракція істотно не впливала на коефіцієнт варіації, то для того, щоб максимізувати продуктивність при виготовленні гранул використовували співвідношення 50/50 ($\varepsilon=0,5$) гелю до олії.

З використанням процесу, описаного в розділі 5.2, при зазначених параметрах $D_s=12,7$ мм, $N_s=60$, $V_{sl}=3,9$ см/с і $\varepsilon=0,5$ у лабораторних умовах були одержані кілька партій гелевих гранул, що несли захоплені клітини штаму дріжджів LCC3021. Одержані гранули (Фіг.11) пропускали через ряд сит для вилучення гранул, розмір яких перевищував 2,0 мм і гранул, розмір яких був менше 0,5 мм. Одержаний розподіл розмірів часток представлено на Фіг.6.23. На Фіг.6.24 представлено кумулятивний розподіл розмірів зазначених гранул. Ці дані характеризують типовий розподіл, що одержували в досліді з використанням газліфтного ферментера об'ємом 50 л.



Фіг. 6.23. Розподіл розмірів гранул з к-карагінанового гелю, що одержували в досліді по безперервному бродінню в біореакторі об'ємом 50 л з трубою для відсмоктування.



Фіг. 6.24. Кумулятивне розподілення розмірів гранул з к-карагінанового гелю, що одержували в досліді по безперервному бродінню в біореакторі об'ємом 50 л з трубою для відсмоктування.

6.2.1.3 Обмеження, що накладаються на процес виготовлення гранул, з погляду застосування для промислового виробництва

Був розроблений і впроваджений на рівні пілоотної установки процес, що дозволяє виготовляти з

використанням статичного змішувача 10 л гранул на годину. Деякі характеристики цього процесу вимагають подальшого вдосконалення та/або оптимізації перед тим як можна буде розглядати його застосування для виробництва гранул у промис-

ловому масштабі. Необхідно збільшити об'ємну продуктивність системи для того, щоб забезпечувати постачання необхідного об'єму іммобілізованих клітин для біореактора великого масштабу. Наприклад, для газліфтного біореактора об'ємом 2000гл (2000 гектолітрів) із трубою для відсмоктування буде потрібно приблизно 800гл гранул. Для досягнення таких об'ємів необхідно збільшувати як потік гелю, так і потік олії. Одержані дані дозволяють зробити висновок про те, що при використанні статичних змішувачів з діаметрами 6,4-12,7мм одержуване збільшення швидкості індукує утворення гранул недостатньо ефективно для того, щоб його можна було застосовувати в системі бродіння. Отже необхідно збільшувати діаметр статичних змішувачів, тим самим збільшуючи середній діаметр гранул. Однак застосування статичних змішувачів з великим діаметром приводить також до збільшення дисперсії розмірів гранул, у результаті чого підвищується відсоток гранул, що мають розміри, які виходять за необхідні межі.

Іншим альтернативним варіантом може бути застосування системи, яка базується на використанні статичних змішувачів середнього розміру (12,7мм), що працюють паралельно. При використанні десяти статичних змішувачів можна забезпечувати продуктивність, що становить 100л/год. Для одержання необхідного об'єму гранул у використуваному як приклад промисловому біореакторі об'ємом 2000гл процес повинен продовжуватися безупинно протягом 800 годин або приблизно 34 дні. Можна застосовувати кілька систем для зменшення часу одержання, однак це приведе до збільшення складності процесу. Тривалість виробництва можна було б зменшити, якщо було б можливо зберігати гранули протягом тривалих періодів часу, зберігаючи життєздатність дріжджів. Є підстави припускати, що можна розробити процес сушіння гранул або зберігання гранул у герметичному контейнері.

Poncelet із співробітниками (1993) опублікували роботу, з якої випливає, що можна використовувати змішувачі статичного типу, які застосовуються для створення дисперсій. За допомогою запропонованої ними системи, яка базується на використанні іншого типу статичного змішувача, відмінного від змішувача типу Kenics, що застосовували при проведенні даного дослідження, можна використовувати змішувач більшого діаметра, не погіршуючи розподіл розмірів гранул (зберігаючи низький коефіцієнт варіації).

Додаткові проблеми, що виникають при використанні розробленого пілотного процесу, пов'язані з роботою системи при 40°C і застосуванням розчинів рослинної олії і хлориду калію для виготовлення гранул. Через високу температуру, необхідну для виготовлення, при реалізації процесу потрібні як системи нагрівання, так і системи охолодження. Вимагає додаткового вивчення можливий тепловий шок, якому піддаються клітини дріжджів, при цьому варто зробити оцінку його можливого негативного впливу. У розглянутому дослідженні одержували гранули з іммобілізованими клітинами, що мали високу життєздатність (більше 90%), однак не оцінювали будь-які інші впливи, що даний процес може робити на популя-

цію дріжджів.

Оскільки для одержання необхідної емульсії і наступного утворення гранул використовували олія й оскільки олія може діяти як поверхнево-активна речовина, придушуючи утворення піни, то в результаті на поверхні гранул присутній залишок олії. Хоча цей залишок може виявитися корисним на стадії бродіння, перенос будь-якої його кількості в кінцеве пиво є шкідливим, оскільки для кінцевих продуктів потрібна здатність до піноутворення. Вимагає вивчення застосування значних об'ємів розчину хлориду калію, що використовуються для відділення твердої фази (гранул) від олії, і метод відділення цього соляного розчину від суспензії гранул перед внесенням гранул у біореактор. Інакше може виявитися необхідним вимивати цей розчин з реактора після додавання гранул у реактор.

Оскільки гранули з іммобілізованими клітинами одержують поза біореактором, то процес утворення гранул необхідно здійснювати з використанням асептичних методів і підтримувати стерильність до внесення гранул у біореактор. У різних вузлах системи переносу між резервуарами може бути можливість забруднення й у них необхідно здійснювати моніторинг внаслідок того, що наявність забруднення може приводити до їх спільної іммобілізації (разом із дріжджовими клітинами) у гранулі. У результаті спеціальних заходів, прийнятих у лабораторії, можна одержувати практично асептичні гранули. Однак навколишнє середовище в заводських умовах може бути не таким сприятливим, як у лабораторії, тому необхідний більш строгий контроль.

6.2.2 Клітини флокулентних дріжджів

Однією з найбільш природних форм іммобілізації є самоагрегація мікроорганізмів з утворенням флокулятив клітин. Calleja та Johnson (1977) запропонували три можливі засновані на різних властивостях зв'язування механізми, що приводять до того, що клітини приходять у контакт одна з іншою і утворюють агрегати. Перший механізм відноситься до клітин різних статей, які приваблюють одна одну шляхом вивільнення феромонів (α - і а-факторів). Цей тип зв'язування є тимчасовим і оснований на утворенні зв'язку протеїн-протеїн між α - і а-аглютинінами, заякореними в стінках комплементарних клітин.

Агрегація клітин може відбуватися внаслідок їх нездатності відокремлюватися від материнської клітини в процесі брунькування. Відсутність такої здатності може бути властива конкретному штаму дріжджів або може викликатися вичерпанням живильних речовин або мутацією багатьох генів. Цей феномен називається утворенням ланцюга, а не флокуляцією. Зв'язки між такими клітинами можна незворотно руйнувати за допомогою механічного зсуву [Stratford, 1996].

Третій механізм більш широко відомий під назвою флокуляція. Stewart та Russell (1981) визначили флокуляцію як оборотний "процес, при якому клітини дріжджів злипаються в згустки та/або швидко осаджуються із середовища, у якому вони суспендовані, або піднімаються до поверхні середовища". Є численні докази того, що флокуляція контролюється на генетичному рівні і механізм

флокуляції оснований на певних молекулах, що діють як містки між сусідніми стінками клітин. Більш конкретно, передбачається, що певні лектини зв'язуються з α -маннанами клітин, що з'єднуються, у присутності іонів Ca^{2+} (Calleja та Johnson, 1977). Встановлено, що таке зв'язування типу протеїн/вуглевод можна оборотно інгібувати за допомогою хелатуючих агентів або певних цукрів.

На Фіг.12 приведені три можливі конфігурації клітин дріжджів, а саме, пілоподібних дріжджів, дріжджів, що утворюють ланцюги, і флокулюючі дріжджі. У випадку дріжджів, що утворюють ланцюги, хоча і відбувається агрегація клітин, вона не розглядається як флокуляція, оскільки такі клітини на початку процесу не бувають одиночними, а флокуляція припускає, що одиночні клітини (у присутності іонів Ca^{2+} і при низьких рівнях інгібуючих цукрів) поєднуються, утворюючи групу. У випадку флокулюючих клітин конкретний розмір флокуляту може залежати від генетики клітини, а також від гідродинамічних умов середовища, яке оточує клітину (від зсувних зусиль у навколишньому середовищі).

На Фіг.13 і Фіг.14 представлені два штами лагерних дріжджів фірми Labatt, що мають різну флокулентну здатність. На Фіг.13 представлений штам дріжджів LCC3021, який має помірну флокулентну здатність (помірно флокулентний). Після вичерпування глюкози в рідкому середовищі в присутності іонів кальцію цей штам утворює агрегати розміром 0,5-1,0мм. На Фіг.14 представлений суперфлокулентний штам дріжджів LCC290, що утворює флокуляти розміром більше 1мм і в умовах навколишнього середовища з низькими зсувними зусиллями може з'єднуватися в згустки діаметром до 5мм. В умовах помірного перемішування діаметр флокулятів LCC290 становить 1-2мм.

Для оцінки флокуляції дріжджів були запропоновані кілька методів вимірювання [Spreers та Ritcey, 1995; Akiyama-Jibiki та ін., 1997; Teixeira та ін., 1991; Stewart та Russell, 2000]. У "Brewer's Yeast" [Stewart та Russell, 2000] було запропоновано всі методи оцінки флокуляції дріжджів розділити на три категорії, а саме, методи седиментації, методи статичного зброджування і методи безпосереднього спостереження за утворенням флокулятів у живильному середовищі.

Метод седиментації, вперше описаний Burns у 1937 році, був модифікований Helm із співробітниками в 1953 році і в даний час є частиною стандартних методів, затверджених Технічним комітетом і Редакційним комітетом Американського товариства хіміків - пивоварів (1992). Цей метод називають методом *in vitro*, оскільки характеристики осадження дріжджів оцінюють у кальцій-сульфатному буфері, а не в умовах реального зброджуваного середовища. Метод статичного бродіння (відомий також як метод Gilliland) полягає у вирощуванні дріжджів в охмеленому суслі і вимірюванні характеристик флокуляції *in vivo*. В обох цих методах використовується порівняння результатів вимірювань абсорбції зразків осаджених дріжджів та дріжджів, які піддали дефлокуляції, за допомогою УФ/оптичного спектрофотометра.

Stewart і Russell (2000) запропонували метод

вимірювання флокуляції дріжджів шляхом візуальної оцінки рівня флокуляції, яка відбувається в зразках при вирощуванні в скляних пробірках об'ємом 20мл із кришкою, що загвинчується. Для оцінки ступеня флокуляції вони використовували суб'єктивну шкалу, наприклад: 5 - винятково високофлокулентний, 4 - дуже флокулентний; 3 - помірно флокулентний, 2 - слабофлокулентний, 1 - злегка флокулентний і 0 - нефлокулентний. Відповідно до цієї класифікації суперфлокулентний штам дріжджів LCC290 був віднесений до категорії 4 - дуже флокулентний, у той час як штам дріжджів LCC3021 був віднесений до категорії 3 - помірно флокулентний.

Флокулентність є важливою характеристикою в пивоварній промисловості, оскільки властиву дріжджам тенденцію або осаджуватися, або підніматися на поверхню, як правило використовують у методі відділення цих дріжджів від рідини, яку зброджують. Однак небажано застосовувати штам дріжджів, що флокулює до завершення бродіння, оскільки в рідині ще не досягнутий ідеальний вміст спирту і залишкового цукру. При безперервному бродінні і, зокрема, при безперервному бродінні в газліфтній системі з трубою для відсмоктування, флокулюючі дріжджі діють як іммобілізуюча матриця. Їх тенденцію до осадження компенсують шляхом інжекції газу, який розпилюють, що утримує їх у суспензії. При використанні такої системи усувається небезпека неповного зброджування рідкого середовища, оскільки відбувається безперервна циркуляція твердих часток і вони знаходяться в щільному контакті із рідиною, яку зброджують.

У розділі 6.2.2.1 описані характеристики осадження і здатність до бродіння суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290. Представляло інтерес встановити початок флокуляції для цього конкретного штаму дріжджів. Крім того, визначали швидкість осаження дріжджів для одержання корисної інформації, яку можна використовувати в майбутньому при розробці резервуарів для осаження дріжджів.

6.2.2.1 Визначення характеристик суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290

Перед здійсненням дослідів по безперервному бродінню в газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування з використанням суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290 характеристики дріжджів при бродінні визначали в лабораторних колбах, які струшуються. На Фіг.6.28 представлено розвиток популяції дріжджів з часом. Як і варто очікувати, концентрація різко збільшувалася протягом перших 48 годин, потім її рівень трошки зменшувався аж до закінчення процесу бродіння. Протягом перших 48 годин у суслі була присутня достатня кількість живильних речовин і кисню, що забезпечують ріст дріжджів. Однак, коли дріжджі продовжували поглинати вуглеводи у відсутності кисню, вони переставали розмножуватися і вступали у фазу анаеробного бродіння. Після вичерпування запасу вуглеводів частина популяції дріжджів починала вимирати. Це явище проілюстроване на Фіг.6.29, де видно, що життєздатність клітин знижувалася від приблизно 97% до рівня, що небагато перевищує 90%.

На Фіг.6.30 представлено дані про поглинання вуглеводів у процесі бродіння. Клітини дріжджів спочатку поглинали прості цукри, глюкозу і фруктозу, а потім послідовно поглинали мальтозу і мальтотриозу. Однак пивні дріжджі не можуть метаболізувати мальтотетрозу або полісахариди з більш довгим ланцюгом (полі 1 і 2). При зменшенні загальної концентрації вуглеводів (що характеризується графіком питомої ваги, представленим на Фіг.6.31), концентрація етанолу пропорційно зростала. Приблизно через 37 годин бродіння концентрації етанолу і вуглеводів ставали рівними.

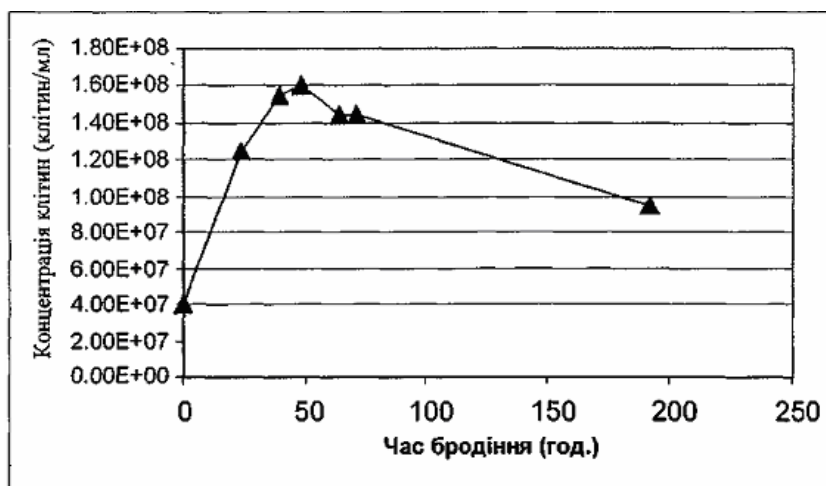
З погляду росту і метаболізму вуглеводів суперфлоккулентний штам дріжджів LCC290, очевидно, має такі ж характеристики, що і штам дріжджів LCC3021, який застосовують у промисловості. Очевидно, процес бродіння завершувався після того, як питома вага рідини досягала приблизно 2,7°P. Для флоккулентних штамів дріжджів характерно те, що вони утворюють великі згустки (флокуляти) і осаджуються з розчину до закінчення бродіння; у пивоварній промисловості це явище відоме під назвою 'зависле' бродіння. У дослідях з використанням періодичного процесу, проведених при створенні винаходу, виявилось можливим завершувати процес бродіння, оскільки вміст кобб перемішували, у результаті чого дріжджі знаходилися в суспензії й у тісному контакті з джерелом живильних речовин.

Іншою важливою характеристикою, що вивчали при створенні винаходу, була флокулююча здатність дріжджів. Зокрема, становило інтерес визначити швидкість осадження дріжджів, а також виявити індикаторну ознаку того моменту, коли для розглянутого конкретного штаму дріжджів починається флокуляція. Обидві зазначені характеристики важливі для дослідів з використанням безперервного процесу бродіння, оскільки вони відіграють роль у підтриманні популяції здорових дріжджів у газліфтному ферментері. На Фіг.6.32 приведено залежності осадження дріжджів від часу бродіння. Після бродіння протягом 24 годин у зразку, який тестують, була виявлена незначна кількість осаду. Відбувалося інгібування флокуляції внаслідок присутності певних цукрів; відомо, що глюкоза є інгібітором, отже флокуляція може починатися тільки після того, як відбулося вичерпування цього інгібітору. При тестуванні відповідно до методу, описаного в розділі 4.7, після бродіння протягом 40 годин клітини в зразку починали флокулювати й осаджуватися з розчину. Осадження відбувалося дуже швидко для усіх вивчених пері-

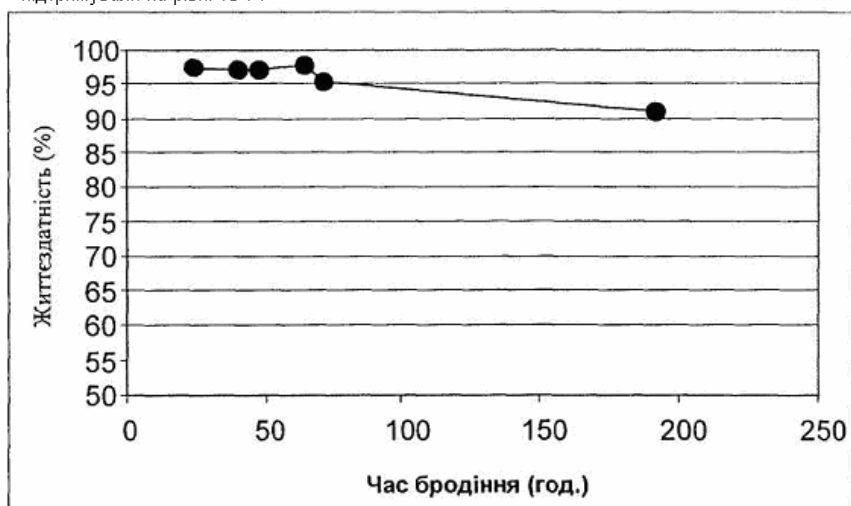
одів бродіння за винятком періоду 24 годин, після якого не відбувалося осадження. У досліді, що продовжувався 40 годин, у якому була виявлена найменша швидкість осадження, повне осадження дріжджів в установці, яку тестують, відбувалося протягом 90с. Після бродіння протягом 71 годин для осадження треба було менше 50с.

Дослідники припустили, що швидкість осадження залежить від концентрації твердих часток [Coe та Clevenger, 1916]. На Фіг.6.33 представлено залежності швидкості осадження твердих часток при даній концентрації клітин дріжджів. Дані для побудови цієї кривої були одержані методом, запропонованим [Kynch (1952)], на основі результатів, одержаних після кожного періоду бродіння. Дані лежать практично на одній і тій же кривій, що підтверджує результати, одержані [Coe та Clevenger (1916)].

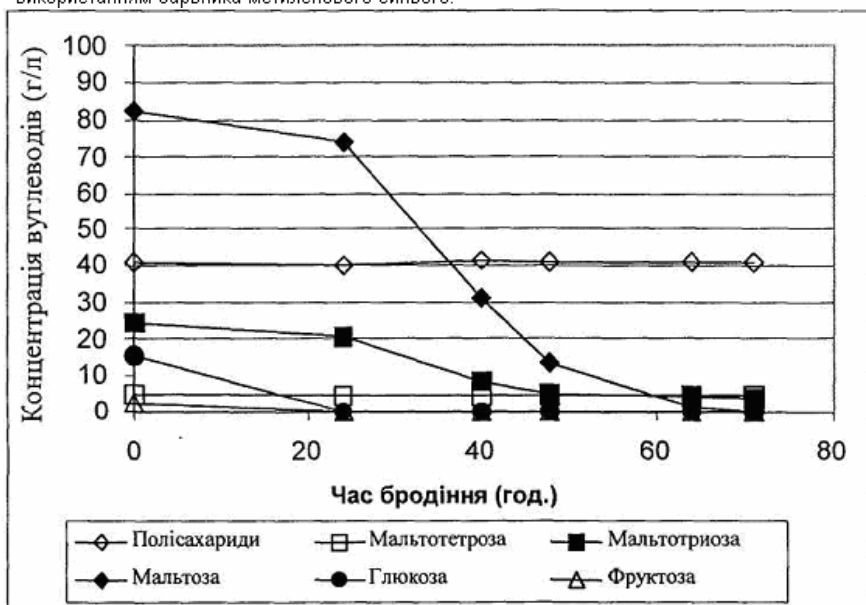
Результати, одержані в цьому досліді по осадженню, свідчать про те, що суперфлоккулентний штам дріжджів LCC290 флокулює при питомій вазі рідини 6°P і нижче. Цю величину можна розглядати як індикатор того, на якому рівні варто підтримувати питому вагу рідини, що знаходиться в псевдостационарному стані, якщо потрібно забезпечувати флокуляцію клітин. Робота реактора при питомій вазі вище 6°P зв'язана з ризиком дестабілізації флоккулентних клітин і може привести до вимивання іммобілізованої популяції клітин дріжджів. Характеристики осадження суперфлоккулентних дріжджів свідчать про те, що популяція дріжджів може осаджуватися дуже швидко після перебування її в стані спокою. У трифазному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування можна підтримувати циркуляцію цих клітин, однак у випадку виходу з ладу системи подачі газу популяція клітин дуже швидко осаджується і для ресуспендування твердих часток може знадобитися додаткова кількість газу, який розпилюють. Для процесингу після обробки така властивість швидкого осадження має перевагу, оскільки для вилучення маси твердих часток можна застосовувати такі пристрої для відділення твердих часток, як відстійники на основі гравітаційного осадження. У пивоварній промисловості це дозволило б знижувати навантаження на центрифужне обладнання і тим самим продовжувати час роботи між замінами резервуара центрифуги. Варто очікувати менших втрат пива і рівня стороннього присмаку, що додається пиву центрифугою (хоча він є мінімальним), може бути мінімальним внаслідок меншої біомаси дріжджів, що пропускається через центрифугу.



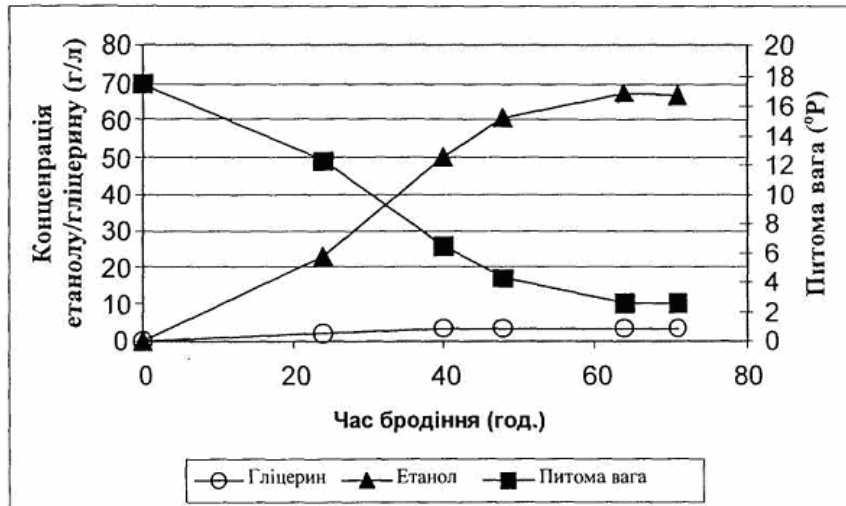
Фіг. 6.28 Залежність загальної концентрації клітин штаму дріжджів LCC290 від часу при періодичному процесі бродіння з перемішуванням. Температуру в процесі бродіння підтримували на рівні 15°C.



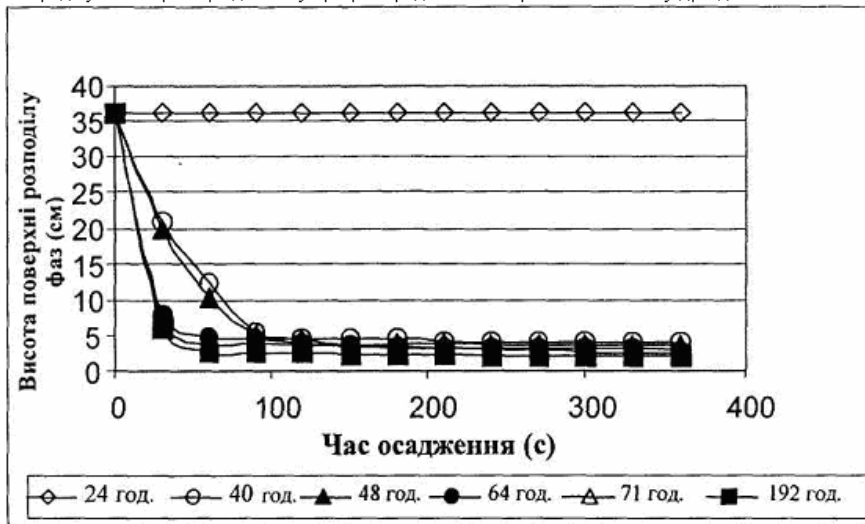
Фіг. 6.29 Залежність життєздатності клітин дріжджів від тривалості бродіння, оцінена з використанням барвника метиленового синього.



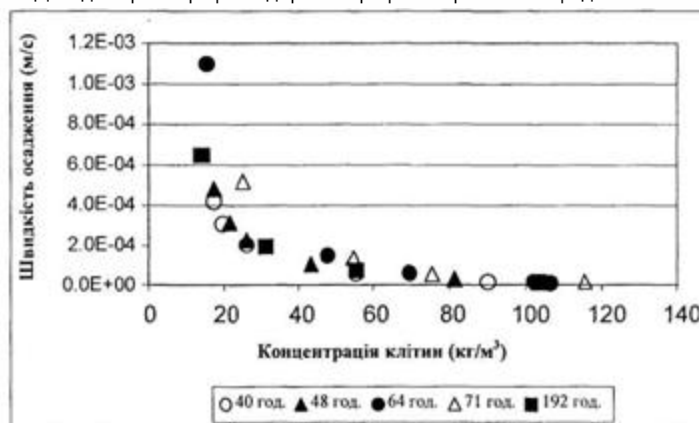
Фіг. 6.30 Залежності профілів концентрації вуглеводів від тривалості бродіння при періодичному процесі бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290.



Фіг. 6.31 Залежність концентрацій етанолу і гліцерину і питомої ваги рідини від тривалості зброджування при періодичному процесі бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290.



Фіг. 6.32 Залежність висоти поверхні розподілу фаз у суспензії дріжджів від тривалості осадження. Дані для цього графіка одержані при різній тривалості бродіння.



Фіг. 6.33 Залежність швидкості осадження суспензії дріжджів від концентрації клітин.

Дані для цього графіка одержані при різній тривалості бродіння.

6.3 Оцінка ефективності газліфтної технології для виготовлення пива за допомогою безперервного процесу бродіння

Першою й основною ціллю даної дисертації було оцінити можливість роботи пілотного варіан-

та газліфтного біореактора об'ємом 50л у безперервному режимі з використанням к-карагінанових гелевих гранул, призначених для захоплення клітин штаму дріжджів *Saccharomyces carlsbergensis*

(описаних у розділі 6.2.1). Крім того, була поставлена задача дослідити чи можна за допомогою такої системи виготовляти лагерне пиво Північно-американського типу, що має прийнятну смакову якість. Була поставлена також задача визначити мінімальний час утримування (перебування в біореакторі), необхідний для одержання необхідного зменшення високої питомої ваги сусла (17,5°P), а також визначити робочий діапазон концентрацій кисню в системі безперервного бродіння.

Мінімальний час перебування в реакторі, при якому відбувалося поглинання всіх цукрів, становив 24 години. Його можна співставити з проміжком часу при класичному періодичному процесі бродіння, що становить 5-7 днів. Концентрація розчиненого кисню, яку вимірювали за допомогою вбудованого в біореактор датчика кисню фірми Ingold, була близька до нуля незважаючи на те, що кисень додавали до газу, який розпилюють (у кількості від 0 до 20 об. %). Це свідчить про те, що кисень, який надходив у сусло, або швидко поглинався клітинами дріжджів, або просто вилучався разом з відхідним газом. Концентрація вільних клітин у зливі пива становила приблизно 10^8 клітин на мл зеленого пива. Концентрації близьких за будовою дикетонів, діацетилю і 2,3-пентандіону, а також концентрація ацетальдегіду, знижувалися при зменшенні концентрацій кисню в газі, який розпилюють (Фіг.6.34 та 6.35). Зміна надходження кисню, очевидно, не впливала на вимірюваний вміст складних ефірів (етилацетату і ізоамілацетату) і вищих спиртів (пропанолу, ізобутанолу, ізоамілового спирту) (Фіг.6.36).

На Фіг.6.37 приведено порівняння вмісту різних смакових сполук у двох типах готового пива, яке тестують, з пивом, виробленим промисловим методом (періодичний процес бродіння з застосуванням вільних клітин), яке використовували як контроль. Між пивом, одержаним за допомогою процесу безперервного бродіння, і контролем були виявлені деякі постійно присутні розходження у вмісті складних ефірів (етилацетату й ізоамілацетату) і вищих спиртів (пропанолу), які не залежали від рівня подачі кисню. Смак повністю приготовленого пива, яке одержували з використанням 2% кисню на думку групи дегустаторів був порівняно близький до смаку контрольного пива (промислового продукту). Однак, пиво, приготовлене з застосуванням 20% кисню, було визнано неприйнятним, оскільки мало ознаки окисленого смаку, а також "паперового" і "винного" смаку.

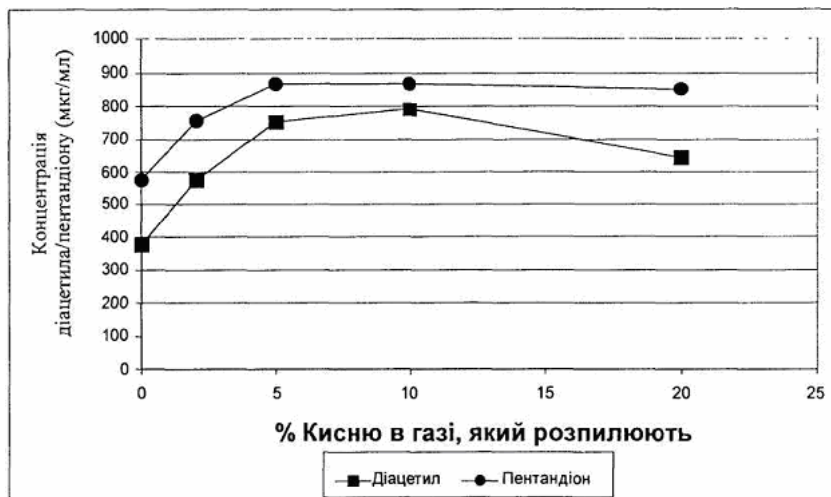
У псевдостационарному стані пілотний біореактор працював протягом 6-тижневого періоду, при цьому час перебування в біореакторі становив 24 години. "Зелене" пиво мало прийнятний букет смаку і не було відзначено ніяких значних недоліків (відсутність сірчистого присмаку). У цих експериментах вирішальне значення мав вміст кисню в газі, який розпилюють. Партії пива, одержані при використанні 2-5% кисню в газі, який розпилюють, мали найкращі букети смаку. Цей аспект, що має вирішальне значення, потребує подальшого ви-

вчення, насамперед із застосуванням більш точних методів вимірювання вмісту кисню в більшій кількості аналітичних зразків, одержаних перед бродінням і після бродіння.

При використанні традиційного періодичного процесу бродіння в сусло вводять кисень до переносу у ферментер. Після інокуляції середовища концентрація розчиненого кисню швидко знижується внаслідок його поглинання клітинами дріжджів (протягом перших 24 годин бродіння, коли відбувається ріст клітин). Таким чином, інша частина процесу бродіння проходить в основному в анаеробних умовах. Застосування безперервної гомогенної системи для основного бродіння не дозволяє змінювати концентрацію кисню з часом. З цієї причини може виявитися дуже важко досягнути повної відповідності смаку пива, зробленого способами безперервного і періодичного бродіння.

Незважаючи на зазначені труднощі за допомогою конфігурації біореактора, тестованої в даному попередньому дослідженні, одержували пиво з прийнятним смаком і аналітичним профілем. За допомогою газліфтного біореактора при використанні гранул, що мають відносно невеликі розміри (~1 мм), можна підвищувати об'ємну продуктивність біореактора за рахунок зменшення на кілька днів часу, необхідного для основного бродіння. Оцінка рівня біомаси, що утворилася у вихідному пиві, показала, що рівень росту дріжджів у біореакторі з іммобілізованими клітинами еквівалентний росту при використанні процесу періодичного бродіння з застосуванням вільних клітин в аналогічних умовах. Ці дані підтверджують залежність формування смакових якостей пива, яке одержують за допомогою безперервного процесу бродіння з використанням іммобілізованих клітин.

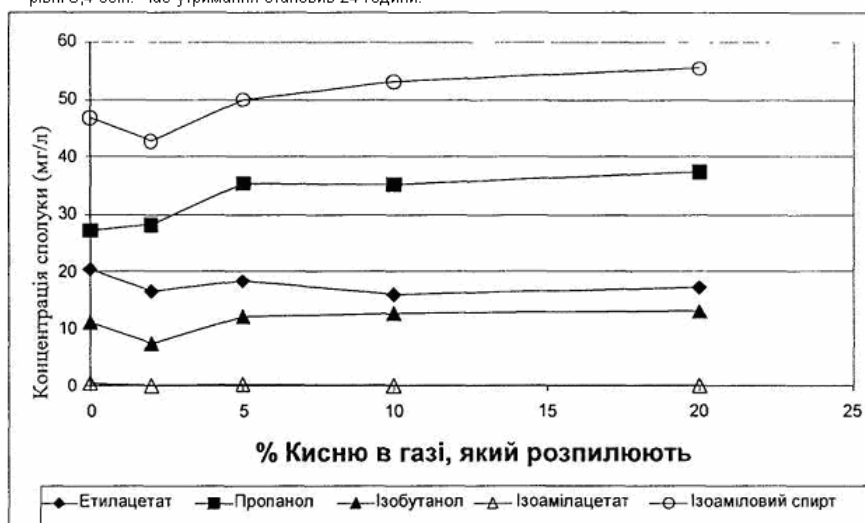
Високий рівень діацетилю у рідині, яка виходить був виявлений також іншими дослідниками [Virkaajarvi та Pohjala, 1999; Kronlof та ін., 2000]. Для Північноамериканських типів лагерного пива необхідний рівень діацетилю становить 30 мкг/л у порівнянні з рівнями 400-800 мкг/л, які одержували у вихідній рідині, що піддавалася процесу безперервного бродіння. За допомогою традиційного методу дозрівання (дозрівання при охолодженні до 2°C протягом 14 днів) можна знижувати концентрацію діацетилю до необхідного рівня, однак це погіршує загальну продуктивність процесу. Використання технології швидкого вторинного бродіння, описаної в главі 2, може дозволити зменшувати вміст діацетилю без істотного зниження продуктивності (2-годинний процес). Однак, додаткові витрати можуть перешкоджати цьому, а також не всі пивовари можуть погодитися на те, щоб піддавати своє пиво дії високих температур (80-90°C).



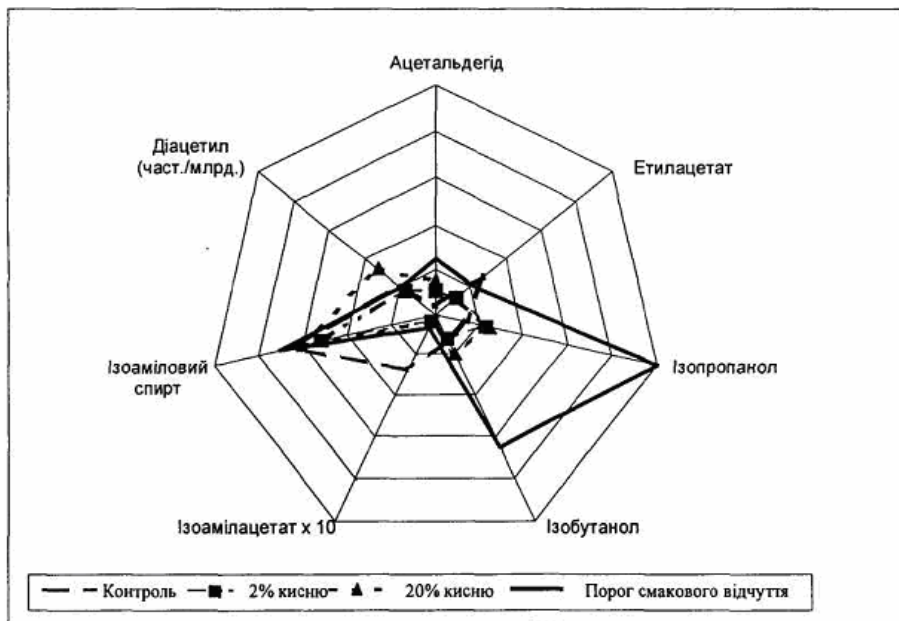
Фіг. 6.34 Залежність концентрації близьких за будовою дикетонів від процентного вмісту кисню в газі, який розпилюють. Бродіння здійснювали в газліфтному ферментері об'ємом 50л, завантаженому карагінановими гелевими гранулами (40об. %). Загальну витрату газу, який розпилюють, підтримували на постійному рівні 6,4 scfh. Час перебування в біореакторі становив 24 години.



Фіг.6.35 Залежність концентрації ацетальдегіду від процентного вмісту кисню в газі, який розпилюють. Зброджування здійснювали в газліфтному ферментері об'ємом 50л, завантаженому карагінановими гелевими гранулами (40об. %). Загальну витрату газу, який розпилюють, підтримували на постійному рівні 6,4 scfh. Час утримання становив 24 години.



Фіг. 6.36 Залежність концентрації складних ефірів і сивушних спиртів від процентного вмісту кисню в газі, який розпилюють. Бродіння здійснювали в газліфтному біореакторі об'ємом 50 л, завантаженому карагінановими гелевими гранулами (40об. %). Загальну швидкість газу, який розпилюють, підтримували на постійному рівні 6,4 scfh. Час перебування в біореакторі становив 24 години.



Фіг. 6.37. Порівняння концентрацій компонентів готового продукту, одержаного при вмісті кисню в газі, який розпилюють, 2 і 20%, і одержуваного в промисловому масштабі пива і граничні з погляду смакових якостей значення цих компонентів. Бродіння здійснювали в газліфтному біореакторі об'ємом 50л, завантаженому карагінановими гелевими гранулами (40об. %). Загальну швидкість газу, який розпилюють, підтримували на постійному рівні 6,4 scfh. Час перебування в біореакторі становив 24 години.

6.4 Швидкості змішування і циркуляції при бродінні в трифазному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування

Експерименти з вивчення змішування проводили за допомогою методу, оснований на ін'єкції кислоти, описаного в розділі 4.8. На цій фазі експерименту були поставлені дві цілі. По-перше, на основі розрахунку швидкості циркуляції рідини і відповідного їй часу змішування для декількох іммобілізуючих носіїв при різних зведених швидкостях псевдозріджуючого газу було потрібно оцінити, чи дозволяє газліфтна система забезпечувати гарне змішування. Відмінність розглянутих дослідів від тих, які описані в літературі, полягала в тому, що весь експеримент по змішуванню проводили на реальних середовищах, які зброджують, що містять активні клітини дріжджів, а не на модельних розчинах (системи вода - тверді частки - газ). Ці експерименти по змішуванню були пов'язані також з необхідністю розрахунку зведених швидкостей рідини, які можна використовувати при створенні, на основі пілотної системи, систем для більш великомасштабного виробництва.

6.4.1 Калібрування зонда

Зонд для вимірювання значення pH, який застосовували при вивченні змішування, калібрували за допомогою методу, описаного в розділі 4.8. Сигнал величиною 4-20мА, що надходить від pH-зонда, пропускали через резистор 250Ом і трансформували в сигнал напругою 1-5В, який реєстрували за допомогою плати для цифро-аналогового перетворення (ЦАП). pH-зонд занурювали послідовно в ряд буферів: буфер з pH 4,6, буфер з pH 4,0, буфер з pH 5,0, буфер з pH 6,0 та, нарешті, у буфер з pH 7,0 (сертифіковані стандарти фірми Beckman, Cole Pamer). На Фіг.6.38 приведено одержані за допомогою системи збору даних вихідні сигнали pH-зонда фірми Ingold для 5 стандартних розчинів із зазначеними значеннями pH. На Фіг.6.39 представлено калібровану криву для pH-зонда, що являє собою залежність вимірюваного сигналу у вольтах від дійсного значення pH. Калібрувальна крива, отримана методом найкращого підбору, для цієї системи (коефіцієнт кореляції 0.9996) описувалася наступним рівнянням:

дні сигнали pH-зонда фірми Ingold для 5 стандартних розчинів із зазначеними значеннями pH. На Фіг.6.39 представлено калібровану криву для pH-зонда, що являє собою залежність вимірюваного сигналу у вольтах від дійсного значення pH. Калібрувальна крива, отримана методом найкращого підбору, для цієї системи (коефіцієнт кореляції 0.9996) описувалася наступним рівнянням:

$$pH = 3,68 \cdot \text{напруга у вольтах} - 3,53 \quad (6.1)$$

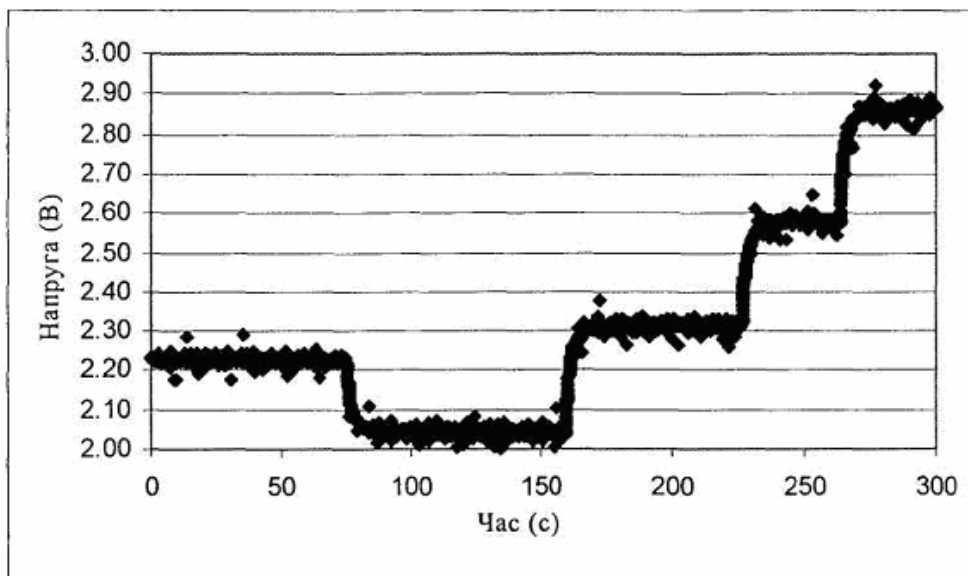
Зібрані в експериментах з вивчення змішування дані трансформували з використанням рівняння 6.1 для одержання дійсних значень pH всередині газліфтного біореактора.

Вимірювали також час спрацювання pH-зонда при зміні значення pH. На Фіг.6.40-6.43 представлені типові залежності вихідного сигналу pH-зонда у відповідь на чотири сідчастих зміни значення pH, а саме, на 0,6, 1,2, 2,3 та 3,4 одиниці. Початкові дані апроксимували імпульсною функцією за допомогою вбудованого програмного забезпечення для побудови графіків і аналізу даних TableCurve 2D (фірма Jandel Scientific). Результуюча апроксимуюча крива характеризується коефіцієнтом кореляції, що перевищує 0,994. На основі цих графіків розраховували час, необхідний для реакції на 98% сідчастій зміні (час спрацювання) і потім будували графік залежності часу спрацювання від величини сідчастій зміні значення pH (Фіг.6.44). У дослідженому діапазоні час спрацювання зменшується при зміні величини сідчастій зміні значення pH. Для найменшої сідчастій зміні, рівної 0,6, час спрацювання pH-зонда становив ~6,4с. При сідчастій зміні pH, що становить 3,4, час спрацювання зменшувався приблизно до 4,2с.

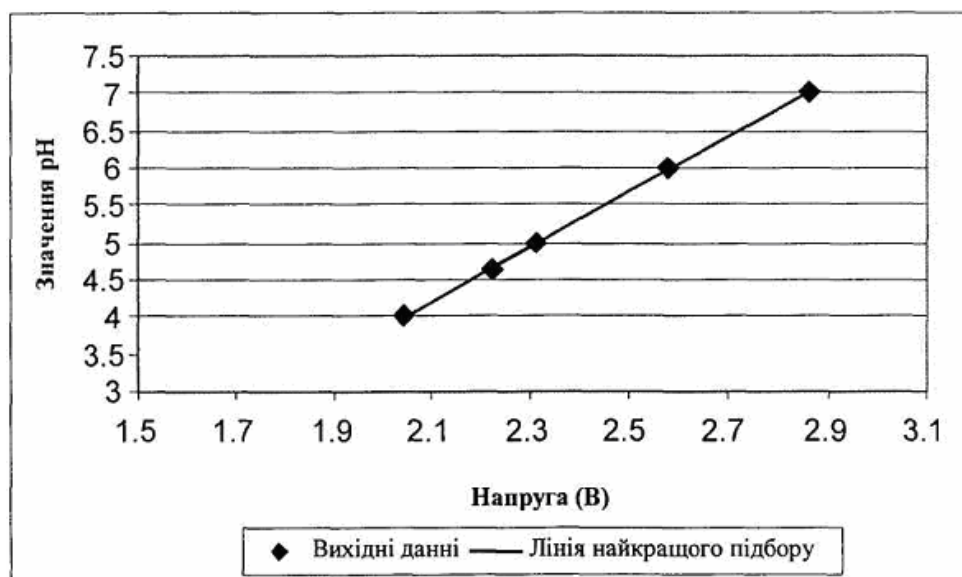
Визначення характеристик зонда такого типу є важливим, особливо в тому випадку, коли систему

застосовують для оцінки часу змішування і швидкості циркуляції. Зонд повинен мати невеликий час спрацювання для того, щоб реєструвати зміни в середовищі, у якому проводять вимірювання. Зокрема, час спрацювання рН-зонда повинен бути менше часу циркуляції в реакторі, якщо він при-

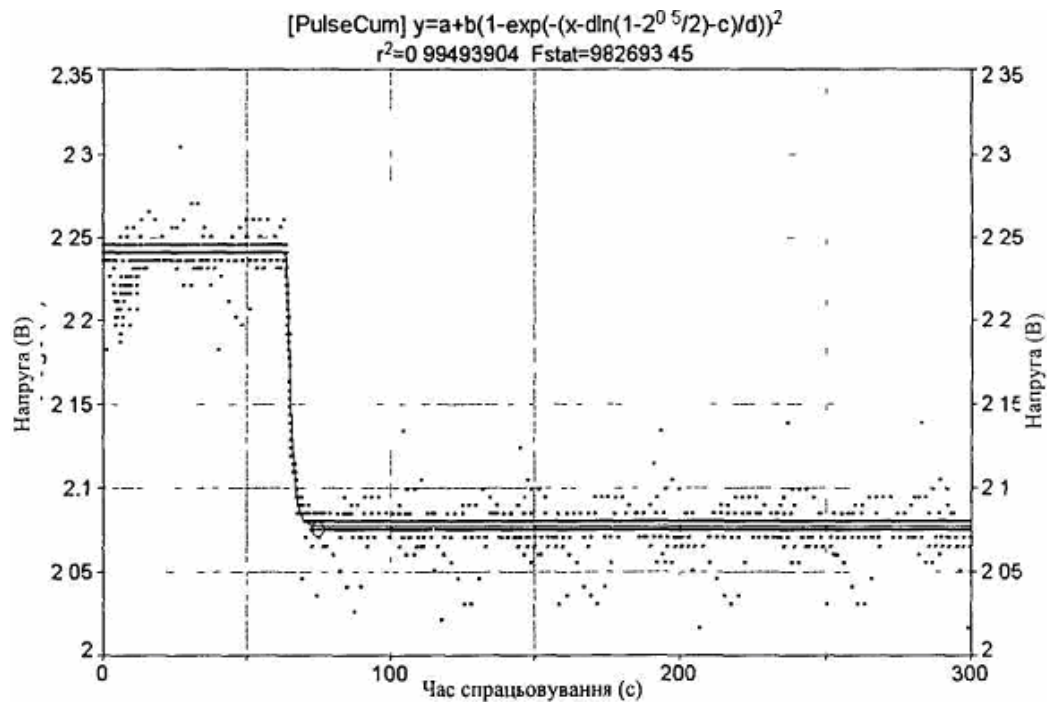
значений для точного вимірювання в таких дослідженнях. Однак квазімиттєвий час спрацювання не є необхідним, оскільки невелике запізнювання спрацювання можна легко виявляти при послідовних вимірюваннях швидкості циркуляції і у такий спосіб обнулити.



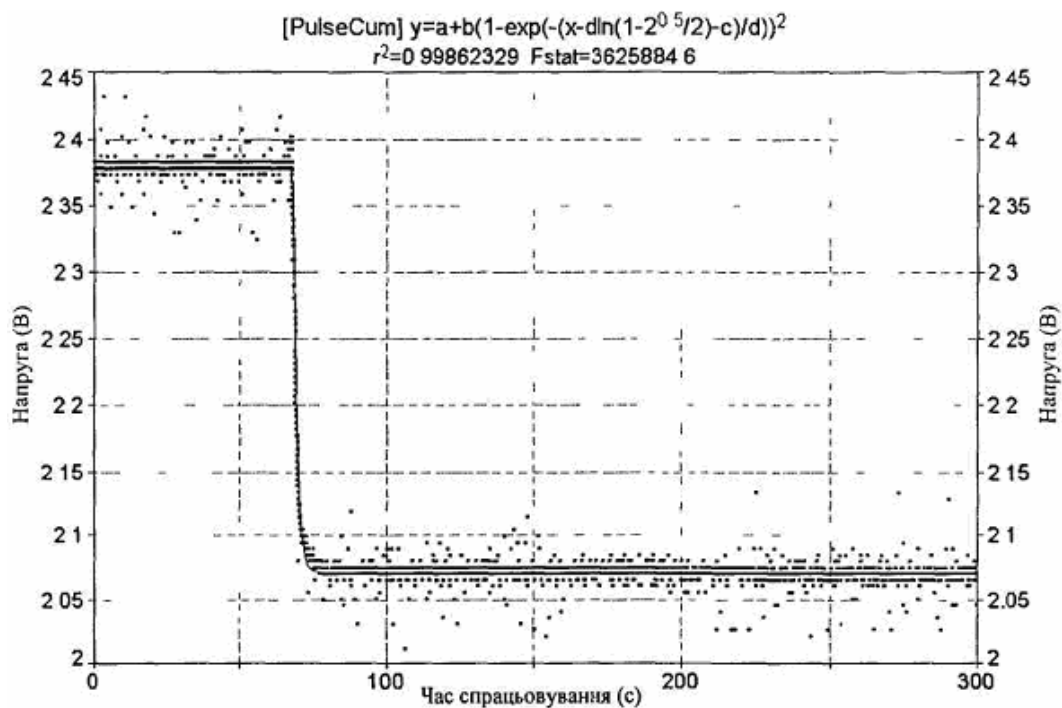
Фіг. 6.38 Залежність вихідних даних, що представляють собою вихідний сигнал від рН-датчика фірми Ingold, від часу для різних буферних розчинів. Частота збору становила 50Гц, загальна кількість зібраних точок становила 15000.



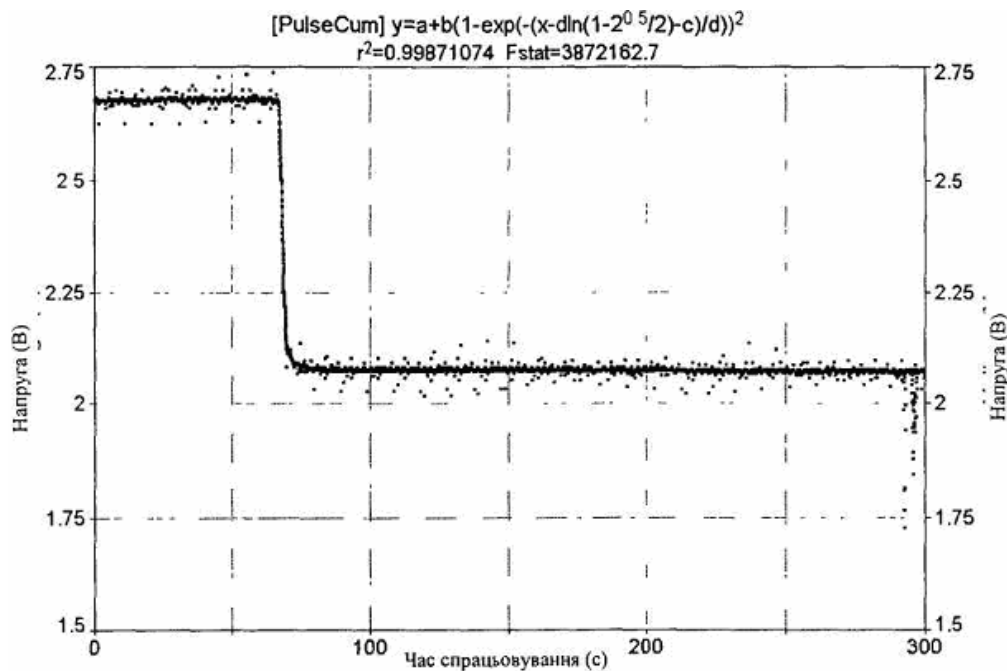
Фіг. 6.39 Калібрувальна крива, що являє собою залежність значення рН від вимірюваної напруги (В). Лінія найкращого підбору або калібрувальна лінія описується наступним рівнянням: $pH = 3,68 \cdot \text{напруга у вольтах} - 3,53$ з коефіцієнтом кореляції 0,9996. ($n=2500$).



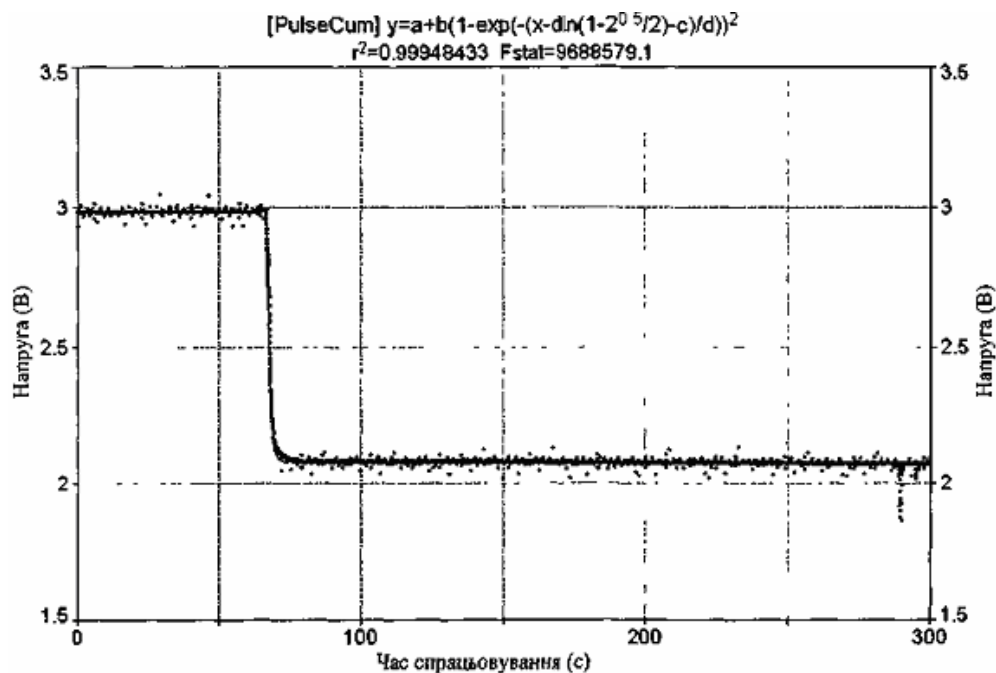
Фіг. 6.40 Типові результати оцінки часу спрацювання рН-зонда при східчастій зміні значення рН на величину $\sim 0,6$. Вихідний сигнал апроксимували за допомогою програмного забезпечення TableCurve. Імпульсна функція, вибрана методом найкращого підбору, має коефіцієнт кореляції 0,995.



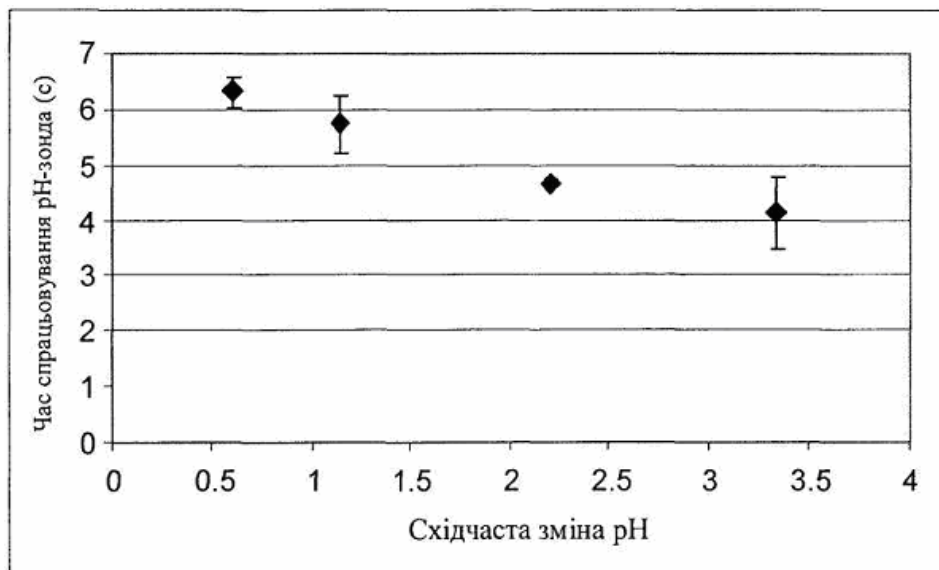
Фіг. 6.41 Типові результати оцінки часу спрацювання рН-зонда при східчастій зміні значення рН на величину $\sim 1,2$. Вихідний сигнал апроксимували за допомогою програмного забезпечення TableCurve. Імпульсна функція, вибрана методом найкращого підбору, має коефіцієнт кореляції 0,999.



Фіг. 6.42 Типові результати оцінки часу спрацювання рН-зонда при східчастій зміні значення рН на величину ~2,3. Вихідний сигнал апроксимували за допомогою програмного забезпечення TableCurve. Імпульсна функція, вибрана методом найкращого підбору, має коефіцієнт кореляції 0,999.



Фіг. 6.43 Типові результати оцінки часу спрацювання рН-зонда при східчастій зміні значення рН на величину ~3,4. Вихідний сигнал апроксимували за допомогою програмного забезпечення TableCurve. Імпульсна функція, вибрана методом найкращого підбору, має коефіцієнт кореляції 0,999.



Фіг. 6.44 Час спрацювання рН-зонда фірми Ingold при східчастій зміні значення рН. ($n=3$). Зонди занурювали в буфер, що має високе значення рН і потім відразу піддавали дії буфера з більш низьким значенням рН, що дорівнює 4,0. Для розрахунку часу, необхідного для того, щоб вихідний сигнал зонда досяг 98 % величини східчастої зміни, використовували залежності, одержані методом найкращого підбору для кожної кривої вихідного сигналу.

6.4.2 Час змішування і швидкості циркуляції

Експерименти з оцінки часу змішування і швидкості циркуляції проводили для трьох типів процесів бродіння з використанням іммобілізованих клітин. Експерименти проводили в пілотному газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування з використанням як моделі водного розчину, що не містить твердих часток, і потім бульйону, який зброджують, з питомою вагою 2,7°P, що містить або κ -карагінанові гелеві гранули, суперфлоккулентний штам дріжджів LCC290, або помірно флоккулентний штам дріжджів LCC3021. На Фіг.6.45 та 6.46 представлені приклади графіків первинних даних, зібраних за допомогою системи рН-зонда після імпульсної ін'єкції кислоти (метод описаний у розділі 4.8). На Фіг.6.45 представлено вихідний сигнал рН-зонда при ін'єкції кислоти у водний розчин, що не містить твердих часток, а на Фіг.6.46 представлено вихідний сигнал після ін'єкції кислоти в бульйон, який зброджують, що містить високофлоккулентний штам дріжджів LCC290. Сигнали апроксимували кривою за допомогою розкладання в ряд по синусоїдах, при цьому з використанням відповідних рівнянь були розраховані коефіцієнти кореляції, рівні 0,96 і 0,90 відповідно. Параметри апроксимації "b" і "c" на графіках відповідають параметрам "a" і "c", зазначеним у рівнянні розкладання по синусоїдах (3.1). Зазначені чисельні значення використовували в рівняннях 3.2 і 3.3 для розрахунку швидкості циркуляції і часу змішування для розглянутої системи. У додатку Б наведені інші результати дослідів з дослідження змішування і апроксимуючі криві для всіх експериментів.

На Фіг.6.47 і 6.48 представлені графіки часу змішування і швидкості циркуляції, одержані при ін'єкції кислоти у водний розчин, що не містить твердих часток. На Фіг.6.49 і 6.50 представлені відповідні графіки, одержані в експериментах по

дослідженню змішування з використанням високофлоккулентного штаму дріжджів LCC290, а результати, одержані в випробуваннях з дослідження змішування з використанням κ -карагінану, представлені на Фіг.6.51 та 6.52. Нарешті, час змішування і час циркуляції штаму дріжджів LCC3021, що має середню здатність до флокулювання, представлені на Фіг.6.53 та 6.54. Незалежно від типу твердих часток, які тестують, як час змішування, так і швидкість циркуляції зменшувалися при відповідному збільшенні зведеної швидкості газу. Співвідношення між швидкістю циркуляції і зведеною швидкістю газу для всіх чотирьох систем, які тестували, описувалося рівнянням 3.11, запропонованим Kennard та Janekah (1991). Час змішування описувався рівнянням 3.11 для водної системи, що не містить твердих часток, і системи, що містить гранули з карагінанового гелю. Для обох систем з використанням флоккулентних дріжджів як іммобілізуючої матриці не було виявлено вираженої кореляції з теоретичною моделлю Kennard та Janekah. Системи з використанням LCC290 і LCC3021 характеризувалися меншим вихідним часом змішування (доти, поки зведена швидкість газу перевищувала 4мм/с), ніж час, передбачений на основі зазначеної моделі. Однак, швидкість зменшення часу змішування сповільнювалася при зведених швидкостях газу, які перевищують 4мм/с, хоча модель давала більш низькі значення. У таблиці 6.1 наведені рівняння, виведені для часу циркуляції і часу змішування і їх співвідношення зі зведеною швидкістю газу.

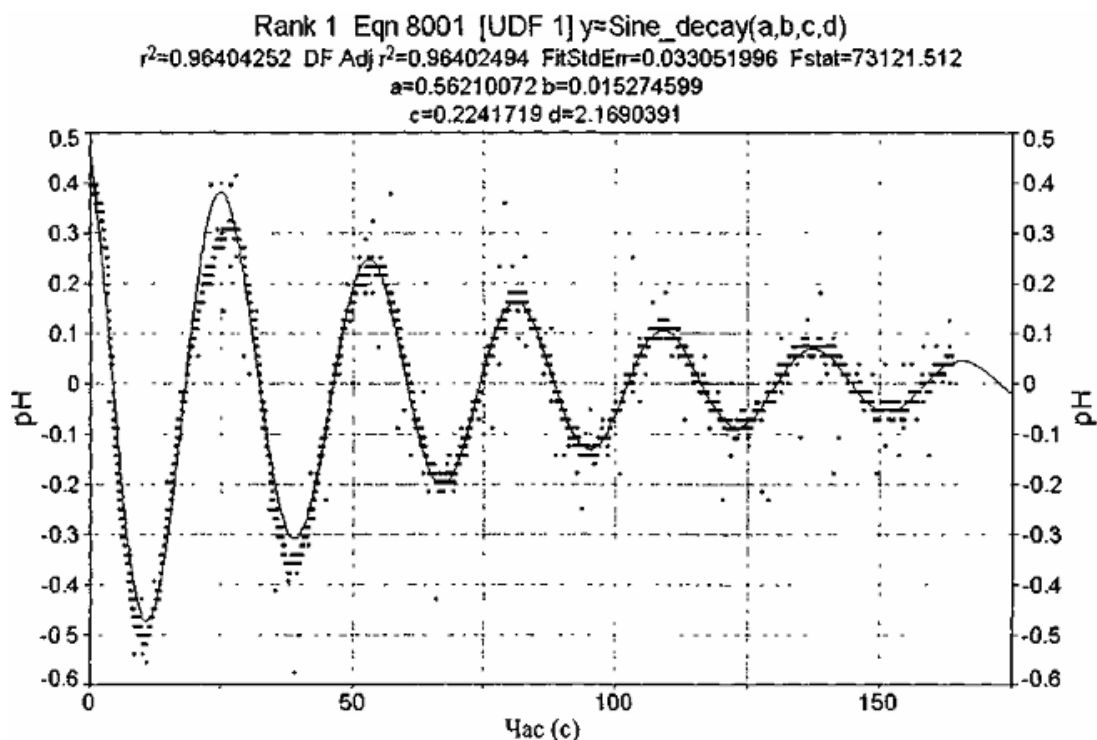
На Фіг.6.55 представлено залежність часу змішування від зведеної швидкості газу для всіх чотирьох систем. Варіант із використанням води, що не містить твердих часток, характеризувався найбільшим часом для 98%-го змішування після імпульсу, що приводить до зміни рН (~ 220 с при $V_{sg}=3$ мм/с), а система з використанням штаму

LCC290 характеризувалася найкращою здатністю мінімізувати вплив імпульсного введення кислоти в систему (~110с при $V_{sg}=3\text{мм/с}$). Дані, одержані для штаму LCC3021 і к-карагінанової системи, знаходилися між даними, які отримали для системи вода, що не містить твердих часток, і системи, що містить штаму LCC290. Тверді частки, які присутні у газліфтному біореакторі допомагають диспергуванню рідких елементів, що знаходяться в рідкій фазі, оскільки вони стимулюють утворення вихрів і сприяють коаксіальному змішуванню. Було встановлено, що для суперфлюкцентного штаму дріжджів LCC290, хоча вміст твердих часток був таким самим (16%мас/об.), що і для помірно флюкцентного штаму дріжджів LCC3021 характерний більш короткий час змішування для усіх вивчених зведених швидкостей газу.

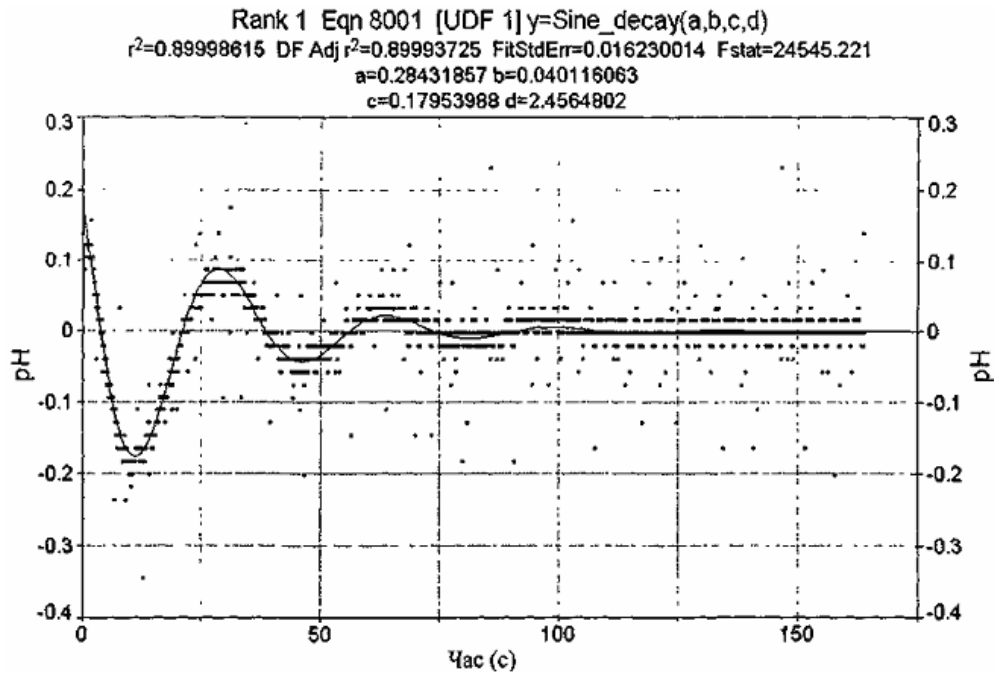
На Фіг.6.56 представлено залежності часу циркуляції від зведеної швидкості газу для всіх чотирьох систем, які тестували. При зведеній швидкості газу 2мм/с, час циркуляції становив від 28 до 35с, причому система вода, що не містить твердих часток, характеризувалася найбільш високою швидкістю циркуляції, а система, що містить штаму дріжджів LCC290, характеризувалася найменшою швидкістю циркуляції. При більш високих швидкостях газу різниця між чотирма системами зменшувалася приблизно на 3с. Однак для всіх швидкостей, які тестували, система, що містить штаму дріжджів LCC290, характеризувалася трохи мен-

шими швидкостями циркуляції, у той час як для системи вода, що не містить твердих часток, були характерні найбільші швидкості циркуляції.

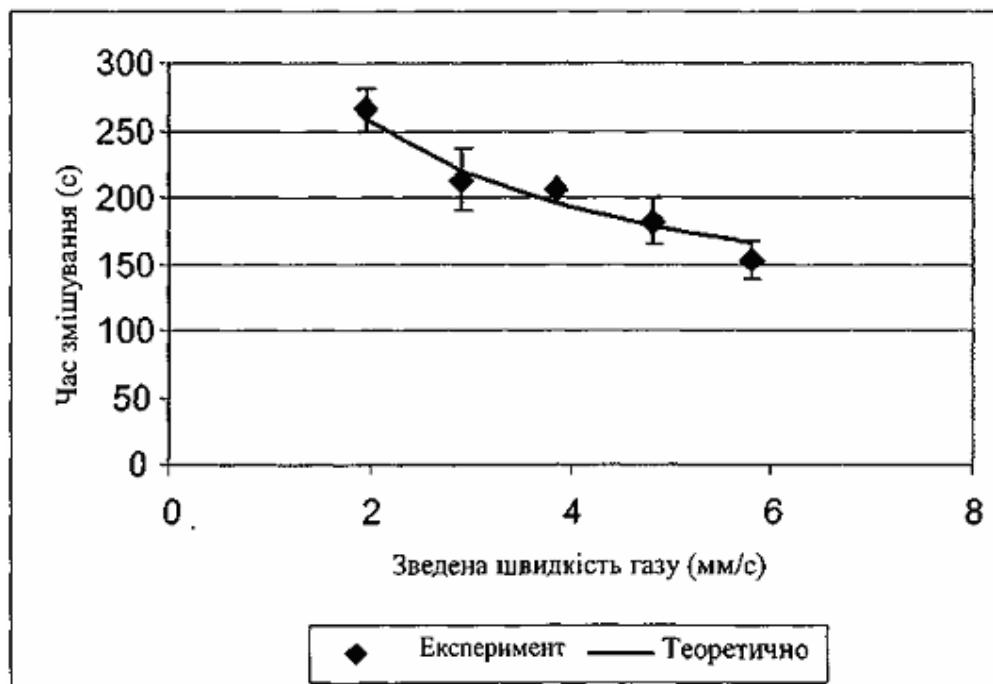
На Фіг.6.57 проілюстровано зв'язок між зведеною швидкістю газу і зведеною швидкістю рідини. Для розрахунку зведеної швидкості рідини при даній швидкості циркуляції і типі твердих часток застосовували рівняння 3.7, запропоноване Livingston та Zhang (1993). Зведена швидкість рідини зростала при збільшенні зведеної швидкості газу. Для системи, що містить штаму LCC3021, і системи вода, що не містить твердих часток, були виявлені подібні тенденції, у той час як система, що містить штаму LCC290, і система на основі к-карагінана мали певну подібність. Для апроксимації залежностей зведеної швидкості рідини від зведеної швидкості газу, представлених на Фіг.6.57, використовували модельне рівняння, запропоноване Kennard та Jenekah. На Фіг.6.58 представлено графік, на якому дано порівняння зведеної швидкості рідини, розраховане за експериментальними даними, із зведеною швидкістю рідини, розрахованої теоретично з використанням рівняння 3.10. Видно, що для всіх чотирьох систем дані апроксимуються запропонованим рівнянням, при цьому тангенс кута нахилу лінійної залежності дорівнює 1, а її початок знаходиться при $y=0$. У таблиці 6.1 наведені дані про кореляції, одержані для систем, які тестували при проведенні розглянутого дослідження.



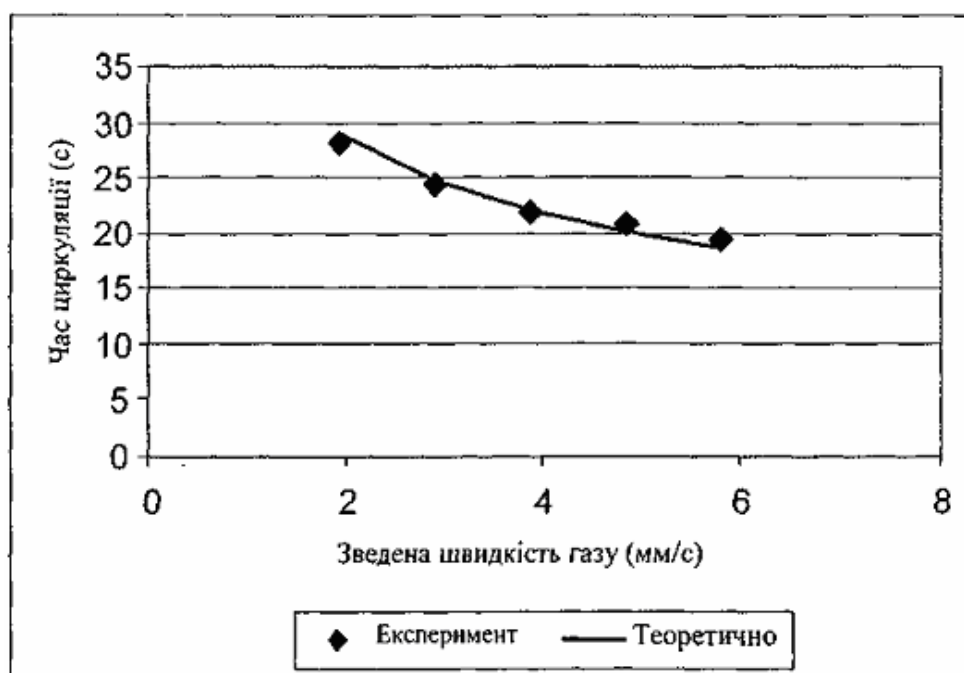
Фіг. 6.45 Результати вимірювання вихідного сигналу pH-зонда в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У водний розчин, що не містить твердих часток, вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоту. Зведену швидкість газу регулювали на рівні 1,94мм/с. Початкові дані апроксимували шляхом розкладання в ряд по синусоїдах. Коефіцієнт кореляції становив 0,96.



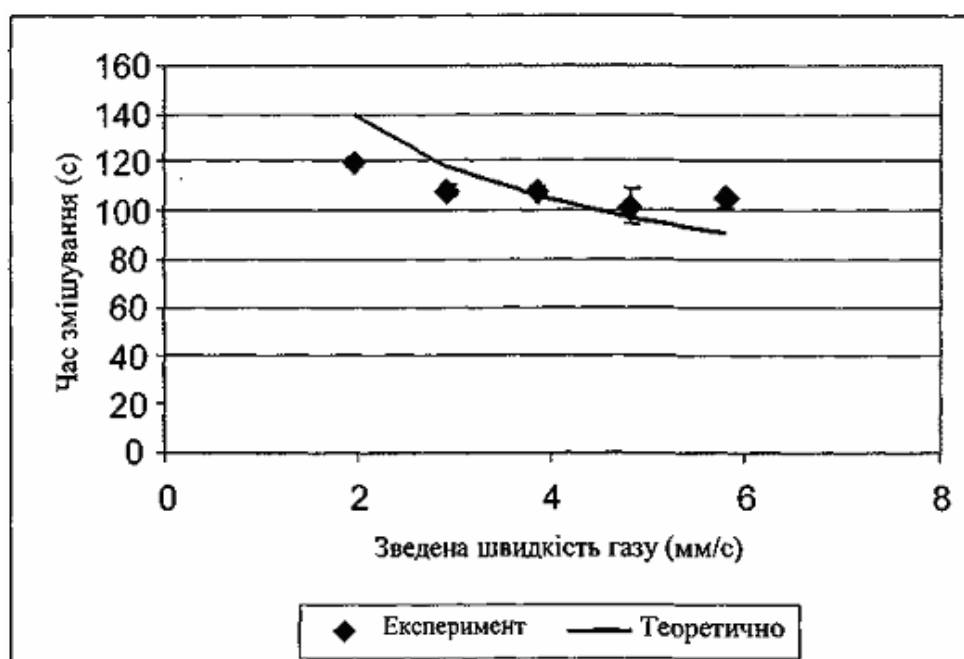
Фіг. 6.46 Результати вимірювання вихідного сигналу pH-зонда в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У розчин, який зброджують, що містив високофлокулентний штам дріжджів LCC290, вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоту. Зведену швидкість газу регулювали на рівні 1,94 мм/с. Початкові дані апроксимували шляхом розкладання в ряд по синусоїдах. Коефіцієнт кореляції становив 0,90.



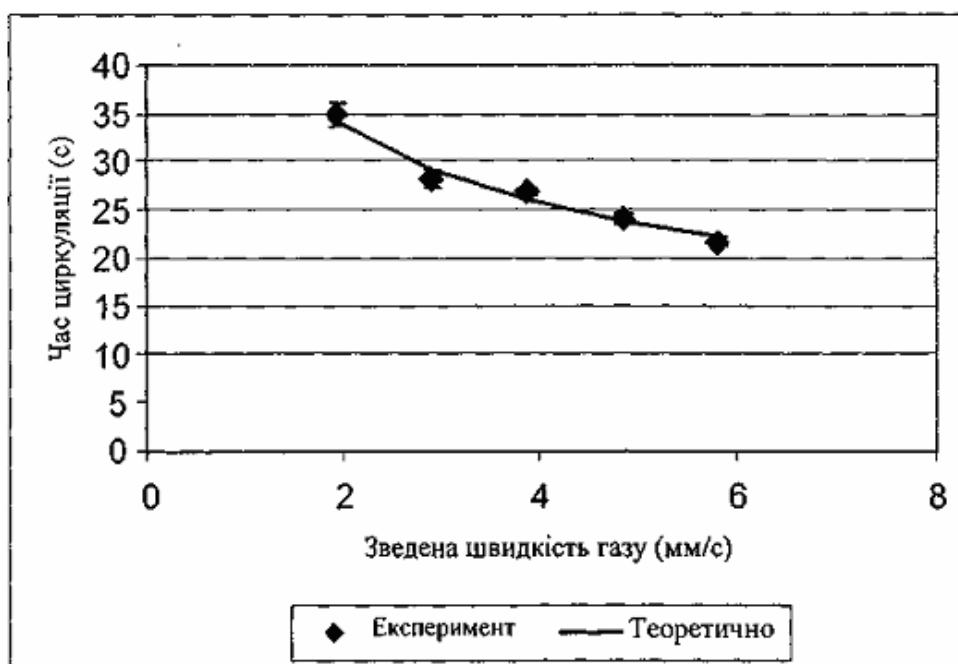
Фіг. 6.47 Залежність часу змішування від зведеної швидкості газу в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У водний розчин, що не містить твердих часток, вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоту. Час змішування відповідає часу, протягом якого відбувається компенсація (обнуління) 98% східчастої зміни значення pH. ($n=3$)



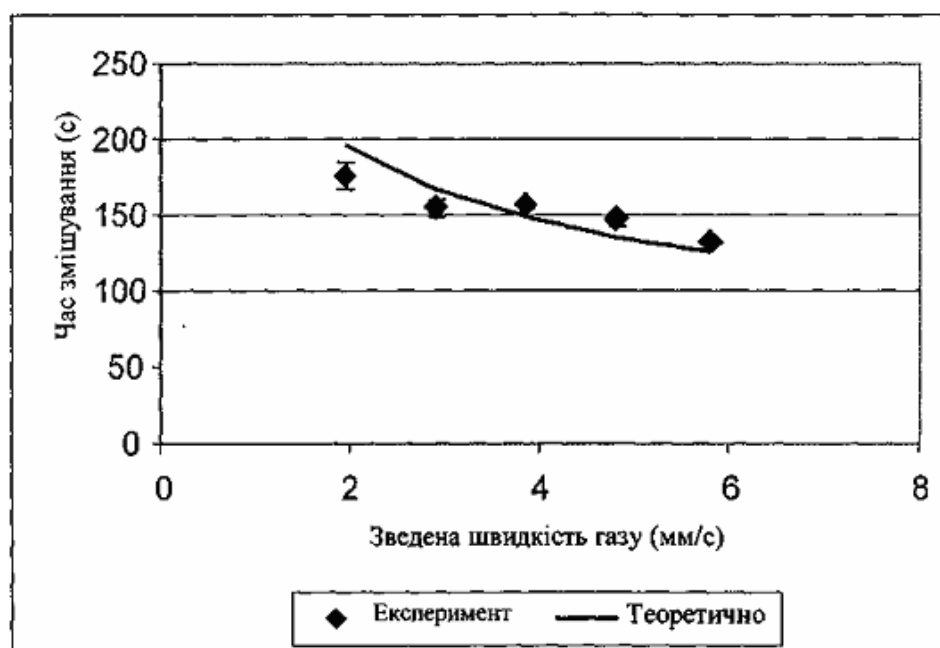
Фіг. 6.48 Залежність часу циркуляції від зведеної швидкості газу в газліфному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У водний розчин, що не містить твердих часток, вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоти, ($n=3$)



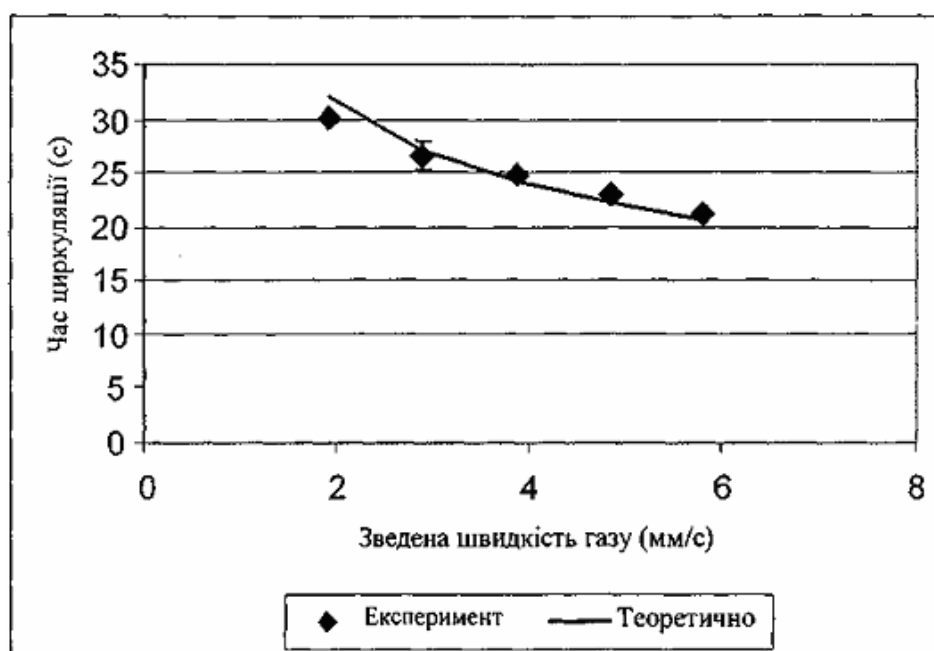
Фіг. 6.49 Залежність часу змішування від зведеної швидкості газу в газліфному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило високофлокулентний штам дріжджів LCC290 (розмір флокулятів >1.0 мм), вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоти. Час змішування відповідає часу, протягом якого відбувається компенсація (обнуління) 98% східчастої зміни значення рН. ($n=3$)



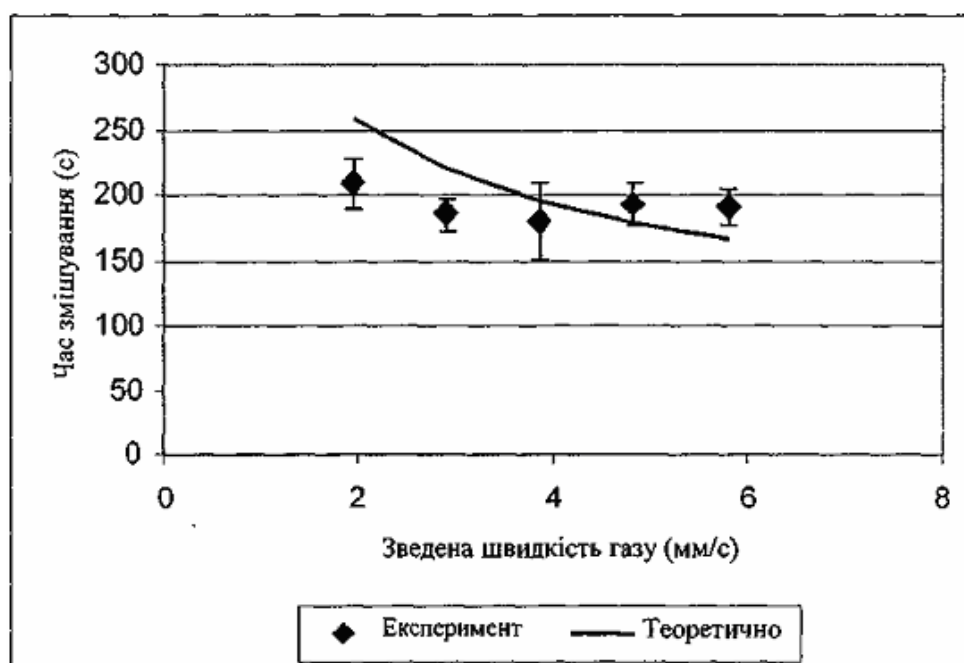
Фіг. 6.50 Залежність часу циркуляції від зведеної швидкості газу в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило високофлокулентний штам дріжджів LCC290 (розмір флокулатів >1,0мм), вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоту, (n=3)



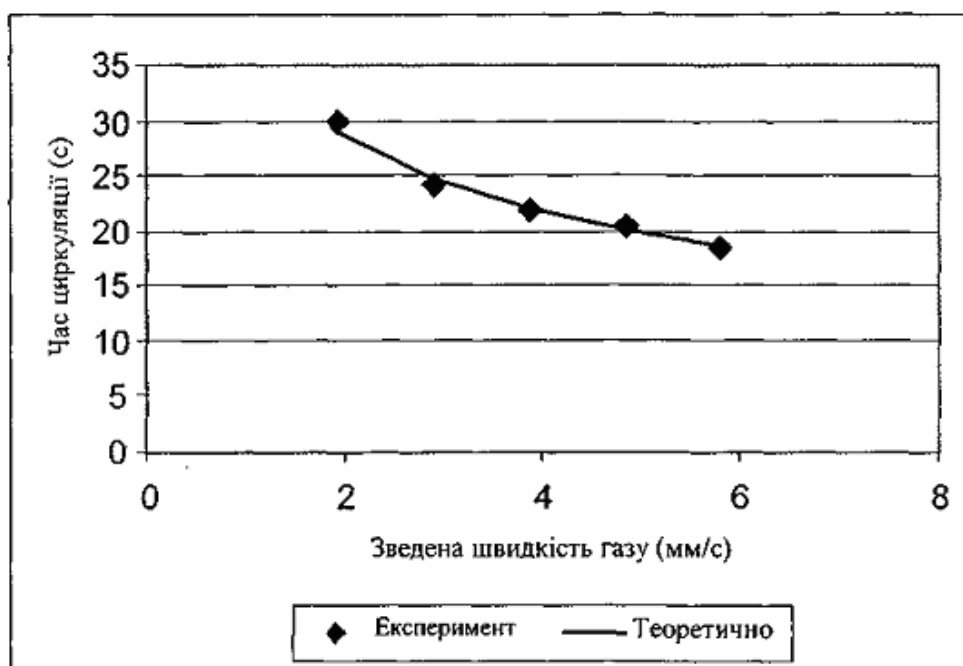
Фіг. 6.51 Залежність часу змішування від зведеної швидкості газу в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило штам дріжджів LCC3021, іммобілізований у гранулах з κ -караганового гелю (розмір гранул 1-2мм). Час змішування відповідає часу, протягом якого відбувається компенсація (обнуління) 98% східчастої зміни значення pH. (n=3)



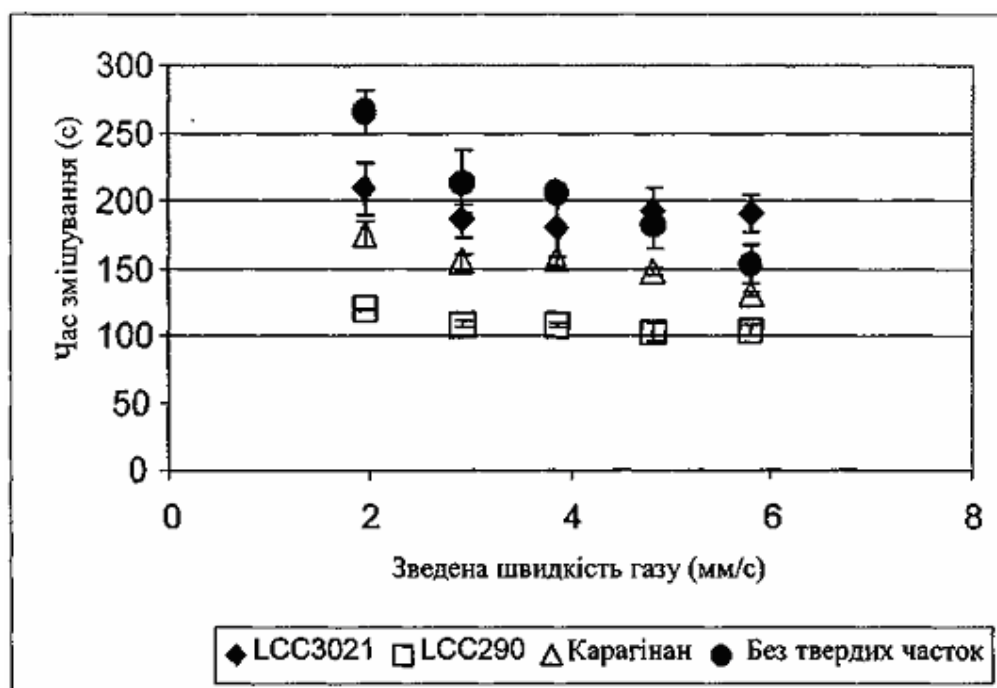
Фіг. 6.52 Залежність часу циркуляції від зведеної швидкості газу в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило штам дріжджів LCC3021, іммобілізований у гранулах з κ -карагананового гелю (розмір гранул 1-2мм).



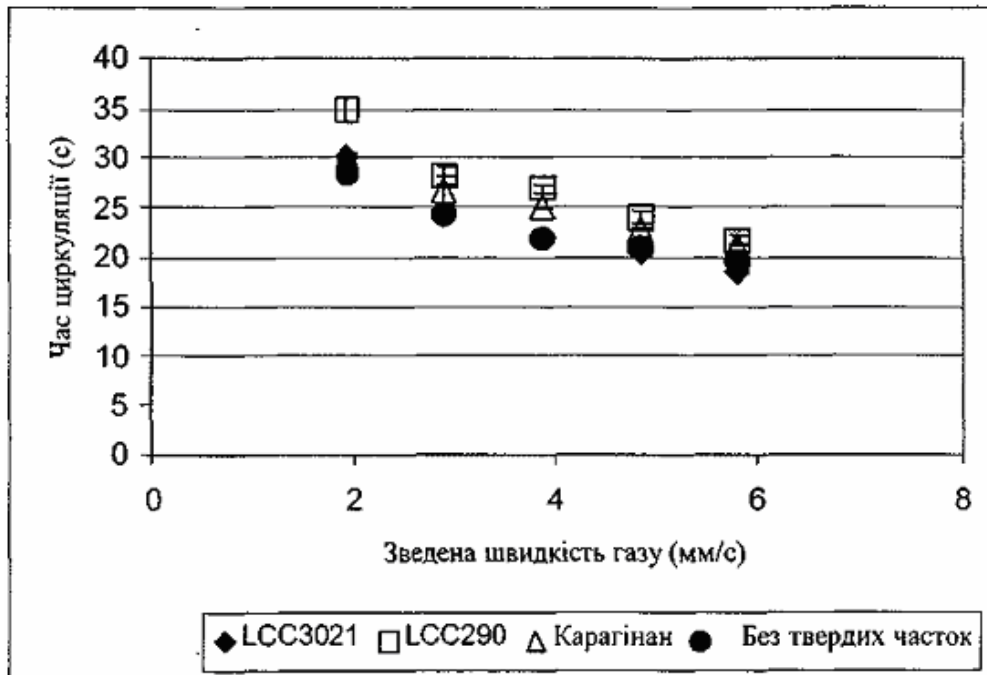
Фіг. 6.53 Залежність часу змішування від зведеної швидкості газу в біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило помірно флокулентний штам дріжджів LCC3021 (розмір флокулятів $<0,5$ мм). Час змішування відповідає часу, протягом якого відбувається компенсація (обнуління) 98% східчастої зміни значення pH. (n=3)



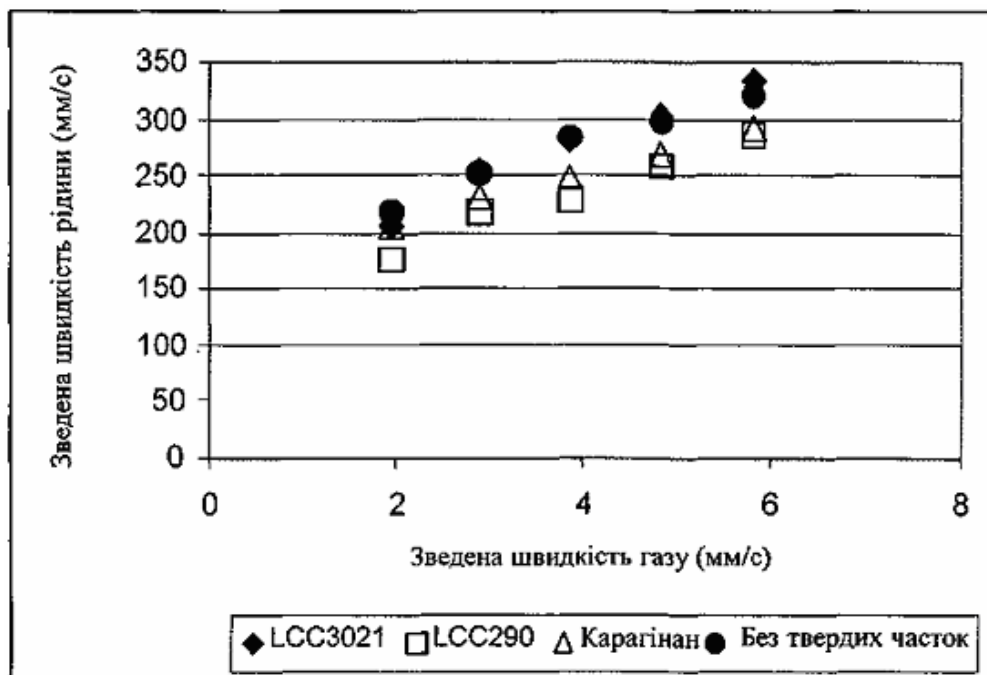
Фіг. 6.54 Залежність часу циркуляції від зведеної швидкості газу в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило помірно флокулентний штам дріжджів LCC3021 (розмір флокулятів <0,5мм). (n=3).



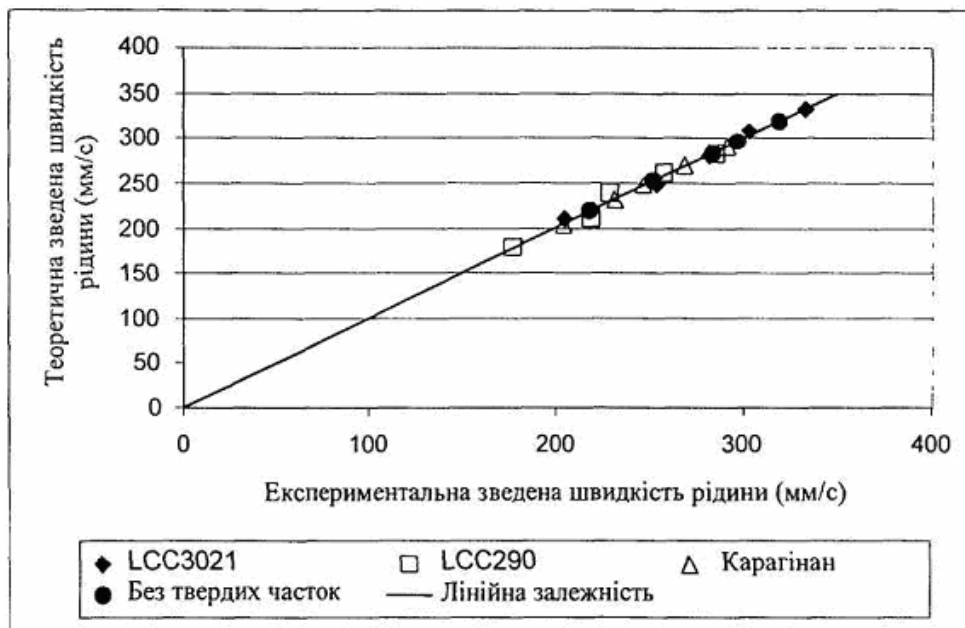
Фіг. 6.55 Залежність часу змішування від зведеної швидкості газу в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило різні типи твердих часток. Час змішування відповідає часу, протягом якого відбувається компенсація (обнуління) 98% східчастої зміни значення pH. (n=3).



Фіг. 6.56 Залежність часу циркуляції від зведеної швидкості газу в газліфному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. У середовище для бродіння, що містило різні типи твердих часток, вводили шляхом імпульсної ін'єкції кислоти, ($n=3$).



Фіг. 6.57 Залежність зведеної швидкості рідини (мм/с) від зведеної швидкості газу (мм/с) для чотирьох систем, які тестували - систем, що містять штам дріжджів LCC3021, штам дріжджів LCC290, гранули з карагінанового гелю, і системи, що являє собою водний розчин, який не містить твердих часток. Тестування проводили в газліфному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування.



Фіг. 6.58 Порівняння теоретично розрахованої зведеної швидкості рідини і зведеної швидкості рідини, визначеної на основі експерименту (мм/с) для чотирьох систем, які тестували. Теоретичні значення розраховували за допомогою наступного співвідношення, запропонованого Kennard та Janekah (1991): $V_{sl} \propto V_{sg}^m$. Лінійна залежність має тангенс кута нахилу 1 і перетинається з Y-віссю в точці $y=0$.

Таблиця 6.1

Узагальнення розрахованих кореляцій для часу змішування, швидкості циркуляції і зведеної швидкості рідини для чотирьох систем, які тестували

	Час змішування	Швидкість циркуляції	Зведена швидкість рідини
Водний розчин, який не містить твердих часток	$t_m = 336,04 V_{SG}^{-0,4}$	$t_c = 37,94 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 189,06 V_{SG}^{0,28}$
Штам дріжджів LCC290	$t_m = 181,55 V_{SG}^{-0,4}$	$t_c = 44,67 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 134,75 V_{SG}^{0,41}$
к-карагінановий гель	$t_m = 254,68 V_{SG}^{-0,4}$	$t_c = 41,73 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 171,92 V_{SG}^{0,28}$
Штам дріжджів LCC3021	$t_m = 322,07 V_{SG}^{-0,4}$	$t_c = 37,90 V_{SG}^{-0,4}$	$V_{SL} = 158,12 V_{SG}^{0,42}$

Для кореляції зведеної швидкості рідини і зведеної швидкості газу Kennard та Janekah (1991) запропонували показник ступеня, рівний 0,41 для дистильованої води і 0,64 для розчину, що містить карбоксиметилцелюлозу і етанол. Для систем, що містять штами дріжджів LCC290 і LCC3021, показники ступеня становили 0,419 і 0,427 відповідно, у той час як для системи, що містить к-карагінан, і системи водного розчину, яка не містить твердих часток, показник ступеня дорівнював 0,283.

Основне припущення при використанні методу, пов'язаного із застосуванням технології, яка базується на використанні газліфтного реактора з трубою для відсмоктування, полягає в тому, що система може забезпечувати адекватне змішування, у результаті якого компоненти у вихідному з реактора рідкому продукті повністю змішуються. Для пілотних систем з використанням реакторів об'ємом 50л як ферментерів, для безперервного процесу виробництва свіже живильне середовище ін'єктували в нижню частину реактора, що має загальний об'єм 50л, із швидкістю потоку 36мл на хвилину. Це відповідає приблизно 1000-кратному розведенню живильних компонентів. Для характе-

ристик змішування, розрахованих для системи, що містить штам дріжджів LCC290, компоненти рідини перемішувалися протягом приблизно 3 циклів циркуляції в реакторі, у той час як для варіанта з використанням водного розчину, що не містить твердих часток було потрібно 10 циклів циркуляції в реакторі. Крім того, час перебування в реакторі (24 години) приблизно в 1000 разів перевищував час змішування (180с). Швидке перемішування в поєднанні з розведенням живильних речовин у системі і значній різниці між часом змішування і часом перебування в системі переконливо свідчать про те, що перемішування системи є адекватним. Початковою передумовою використання газліфтного біореактора було те, що він забезпечує ідеально перемішане навколишнє середовище для бродіння пива. Результати дослідів по змішуванню з використанням усіх трьох носіїв для бродіння підтверджують вказане припущення.

6.5 Оцінка декількох методів іммобілізації з погляду застосування для процесу основного бродіння з використанням газліфтною системи

Досліди з безперервного бродіння здійснювали в пілотному біореакторі об'ємом 50л з трубою

для відсмоктування з використанням трьох типів іммобілізуючих носіїв - гранул з κ-карагінанового гелю, суперфлюкулентного штаму дріжджів LCC290 і помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021. Усі середовища, які зброджували, спочатку засівали до однакової концентрації інокулятом дріжджів (4г/л), а як живильне середовище використовували лагерне сусло, яке застосовують в промисловості. Бродіння починали з використанням введення однієї партії для досягнення швидкого зниження рівня цукрів у суслі, а також для того, щоб стимулювати ріст дріжджів у ферментері. У випадку флокулентних дріжджів використання цієї фази введення однієї партії дозволяло досягати утворення флокулятів дріжджів, які потім можна було зберігати в біореакторі до початку безперервного підживлення. Як тільки концентрація діацетику в рідині, яку зброджували, знижувалася до рівня нижче 30мкг/л, починали безперервне підживлення суслом. У наступних розділах більш докладно описані результати аналізів, одержані з використанням зазначених трьох типів іммобілізуючих матриць.

6.5.1 Застосування гранул з κ-карагінанового гелю: захоплення

Застосування гранул з κ-карагінанового гелю як іммобілізуючих матриць допомогло оцінити можливість застосування методу на основі газліфтної технології для основного бродіння пива (роздягнув 6.3). Було необхідно оцінити, чи може така система функціонувати протягом тривалих періодів часу (до 2 місяців) без виникнення основних виробничих проблем, включаючи нестабільність бродіння і забруднення. Робочі параметри для цього досліджу з бродіння представлені на Фіг.6.59. Зведену швидкість газоподібного діоксиду вуглецю витримували на рівні 5,5мм/с, а повітря вводили в реактор у складі цього газу, який розпилюють, із швидкістю 0,9мм/с. Таким чином, рівень оксигенування підтримували на рівні 3% від загального газу, який розпилюють, відповідає результатам, представленим у розділі 6.3, які свідчать про те, що краща якість пива виходить при введенні в систему 2-5% кисню. Температуру бродіння підтримували на рівні 15°C. У представлених даних можна знайти деякі флуктуації, що зв'язані з характеристиками використаного контрольного циклу.

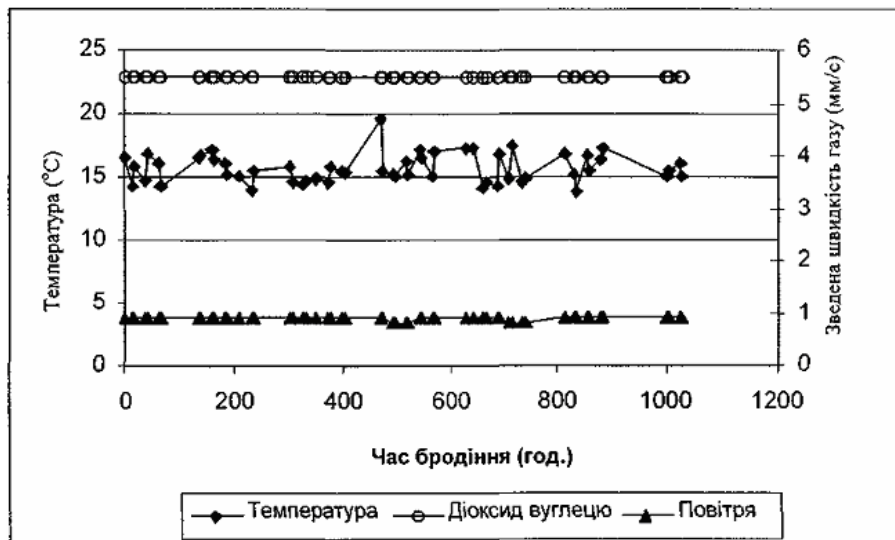
На Фіг.6.60 представлено дані про розвиток популяції вільних клітин дріжджів з часом, а також про життєздатність дріжджів. Життєздатність зберігалася на відносно високому рівні протягом 2-місячного періоду бродіння, причому приблизно через 200 годин було виявлено її короточасне зменшення. Це відповідало моменту часу безпосередньо перед початком безперервного підживлення суслом. Для процесу бродіння партії характерне зменшення життєздатності наприкінці періоду бродіння внаслідок вичерпування живильних речовин для клітин. Після початку безперервного підживлення суслом життєздатність знову піднімалася до рівня вище 90%. Популяція вільних клітин дріжджів залишалася малочисельною протягом перших 400 годин бродіння, а потім протягом наступних 300 годин вона зростала приблизно

в 10 разів від ~100 мільйонів клітин на 1мл до ~1,5 мільярдів клітин на 1мл. Досягнувши цієї максимальної концентрації популяція вільних клітин дріжджів зберігалася на цьому псевдостационарному рівні протягом залишкового періоду бродіння.

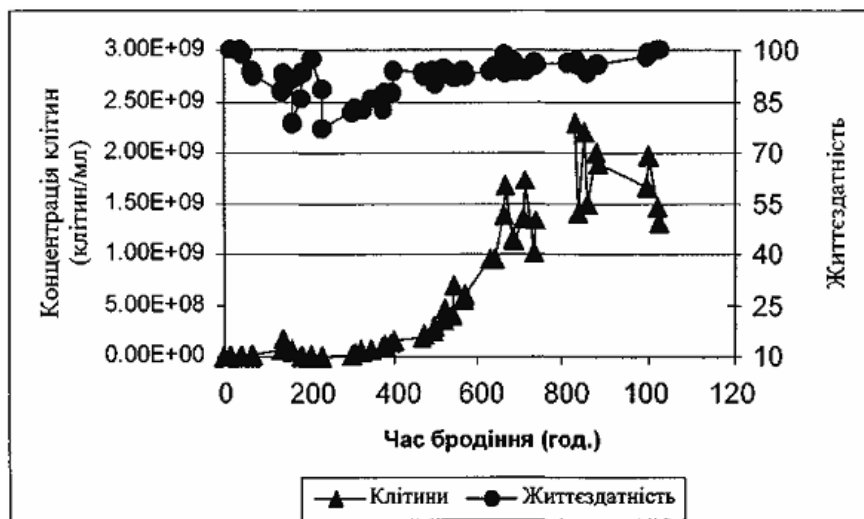
Швидке збільшення концентрації вільних дріжджів, очевидно, пов'язано з особливостями іммобілізованої популяції клітин дріжджів. На початку бродіння дріжджі, захоплені гелем, ростуть у гелі доти, поки не заповнять весь доступний простір. Після того, як гелеві гранули виявляються заповненими дріжджами, популяція, що розмножується, виділяється в навколишнє рідке середовище. Одержані результати свідчать про те, що протягом перших 400 годин іммобілізовані дріжджі росли всередині гелю, а приблизно через 700 годин дріжджі, яким більш не вистачало простору для росту всередині гранул, почали вивільняти великі кількості клітин у бульйон, який зброджували.

Ця нестабільність популяції дріжджів відбивається в профілях концентрації етанолу і питомої ваги (Фіг.6.61). Варто було очікувати, що протягом перших 200 годин бродіння концентрація етанолу буде зростати в залежності від часу, а питома вага буде зменшуватися відповідно до традиційної кінетики періодичного процесу. У період між 200 і 600 годинами концентрація етанолу виходила на постійний рівень, що становить 45г/л, а питома вага зберігалася на рівні ~6°P. Цей результат був несподіваним, оскільки повністю зброджена рідина повинна була мати питому вагу ~2,5-2,7°P. Приблизно через 600 годин, після того, як популяція вільних дріжджів саме досягла свого максимуму, концентрація етанолу зростала приблизно до 70г/л, а питома вага сусла знизилася приблизно до 2,2°P. Більш детальний аналіз залежності концентрації конкретних вуглеводів від часу (Фіг.6.62) показує, що концентрація мальтози не знижувалася протягом приблизно 600 годин процесу бродіння. Зменшення концентрації інших цукрів відбувалося очікуваним чином.

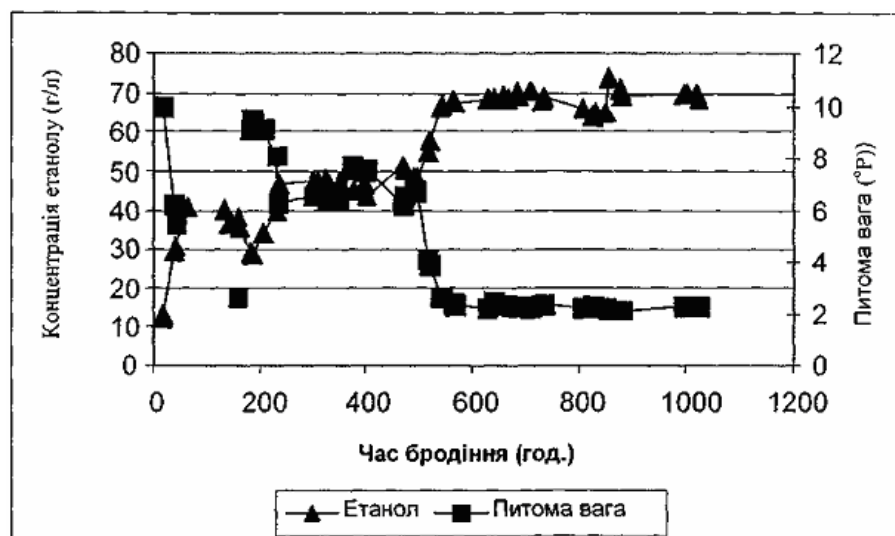
Протягом 2-місячного безперервного процесу бродіння здійснювали моніторинг двох інших компонентів, які мають вирішальне значення - діацетику і 2,3-пентандіону (Фіг.6.63). Низькі значення, одержані приблизно через 180 годин, відповідають закінченню фази бродіння партії (стартової фази). Після початку безперервного підживлення концентрації як діацетику, так і 2,3-пентандіону, швидко зростали приблизно до 500мкг/л і 400мкг/л відповідно. Таке початкове збільшення було очікуваним, оскільки підживлення свіжими живильними речовинами повинно стимулювати ріст дріжджів і тим самим підвищувати рівні надлишкових метаболітів, у результаті чого утворюються діацетил і 2,3-пентандіон. У процесі бродіння рівні 2,3-пентандіону залишалися вище 400мкг/л, у той час як концентрації діацетику знижувалися від 500 до 275мкг/л у середині безперервного процесу бродіння. Ця точка збігається також із точкою, у якій рівень діацетику ставав менше рівня 2,3-пентандіону, як це було встановлено при оцінці можливості застосування методу в розділі 6.3.



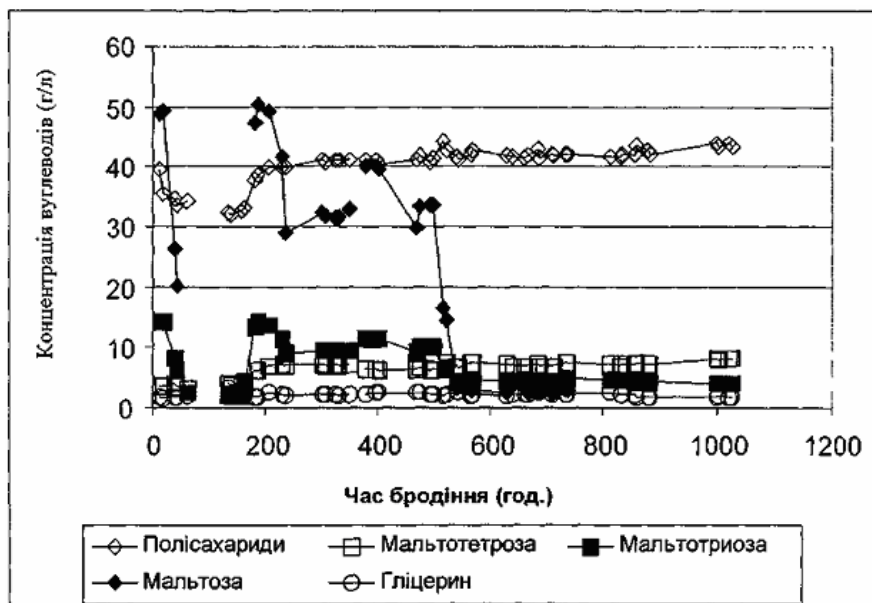
Фіг. 6.59 Залежність робочих параметрів від часу бродіння при використанні карагінану для іммобілізації в процесі бродіння.



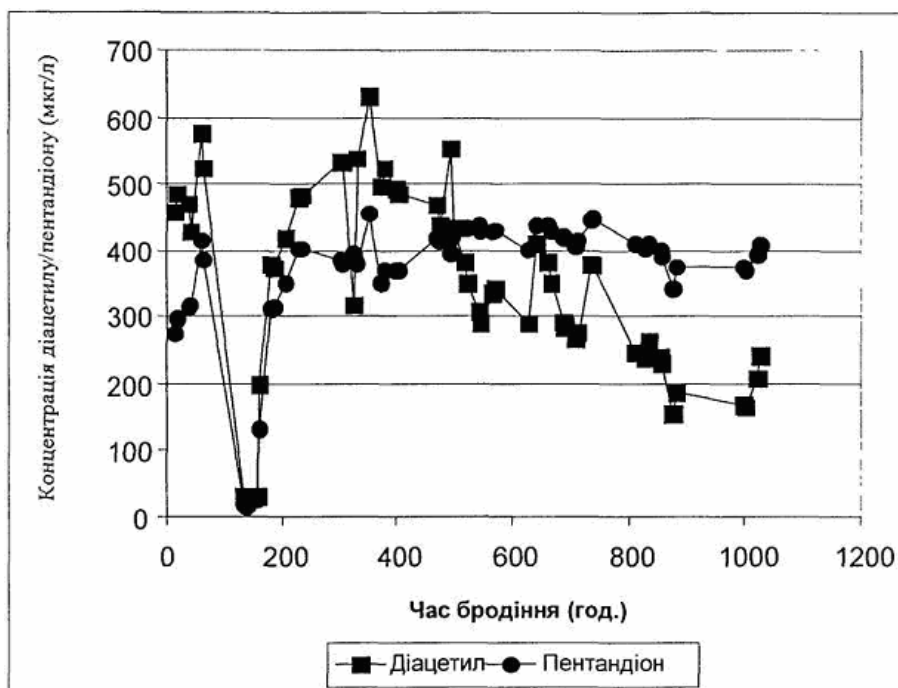
Фіг. 6.60 Залежність загальної концентрації клітин дріжджів і життєздатності іммобілізованих за допомогою κ -карагінану клітин дріжджів від часу зброджування.



Фіг. 6.61 Залежність концентрації етанолу і питомої ваги від часу в процесі безперервного бродіння з використанням іммобілізованих за допомогою карагінану дріжджів.



5 Фіг. 6.62 Залежність профілю вуглеводів від часу в процесі безперервного бродіння з використанням іммобілізованих за допомогою карагінану дріжджів.



Фіг. 6.63 Залежність концентрацій близьких дикетонів від часу в процесі безперервного бродіння з використанням іммобілізованих за допомогою карагінану дріжджів.

6.5.2 Застосування суперфлюкулентного штаму дріжджів: самофлюкуляція

Протягом 3-місячного періоду здійснювали процес безперервного бродіння в пілотному газліфтному біореакторі об'ємом 50л, завантаженому суперфлюкулентним штамом дріжджів LCC290. Швидкість розпилення газоподібного CO₂ підтримували на рівні ~2,5мм/с, а повітря вводили зі швидкістю ~0,4мм/с для певного ступеня стимулювання росту дріжджів (це відповідало тому, що при загальному об'ємі 1,51л у хвилину вводили 3% кисню). Температуру бродіння в реакторі підтримували протягом усього процесу на рівні ~15°C.

Перебої в електропостачанні привели до необхідності на три дні знизити температуру ферментера до 4°C (що становило приблизно 1700 годин бродіння) (Фіг.6.64). Таке охолодження реактора було здійснено для уповільнення метаболізму дріжджів і підтримання життєздатності дріжджів під час перебоїв в електропостачанні. Ця несподівана подія дала можливість оцінити здатність системи до швидкого відновлення у випадку збоїв, які можуть зустрічатися у випадку промислового виробництва. Після відновлення електропостачання температуру реактора знову відрегулювали до рівня 15°C і процес бродіння продовжували ще протягом

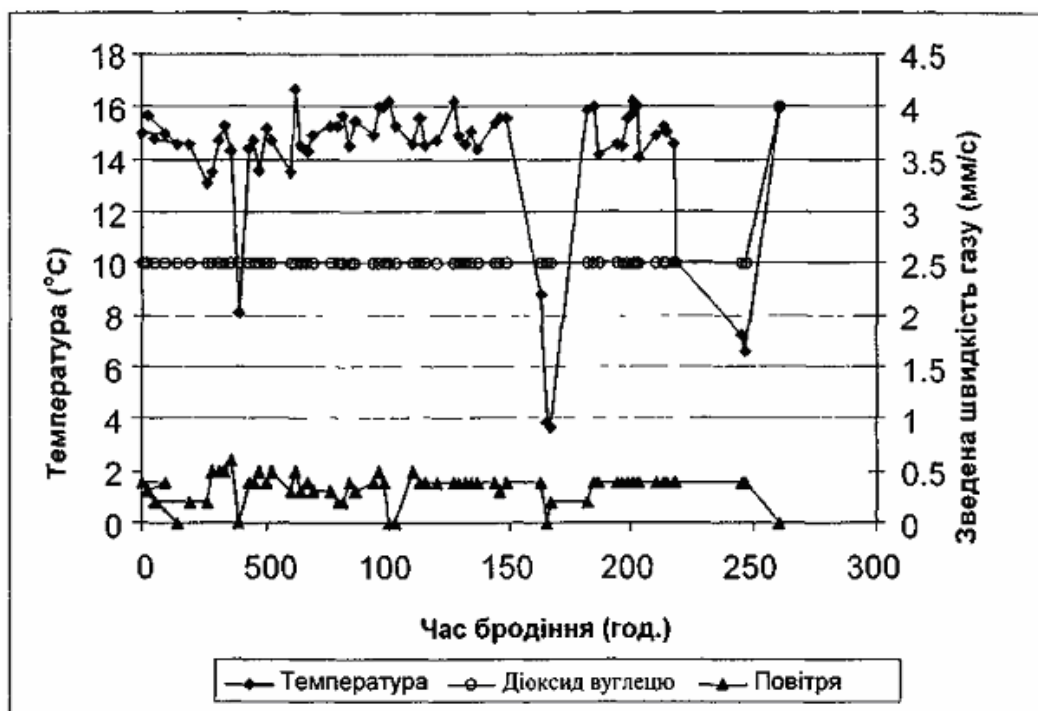
30 днів.

Після завершення початкової фази бродіння партії (~180 годин), сусло безперервно подавали в систему із швидкістю потоку 2,16л/год, що забезпечувало час перебування в реакторі з робочим об'ємом 50л, який відповідає 24 годинам. Після початкового періоду зброджування партії концентрація клітин зростала, досягаючи 3 мільярдів клітин/мл після приблизно 750 годин бродіння (Фіг.6.65). Потім ця маса клітин протягом приблизно 1000 годин зменшувалася приблизно до 1 мільярда клітин/мл і зберігалася на цьому рівні до завершення бродіння. Протягом процесу бродіння життєздатність становила більше 90% (Фіг.6.65).

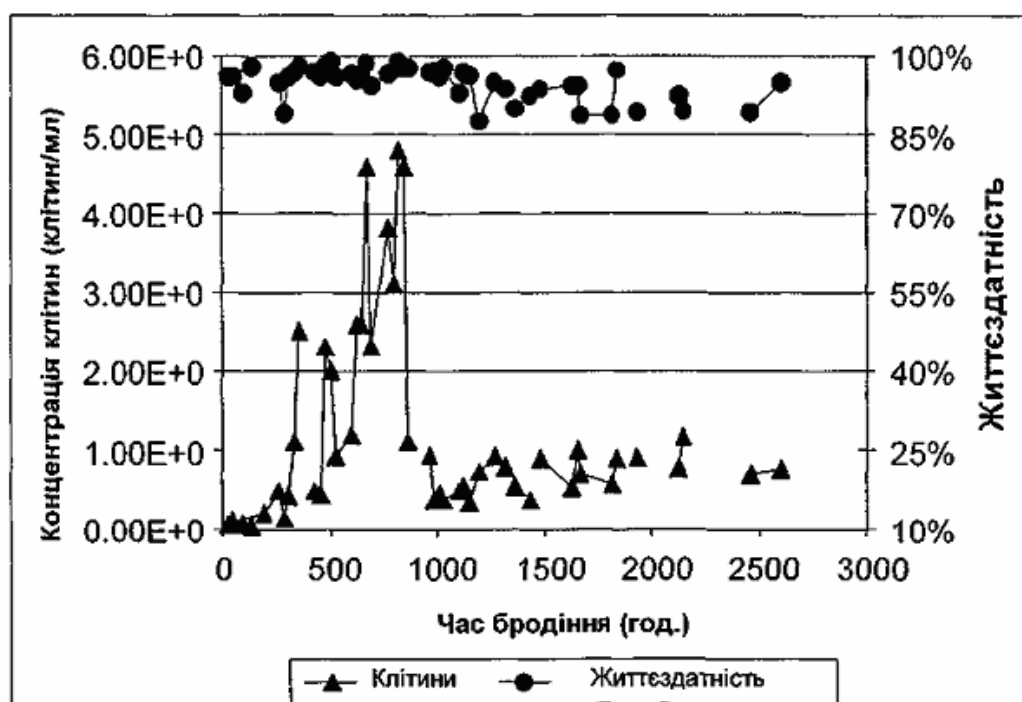
Концентрація етанолу і питома вага бульйону, який зброджували, досягали псевдостационарного стану незабаром після початку безперервного підживлення (Фіг.6.66). Концентрація етанолу зростала приблизно до 70г/л, а питома вага рідини становила ~2,3°P протягом залишкового періоду зброджування. Профілі вуглеводів, представлені на Фіг.6.67, підтверджують, що в процесі безперервного бродіння цей псевдостационарний стан зберігався протягом приблизно 270 годин. Концентрація полісахаридів знижувалася від ~42 до ~33г/л приблизно через 1400 годин після початку бродіння. Цей результат обумовлений зміною

складу партії сусла. Оскільки лагерні дріжджі не можуть поглинати ці полісахариди, то зазначена аномалія істотно не впливала на продуктивність резервуару для основного бродіння. Цю різницю вмісту цукрів, які не зброджуються, може відчути досвідчений дегустатор, який відзначить, що продукт має "рідку" консистенцію.

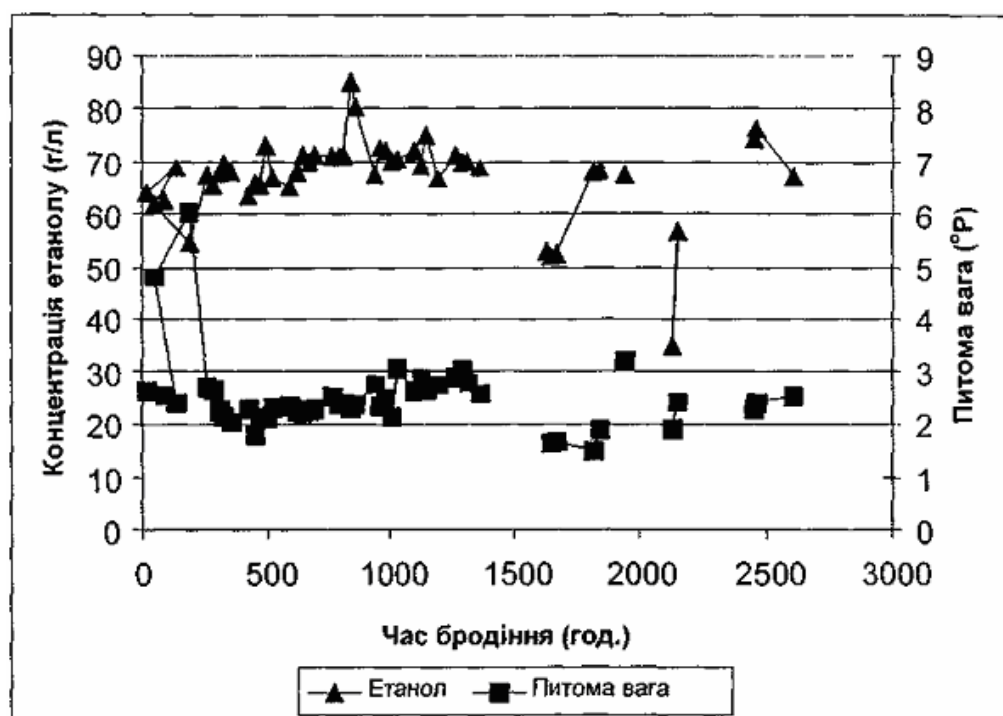
На Фіг.6.68 представлено залежності концентрацій діацетику і 2,3-пентандіону від часу. Так само, як і у випадку безперервного процесу бродіння з використанням к-карагінану, рівні діацетику і 2,3-пентандіону зростали після початку безперервного підживлення суслом. Концентрація діацетику досягала приблизно 375мкг/л, тоді як концентрація 2,3-пентандіону становила приблизно 600мкг/л. Ці концентрації зберігалися протягом процесу бродіння аж до збою в електропостачанні, який відбувся приблизно через 1700 годин. Оскільки рідина знаходилася в резервуарі протягом 3 днів і при цьому не відбувався подальший метаболізм дріжджів (внаслідок відсутності подачі живильних речовин), то рівні близьких за будовою дикетонів знижувалися. Після поновлення підживлення сусло й концентрації діацетику і 2,3-пентандіону повернулися до своїх псевдостационарних величин.



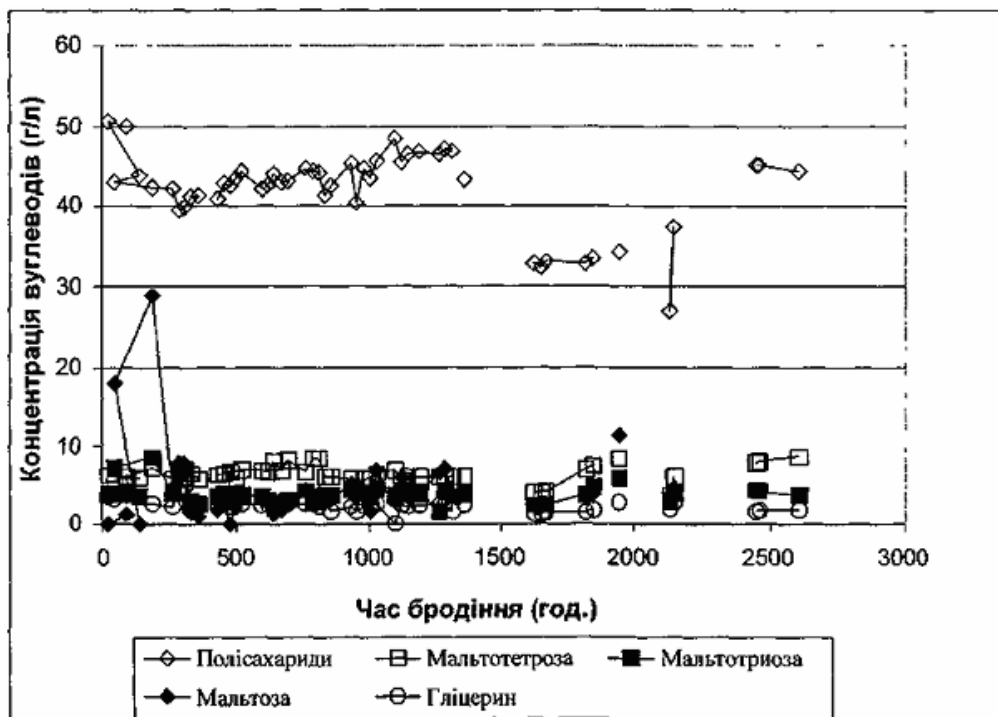
Фіг. 6.64 Залежність робочих параметрів від часу бродіння при використанні штаму дріжджів LCC290.



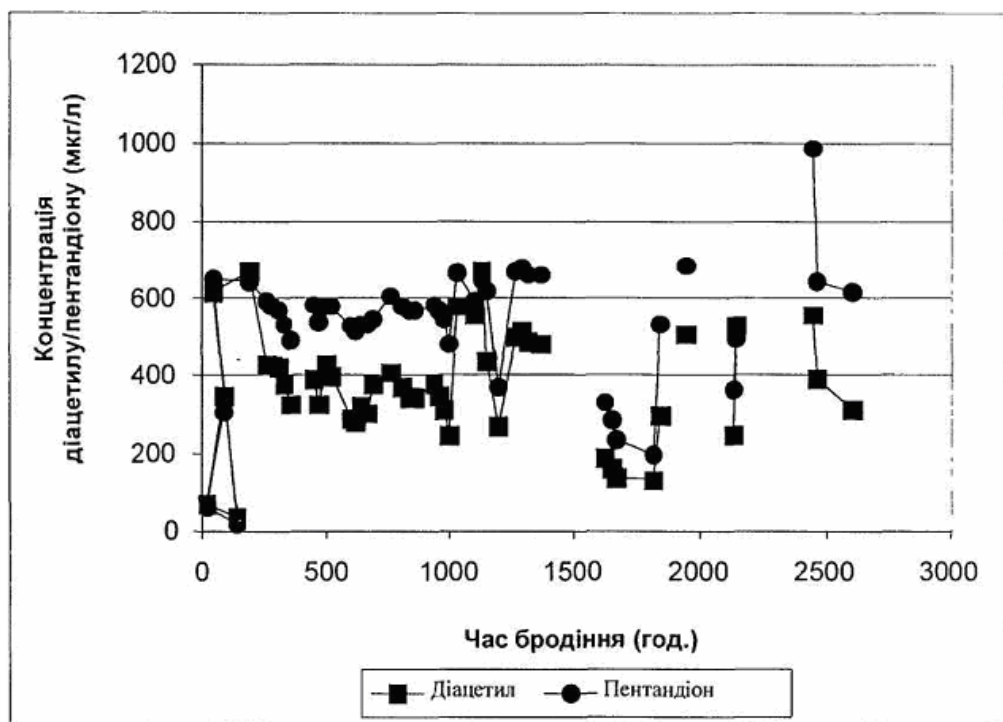
Фіг. 6.65 Залежність загальної концентрації клітин і життєздатності штаму дріжджів LCC290 від часу бродіння.



Фіг. 6.66 Залежність концентрації етанолу і питомої ваги суміші, яку зброджують, від часу в процесі безперервного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290.



Фіг. 6.67 Залежність профілю вуглеводів від часу бродиння в процесі безперервного бродиння з використанням штаму дріжджів LCC290.



Фіг. 6.68 Залежність концентрації близьких за будовою дикетонів від часу бродиння в процесі безперервного бродиння з використанням штаму дріжджів LCC290.

6.5.3 Застосування помірно флокулентних дріжджів: самофлокуляція

Було проведено декілька дослідів з бродиння при використанні як іммобілізуючої матриці помірно флокулентного штаму дріжджів LLC3021 у пілотному газліфтному біореакторі об'ємом 50л. Як і для двох попередніх варіантів іммобілізації,

початкова концентрація дріжджів дорівнювала 4г/л. Ці дріжджі вводили в лагерне сусло, яке застосовували для промислового виробництва, (як описано в розділі 4.2) і піддавали зброджуванню в партії доти поки не відбувалося поглинання всіх цукрів, які зброджують, і рівень діацетилю не став нижче 30мкг/л. Температуру бродиння під-

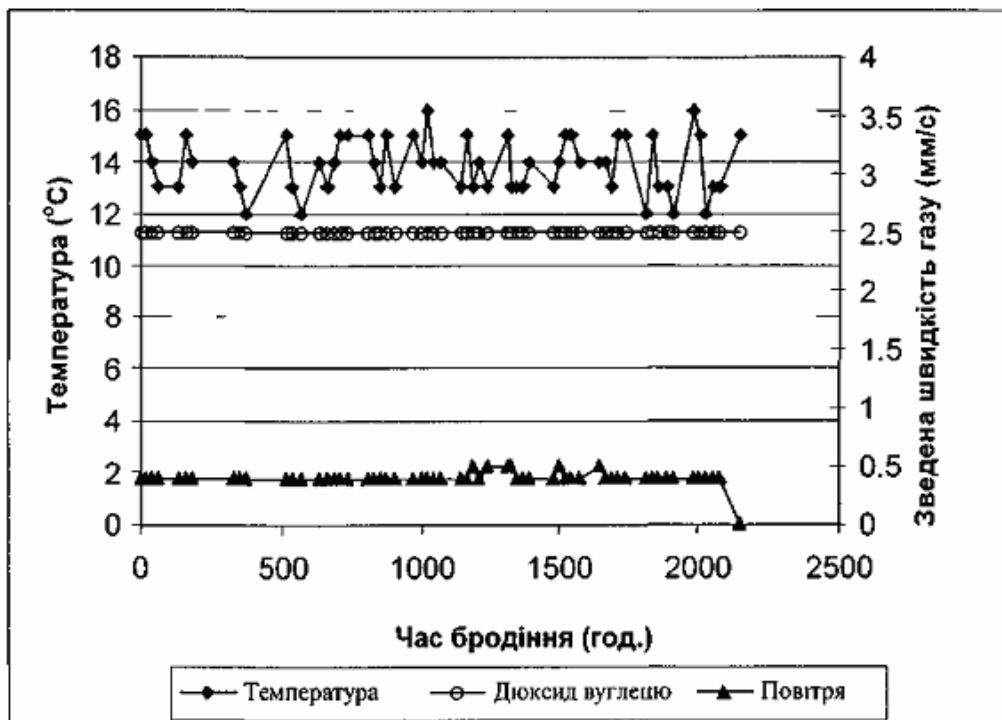
тримували на рівні 15°C, а швидкість газу, який розпилюють, підтримували на тому ж рівні, що і при бродінні з використанням штаму LCC290 (зведена швидкість газоподібного діоксиду вуглецю становила ~2,5мм/с, а повітря ~0,4мм/с, що забезпечувало вміст кисню в загальному об'ємі газу, який розпилюють, приблизно 3%) (Фіг.6.69).

Ця початкова стадія бродіння партії дозволяла клітинам дріжджів флокулювати й отже було більш легко утримувати їх у газліфтній системі. Після завершення початкової стадії бродіння партій швидкість підживлення сушом встановили на рівні 2,16л/год, що відповідало часу перебування в реакторі ~24 години для реактора з робочим об'ємом 50л. Популяція дріжджів (Фіг.6.70) зростала до приблизно 1 мільярда клітин на мілілітр і зберігалася на цьому рівні протягом більше 1000 годин (у період між 500 і 1500 годин процесу безперервного зброджування). Після приблизно 1500 годин бродіння популяція дріжджів раптово подвоювалася і зберігалася на рівні 2 мільярди клітин/мл. Така зміна популяції клітин була несподіваною. Життєздатність дріжджів у процесі бродіння зберігалася на рівні вище 90% (Фіг.6.70).

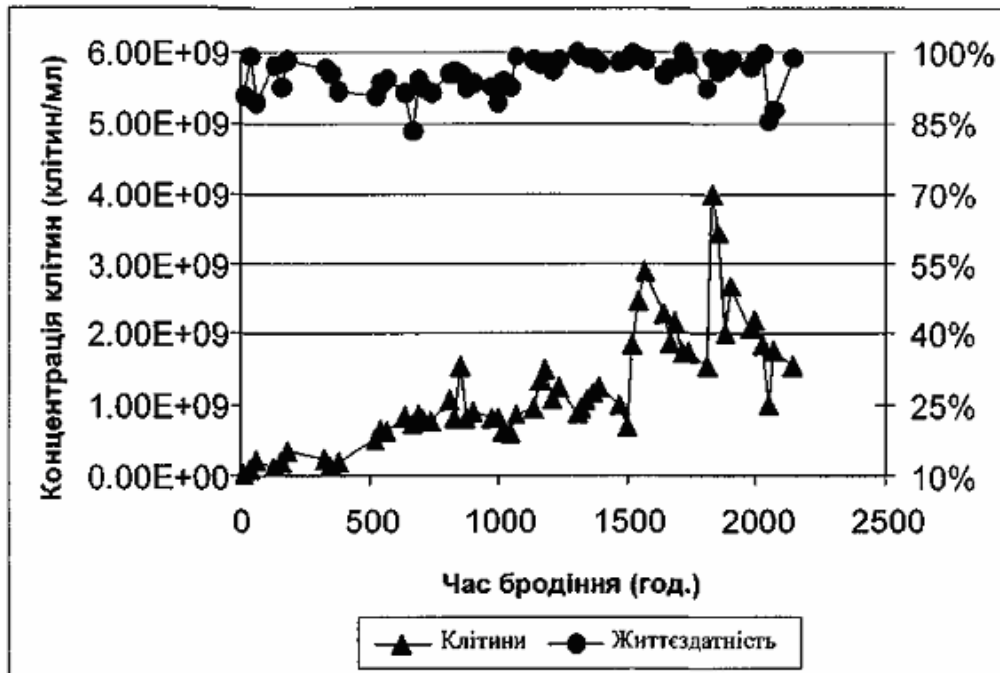
На Фіг.6.71 представлено дані про концентрацію етанолу і питому вагу бульйону, який зброджували, протягом 3-місячного процесу безперервного бродіння. Відразу після початкової фази бродіння партії (через 180 годин) концентрація етанолу виходила на рівень 70г/л, а питома вага

досягала мінімального значення ~2,2°P. Раптове збільшення популяції дріжджів, описане вище, не приводило до зменшення концентрації етанолу. Найбільш логічним поясненням цього збільшення популяції дріжджів може бути те, що велика частина загальної популяції дріжджів вступила у фазу росту, в результаті чого відбувалося зазначене подвоєння концентрації дріжджів. Очікувалося, що зменшення концентрації етанолу буде співпадати із збільшенням концентрації дріжджів, однак, очевидно, що це не відбулося, оскільки концентрація етанолу зберігалася на своєму псевдостационарному рівні, що становить 70г/л, протягом безперервного процесу бродіння. Щодо залежності профілів концентрації вуглеводів від часу бродіння (Фіг.6.72) можна зробити такі ж висновки, що і для кривих концентрації етанолу і питомої ваги. У цьому досліді вони досягали свого псевдостационарного рівня приблизно через 250 годин безперервного бродіння:

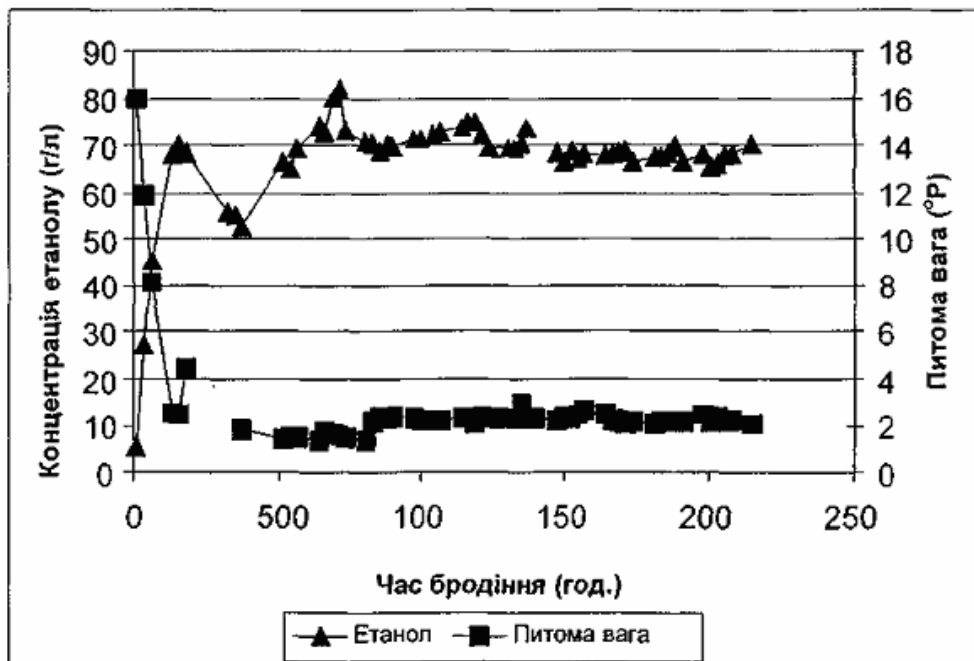
На Фіг.6.73 представлено залежності концентрацій діацетилю і 2,3-пентандіону від часу бродіння. Аналогічно результатам аналізу близьких за будовою дикетонів, які одержали при використанні к-карагінанового гелю і штаму дріжджів LCC290, концентрації діацетилю і 2,3-пентандіону зростали після початкової фази процесу бродіння партії, досягаючи псевдостационарних значень ~225мкг/л і 400мкг/л відповідно.



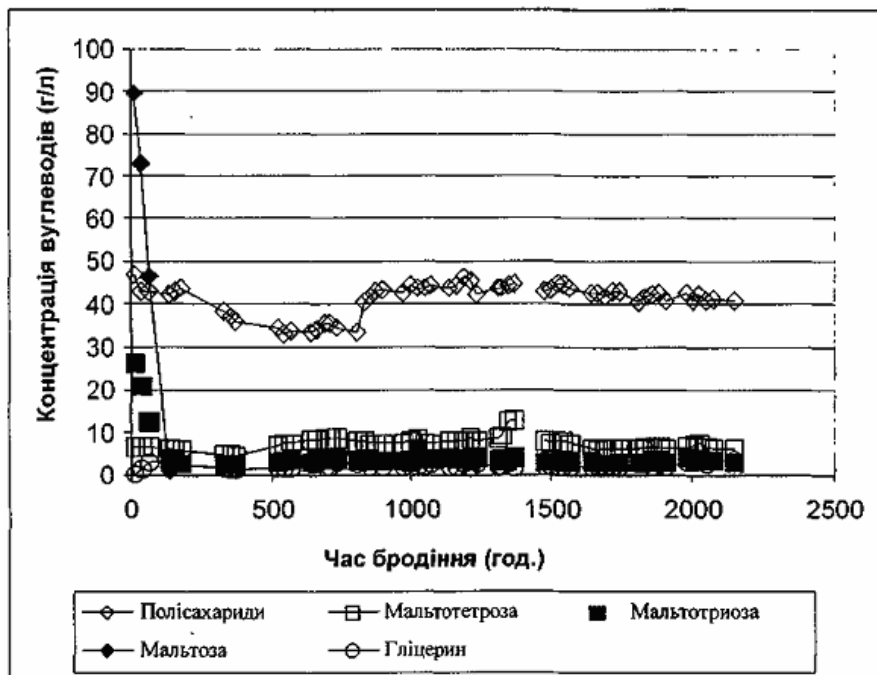
Фіг. 6.69 Залежність робочих параметрів процесу бродіння з використанням штаму LCC3021 від часу бродіння.



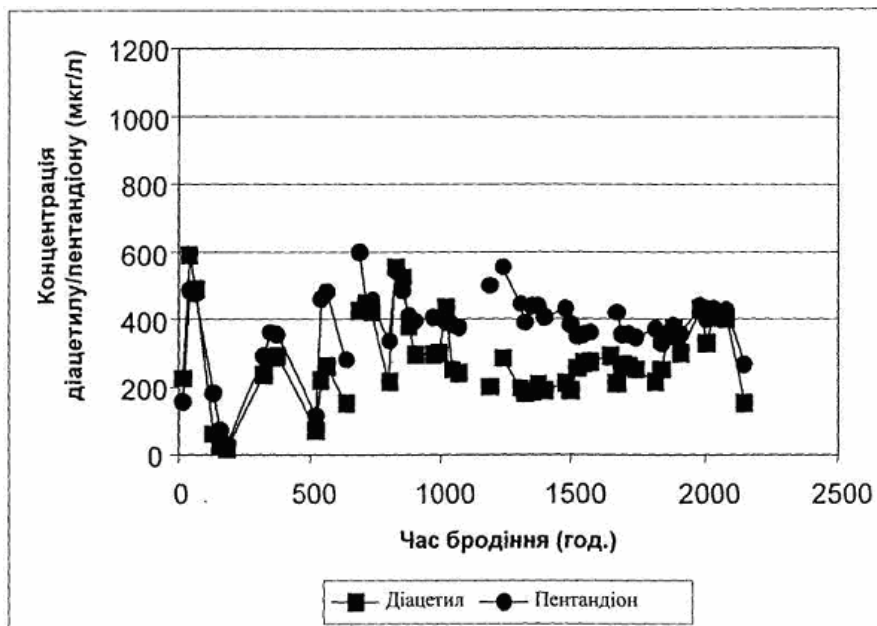
Фіг. 6.70 Залежність концентрації клітин дріжджів і життєздатності клітин штаму дріжджів LCC3021 від часу бродіння.



Фіг. 6.71 Залежність концентрації етанолу і питомої ваги середовища, яке зброджували, від часу бродіння при безперервному процесі бродіння з використанням штаму LCC3021.



Фіг. 6.72 Залежність профілю вуглеводів від часу бродіння при безперервному процесі бродіння з використанням штаму LCC3021.



Фіг. 6.73 Залежність концентрації близьких за будовою дикетонів від часу бродіння при безперервному процесі бродіння з використанням штаму LCC3021.

6.5.4 Порівняння різних носіїв

У розділах 6.5.1-6.5.3 наведено характеристики процесу бродіння при використанні як іммобілізуючих матриць гранул з κ-карагінанового гелю, суперфлюккулентного штаму дріжджів LCC290 і помірно флюккулентного штаму дріжджів LCC3021. Передбачалося, що всі три носії придатні для безперервного процесу основного бродіння в пілотному газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відводу. В усіх трьох випадках час перебування в біореакторі становив 24 години. У дослідях з бродіння при використанні суперфлюккулентного штаму дріжджів LCC290 псевдо-

стаціонарний стан досягався набагато швидше, ніж з використанням систем іммобілізації клітин на основі помірно флюккулентного штаму дріжджів LCC3021 і κ-карагінану. При бродінні з використанням штаму LCC290 максимальна концентрація етанолу, яка дорівнює 70г/л, досягалася приблизно через 250 годин бродіння. При використанні штаму LCC3021 концентрація етанолу виходила на стаціонарний рівень 70г/л приблизно через 600 годин. При використанні κ-карагінану для безперервного бродіння концентрація етанолу в процесі бродіння виходила на постійний рівень у два різні моменти часу. Споча-

тку концентрація етанолу досягала рівня 45г/л у період між 200 і 500 годинами і потім зростала до 70г/л приблизно через 575 годин бродіння і зберігалася на цьому рівні до кінця досліду.

При використанні всіх трьох систем бродіння, очевидно, досягалася максимальна концентрація вільних клітин дріжджів, що дорівнює ~1 мільярд клітин/мл. Неузгодженість збільшення концентрації дріжджів негативно впливала на виробництво етанолу при використанні системи, яка базується на використанні *к-карагінану* (більш низька псевдостационарна концентрація етанолу в порівнянні із системою, яка базується на використанні штаму дріжджів LCC290). Для кожної системи концентрація дріжджів досягала максимального рівня через різні проміжки часу. У дослідях з використанням штаму LCC290 концентрація етанолу досягала максимуму в період між 500 і 1000 годин безперервного зброжування, у той час як при безперервному бродінні з використанням штаму LCC3021 максимальна кількість клітин досягалася в період між 1500 і 2000 годин. При використанні системи іммобілізації на *к-карагінані* максимальна концентрація клітин досягалася в період між 700 і 1000 годин безперервного бродіння.

Псевдостационарні концентрації діацетику в дослідях з бродіння при використанні трьох типів іммобілізованих клітин, а саме суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290, помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021 і іммобілізованих на *к-карагінані* дріжджів, були різними. При бродінні з використанням штаму LCC290 концентрація діацетику виходила на рівень 375мкг/л, у той час як при бродінні з використанням штаму LCC3021 цей рівень становив приблизно 225мкг/л. При бродінні з використанням *к-карагінану* концентрація діацетику досягала 500мкг/л і в середині процесу бродіння її рівень поступово знижувався до приблизно 200мкг/л протягом періоду часу, що становить 500 годин. В усіх трьох дослідях залежність концентрації 2,3-пентандіону відповідала залежності концентрації діацетику, причому при бродінні з використанням штамів LCC290 і LCC3021 концентрації 2,3-пентандіону перевищували концентрації діацетику. У дослідях з використанням *к-карагінану* була виявлена інша картина, у цьому випадку рівні діацетику протягом його першого псевдостационарного стану перевищували рівні 2,3-пентандіону, після чого концентрація діацетику ставала меншою концентрації 2,3-пентандіону. Результати вимірювання концентрації дріжджів і результати оцінки виробництва етанолу також підтверджують наявність двох різних і унікальних псевдостационарних станів, що виникають при бродінні з використанням *к-карагінану*.

Задача порівняння різних систем бродіння й оцінки того, яка з них є більш ефективною, може виявитися складною, якщо якості системи оцінюють на основі більше ніж одного критерію. Наприклад, якщо для оцінки ефективності використовують тільки виробництво етанолу, то всі три системи, які тестували є еквівалентними, оскільки у всіх випадках у реакторі об'ємом 50л протягом 24-годинного періоду перебування в реакторі

утворювалося 70г/л етанолу.

При виробництві пива, призначеного для продажу потрібно оцінювати не тільки одержання етанолу. Запропоновану систему бродіння необхідно оцінювати у відношенні її здатності робити прийнятне пиво (серед іншого оцінювати рівні етанолу і діацетику), можливого підвищення витрат на носій, доступності носія, простоти роботи системи, аспектів, зв'язаних з навколишнім середовищем, таких як повторне використання носія, стабільність носія, а також ступеня адаптації, що забезпечується системою носія. Для оцінки такого багатфакторного процесу у світі бізнесу застосовують метод безрозмірного аналізу, який називається "Збалансована таблиця балів" (Kaplan та Norton, 1996). Перший крок полягає в ідентифікації критеріїв, по яких варто оцінювати систему. Для кожного критерію призначають шкалу оцінки в балах від 1 до 5, при цьому 1 відповідає найменш кращому варіанту, а 5 - найбільш кращому варіанту. Наприкінці аналізу бали для кожного параметра підсумовують і вважається, що варіант із найбільшим балом є найкращим за даних обставин.

У таблиці 6.2 представлені результати аналізу за методом Збалансованої таблиці балів, проведеного для оцінки іммобілізуючих носіїв, які розглядали як можливі варіанти для застосування при бродінні в пілотному газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування. З головної точки зору, а саме, застосування для виробництва призначеного для продажу пива була зроблена оцінка всього шести носіїв - хітозанових гранул Chitopearl®, гранул з діатомової землі Celite®, скляних гранул Siran®, гранул з *к-карагінанового* гелю, помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021 і суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290. Кожну систему носія оцінювали за допомогою вище вказаної шкали. У цілому найкращими виявилися характеристики суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290, близькими до них виявилися характеристики помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021. Чотири інших носії одержали бали від 16 до 20. Третью за ступенем переваги виявилася система на основі *к-карагінану*, оскільки в пілотній установці було зроблено придатне для продажу пиво.

Результати цієї оцінки переконливо свідчать про те, що при розробці перспективних систем безперервного бродіння основну увагу варто приділяти самоагрегації як формі іммобілізації. Доступність (легко доступний), вартість (низька вартість, оскільки не потрібно додаткове обладнання), простота маніпуляцій (погоджуються з операціями для існуючих заводських установок) самі по собі переважають недолік, пов'язаний з можливою нестабільністю флокулятив дріжджів у системі з перемішуванням. Може виявитися можливим використовувати чутливість самоагрегатів до зсувних зусиль для контролю розміру флокулятив у процесі бродіння і може виявитися можливим збільшувати перенос маси і отже додатково підвищувати об'ємну продуктивність біореактора.

Таблица 6.2

Порівняння декількох іммобілізуючих носіїв,
які застосовують для основного зброджування пива в системі газліфтного біореактора

	Chitopearl®	Celite®	Siran®	Капагінан	LCC3021	LCC290
Пиво гарної якості	3	1	1	4	5	4
Вартість	2	3	1	3	5	5
Доступність	1	5	5	2	5	5
Простота маніпуляцій	3	1	1	3	4	5
Повторне використання/забруднення навколишнього середовища	4	3	4	2	3	3
Стабільність	4	1	1	3	2	3
Пристосованість	3	3	3	1	2	5
Всього	20	17	16	18	26	30

6.6 Виробництво лагерного пива Північно-американського типу з використанням технології, яка базується на застосуванні газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування

Виробництво лагерного пива Північно-американського типу (NA), що має чистий смак, створює багато проблем для пивовара. Лагерні види пива NA-типу характеризуються світлим кольором і букетом смаку, який відрізняється слабкою гіркотою, низьким вмістом залишкового цукру (водянисті), вони не мають домінантного смаку і отже майже не мають залишкового присмаку. Внаслідок цих властивих пиву властивостей пивовар має досить обмежені можливості для маскування смакових дефектів. З погляду смакових якостей, проблемами, що найбільш часто зустрічаються, з якими зіштовхуються в даний час пивовари, є високі рівні діацетилу (масляний присмак), ацетальдегіду (присмак зеленого яблука), а також сірчасті присмаки (пригорілої гуми, смороду, присмак гнилих яєць, присмак варених овочів). Хоча причиною цих сторонніх присмаків може бути також бактеріальне забруднення середовища, яке зброджують, частіше причиною виникнення більш високих у порівнянні з очікуваними рівнів сторонніх присмаків є недотримання належного контролю процесу бродіння.

Під час дослідів по безперервному бродінню, що були проведені при створенні даної дисертації і є її складовою частиною, контроль рівнів забруднення як у суслі, так і резервуарах для зброджування, здійснювали шляхом ретельного застосування методів асептики. У дослідях з бродіння при використанні усіх трьох типів носіїв, які продовжувалися кілька місяців, не було виявлено рівнів забруднювачів, що виявляються, (моніторинг здійснювали за допомогою методів, описаних у главі 4). Більш високі, ніж це було б бажано, рівні діацетилу (було потрібно, щоб концентрація була менше 30мкг/л) і ацетальдегіду (було потрібно, щоб концентрація була менше 10мг/л) погіршували якість продуктів, одержуваних шляхом безперервного основного бродіння, однак ці рівні не були обумовлені бактеріальним зараженням. Ці дані не розходяться з даними, опублікованими в літературі [Rajunen та ін., 2000; Kronlof та ін., 2000]. Бельгійський пивовар вико-

ристовував високі рівні ацетальдегіду в пиві, які одержуються в процесі безперервного бродіння, у якості характерної торговельної ознаки і продавав продукт під виглядом елю з яблучним смаком [Andries та ін., 1996b].

Високі рівні діацетилу, які одержували після основного бродіння, також є звичайними в пивоварній промисловості. Деякі пивовари після завершення основного бродіння для зменшення вмісту діацетилу застосовують метод, який називають "вільним підвищенням температури". Інші вибирають метод, що полягає в простому витримуванні продуктів протягом більш тривалих періодів часу в процесі дозрівання для зниження вмісту близьких за будовою дикетонів (діацетилу і 2,3-пентандіону) до необхідних рівнів. Кілька груп дослідників, використовуючи інший підхід, розробили технологію швидкого дозрівання для зменшення високих рівнів діацетилу, що описана в главі 2. Хоча цей підхід є дуже ефективним, він приводить до додаткового ускладнення загального процесу виготовлення пива, що для деяких пивоварів може виявитися важко реалізувати.

Економічна сторона процесу швидкого дозрівання досить прозора, однак у цей перший час при впровадженні безперервного процесу в пивоварній промисловості може виявитися доцільним мінімізувати технологічну складність для полегшення переходу від традиційного періодичного процесу бродіння до процесу безперервного виробництва. Внаслідок цього було прийнято рішення застосовувати витримування партій після безперервного основного бродіння в пілотних газліфтних системах об'ємом 50л для контролю високих рівнів діацетилу в готовому пиві. Ця додаткова стадія обробки не була передбачена на початку програми роботи над даною докторською дисертацією, однак виявилось необхідним включити цю стадію для того, щоб порівнювати види пива, одержані за допомогою, безперервного процесу з видами пива, що використовувалися як контроль, які одержували за допомогою періодичного процесу.

6.6.1 Використання витримування партій після безперервного процесу основного бродіння

Основним параметром при визначенні закінчення основного бродіння є рівень діацетилу в

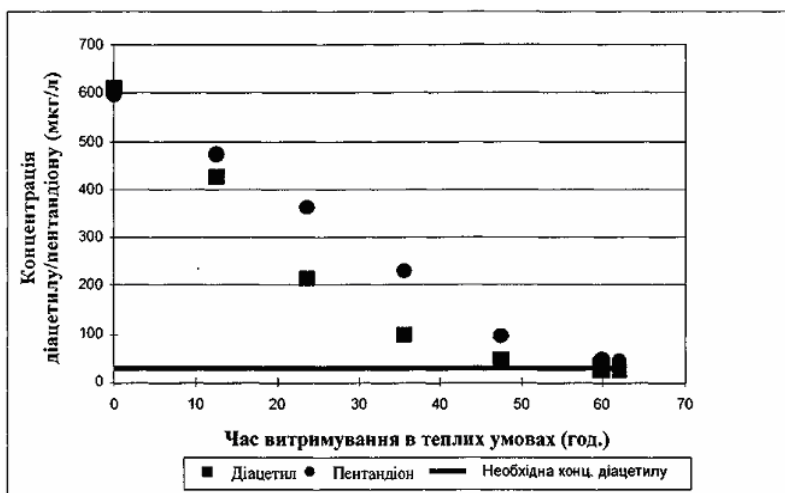
кінцевому середовищі, яке зброджують. Перетворення α -ацетолактату, що є попередником діацетилю, у діацетил являє собою стадію, що обмежує швидкість в процесі утворення діацетилю (Фіг.3.5). Ця перша реакція є хімічною реакцією, що істотно залежить від температури. Якщо "зелене" пиво піддають процесу холодного дозрівання до того як відбулося хімічне перетворення α -ацетолактату в діацетил, то одержане пиво може мати вміст діацетилю, який перевищує поріг смакового відчуття, що становить 20мкг/л, якщо його не піддають дозріванню шляхом охолодження протягом тривалих періодів часу для того, щоб відбулося повільне перетворення попередника. Для всіх трьох варіантів безперервного процесу бродіння, описаних у розділі 6.5, рівень діацетилю на виході з реактора перевищував необхідний рівень 30мкг/л у нерозбавленому пиві. Якщо на цій стадії здійснювали фільтрацію рідини для вилучення дріжджів, то рівень діацетилю залишався високим, тому застосовували період витримання партій у теплих умовах для зменшення вмісту діацетилю нижче максимального припустимої межі.

Одержане за допомогою безперервного процесу бродіння пиво збирали і витримували в резервуарах з нержавіючої сталі для пива об'ємом 40л при 21°C. З рідини регулярно відбирали невеликі зразки (100мл) і аналізували для визначення вмісту діацетилю, етанолу, питомої ваги вмісту ефірів і спиртів сивушних масел. На Фіг.6.74 представлено зменшення вмісту діацетилю в залежності від часу витримання в теплих умовах для однієї партії пива, одержаного за допомогою процесу безперервного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290 як іммобілізуючої матрицю. Використання періоду витримання в теплих умовах виявилось ефективним і приводило до зменшення вмісту діацетилю від ~600мкг/л до рівня нижче 30мкг/л, що вважається в пивоварній промисловості максимально припустимою межею ("pre-drop").

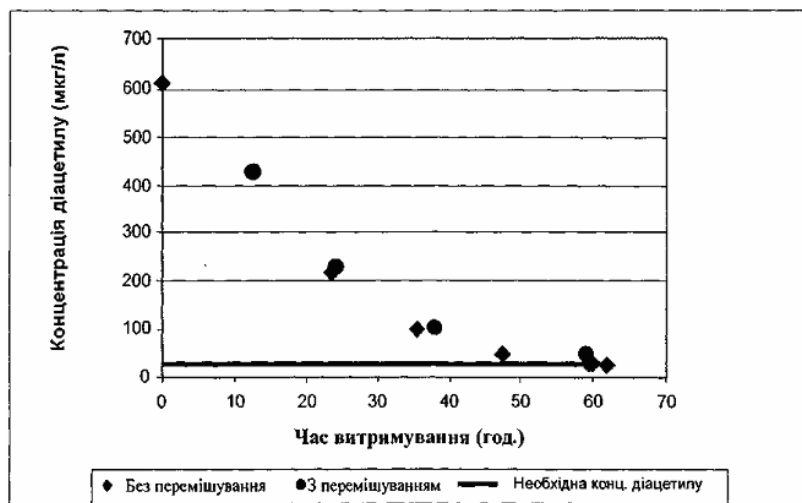
В іншому досліді вивчали вплив перемішування на зменшення вмісту діацетилю в період витримання. Газ, який розпилювали, що являє

собою діоксид вуглецю ($0,14\text{м}^3/\text{год}$) вводили через трубопровід з нержавіючої сталі діаметром 1,27см у нижню частину резервуару для збору пива для того, щоб здійснювати перемішування рідини протягом періоду витримання. На Фіг.6.75 представлено результати цього експерименту. Видно, що перемішування за допомогою розпилення CO_2 впливало на швидкість зниження вмісту діацетилю в цьому резервуарі для вторинного витримання. Цей результат може свідчити про неадекватне змішування, що досягається при використанні для змішування газоподібного CO_2 , у результаті чого не підвищується швидкість 1-ої хімічної реакції (перетворення α -ацетолактату в діацетил) або не підвищується швидкість переносу маси, що необхідно для більш швидкого здійснення 2-ої реакції (перетворення діацетилю в ацетоїн за допомогою дріжджів). Можливо, що в резервуарі, що не перемішувався, містилася достатня кількість клітин у суспензії для того, щоб ще більше сповільнити перетворення діацетилю в ацетоїн, який не має смаку, оскільки відбувалося хімічне перетворення (1-а стадія), яке обмежувало швидкість.

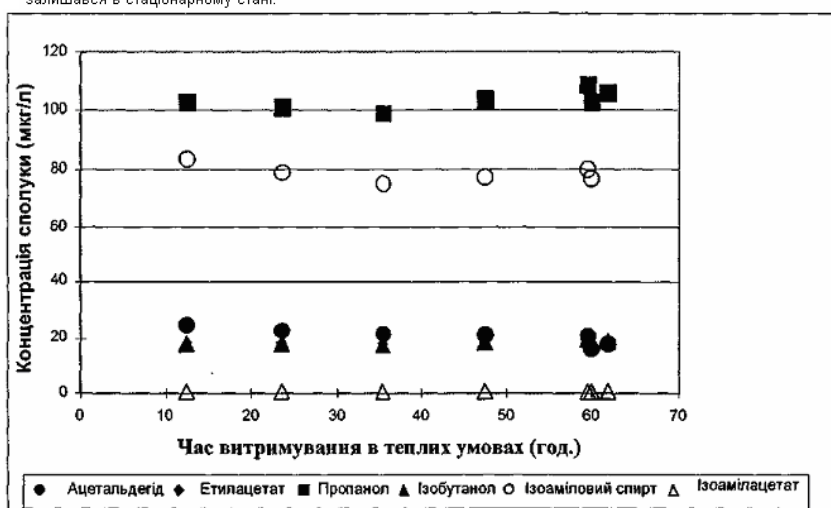
Вплив такого витримання партій у теплих умовах після безперервного основного бродіння на концентрації складних ефірів і спиртів сивушних масел і на концентрацію етанолу і питому вагу рідини проілюстровано на Фіг.6.76 і 6.77 відповідно. Ці результати свідчать про те, що період витримання в теплих умовах впливав на концентрації ацетальдегіду, етилацетату, пропанолу, ізобутанолу, ізоамілового спирту й ізоамілацетату (Фіг.6.76). Питома вага рідини в резервуарах для витримання знижувалася від 2,7°P до 2,0°P у перші 12 годин періоду витримання і потім залишалася на цьому більш низькому рівні. Концентрація етанолу зберігалася на постійному рівні 70мг/л протягом періоду тестування, що продовжувався 65 годин. Ці результати свідчать про те, що період витримання в основному впливав на концентрацію діацетилю і 2,3-пентандіону, у той час як вплив на вміст складних ефірів, спиртів сивушних масел і етанолу був мінімальним.



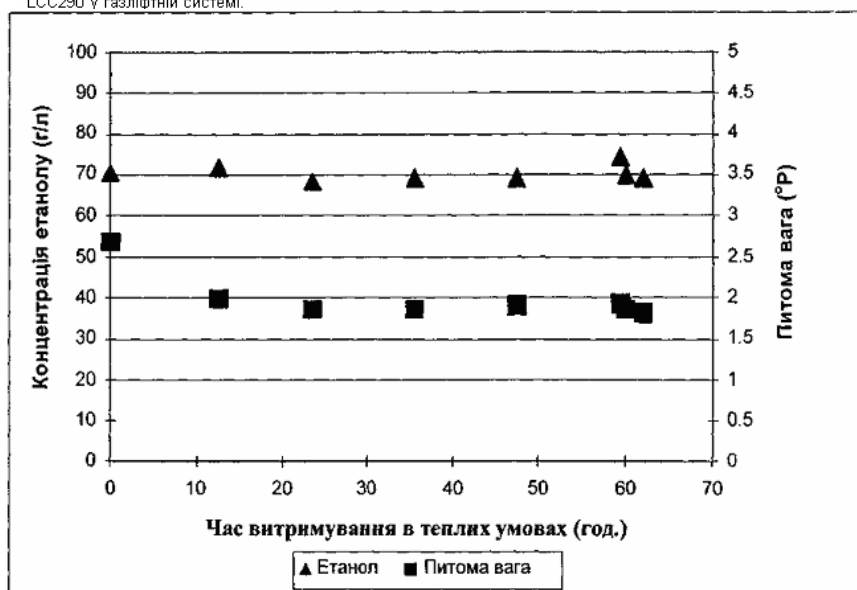
Фіг. 6.74 Залежність концентрації близьких за будовою дикетонів від періоду витримання партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290 у газліфній системі.



Фіг. 6.75 Залежність концентрації діацетиу від періоду витримування партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290 у газліфтній системі. Один зразок перемішували шляхом розпилення газоподібного діоксиду вуглецю, у той час як інший зразок залишався в стаціонарному стані.



Фіг. 6.76 Залежність концентрацій складних ефірів і спиртів сивушних масел від періоду витримування партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290 у газліфтній системі.



Фіг. 6.77 Залежність концентрації етанолу і питомої ваги від періоду витримування партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290 у газліфтній системі.

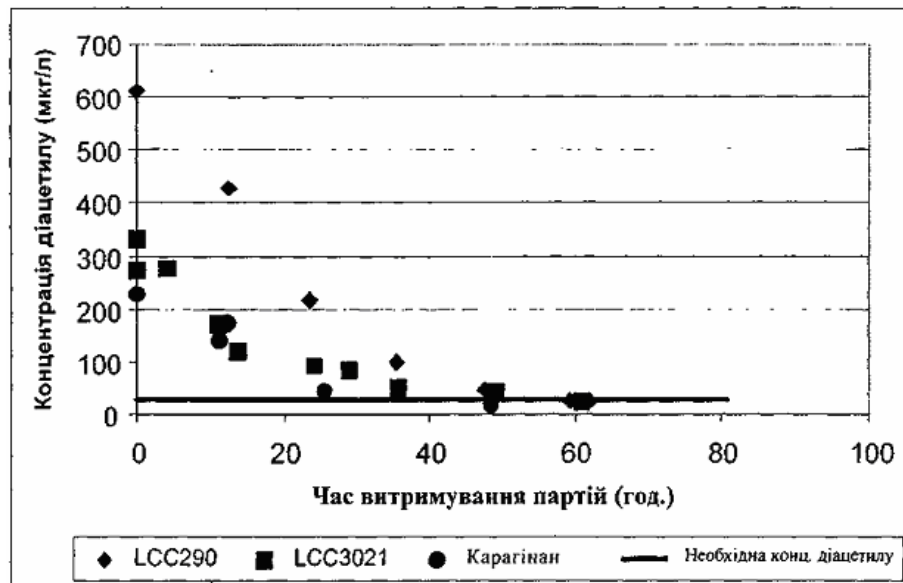
Протокол витримування партій здійснювали з використанням рідин, одержаних після безперервного процесу бродіння в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з використанням суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290, помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021, або дріжджів, іммобілізованих за допомогою κ-карагінану. Профілі зменшення концентрації діацетику для цих трьох варіантів представлені на Фіг.6.78. Вміст діацетику у всіх трьох варіантах послідовно знижувався до його необхідного значення 30мкг/л. Однак час, необхідний для досягнення такого зниження, у всіх трьох варіантах був різним. При використанні штаму дріжджів LCC290 зниження концентрації від 600 до 30мкг/л відбувалося протягом приблизно 48 годин, у той час як при бродінні з використанням штаму дріжджів LCC3021 і при бродінні з використанням як матриці κ-карагінану було потрібно тільки ~24 і ~40 годин для досягнення цього необхідного значення. Було висловлено припущення, що це розходження обумовлене величиною початкової концентрації діацетику, а не пов'язане з типом іммобілізуючої матриці.

На Фіг.6.79 представлено ті ж дані про концентрацію діацетику, що і на Фіг.6.78 з урахуванням поправки на час, введеної в результати, одержані для бродіння з використанням штаму LCC3021 і κ-карагінану. Початкові залежності зменшення вмісту діацетику для двох останніх варіантів бродіння зміщували таким чином, щоб початкові концентрації для цих варіантів попадали на криву, отриману при застосуванні суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290. Очевидно, що при застосуванні такого перетворення профілі зниження вмісту діацетику для всіх трьох систем попадали на ту саму криву. З використанням програмного забезпечення TableCurve2D ці результати апроксимували кривою з використанням кінетичного рівняння першого порядку [Levenspiel, 1972] (Фіг.6.80). Було встановлено, що скореговані експериментальні дані, представлені на Фіг.6.79, апроксимуються наступним рівнянням:

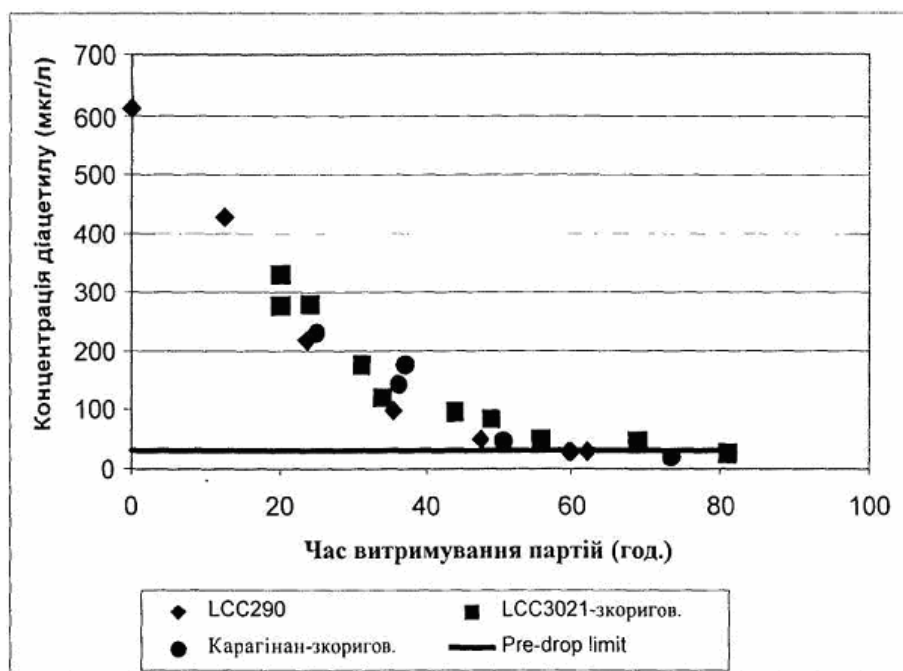
$$[\text{концентрація діацетику}] = 648,54 e^{(-0,0426t)} \quad (6.1)$$

з коефіцієнтом кореляції 0,96. Цей результат служить переконливим підтвердженням теорії про те, що всі три системи іммобілізації мають однаковий потенціал по відношенню до зниження вмісту діацетику. Ці результати не були несподіваними, оскільки зниження вмісту діацетику часто пов'язано з конкретним штамом дріжджів [Nakatani та ін., 1984]. При використанні системи на основі κ-карагінану в його гелевій структурі іммобілізували штам дріжджів LCC3021, а штам дріжджів LCC290 являв собою вибраний варіант штаму LCC3021.

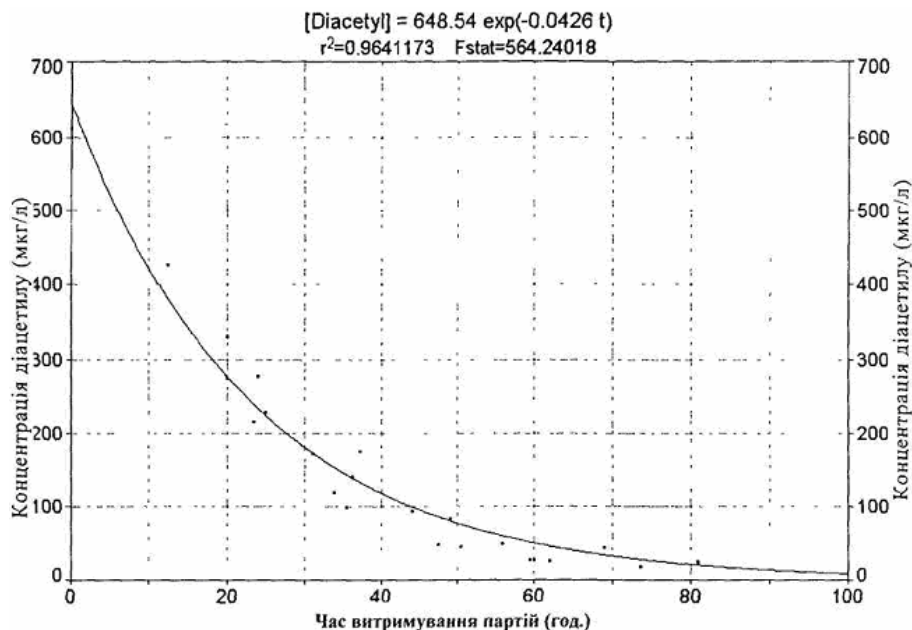
Після того, як рівень діацетику ставав нижче необхідного рівня 30мкг/л, одержане пиво піддавали дозріванню шляхом охолодження (2°C) протягом 7 днів перед приготуванням кінцевого продукту (фільтрація, розведення, карбонізація й улаковування). У таблиці 6.3 узагальнено результати аналізу зразків пива, одержаних у пілотних системах об'ємом 50л з використанням як іммобілізуючих матриць штаму дріжджів LCC290, штаму дріжджів LCC3021 або дріжджів, іммобілізованих за допомогою κ-карагінану. На Фіг.6.81 представлено кругову діаграму вмісту складних ефірів і спиртів сивушних масел у трьох зразках пива, одержаних за допомогою безперервного процесу і в одному контрольному зразку пива, виробленому в промисловому масштабі за допомогою періодичного процесу. У порівнянні з рідким продуктом, який виробляється в промисловому масштабі (контроль), рідкі продукти, одержані за допомогою безперервного процесу, мали більш низький вміст складних ефірів (етилацетату, ізоамілацетату), більш високий вміст пропанолу і більш низький вміст ізобутанолу, первинного амілового спирту й ізоамілового спирту. Рівні ацетальдегіду в продуктах, одержаних за допомогою безперервного процесу бродіння, були вище, ніж у контрольному рідкому продукті. Рівень піноутворення, початкове холодне помутніння, помутніння в теплих умовах, вміст диметилсульфіду, діоксиду сірки, діоксиду вуглецю і повітря знаходилися в межах встановлених норм.



Фіг. 6.78 Залежність концентрації діацети́лу від періоду витримування партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290, штаму дріжджів LCC3021 і дріжджів, іммобілізованих за допомогою карагінанового гелю, у газліфтній системі.



Фіг. 6.79 Залежність концентрації діацети́лу від періоду витримування партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290, штаму дріжджів LCC3021 і дріжджів, іммобілізованих за допомогою карагінанового гелю, у газліфтній системі. Дані для варіанта бродіння з використанням штаму дріжджів LCC3021 і дріжджів, іммобілізованих за допомогою карагінанового гелю, скоректовані шляхом введення поправки на час для досягнення такого ж вихідного стану, що і для варіанта бродіння з використанням штаму LCC290.



Фіг. 6.80 Залежність концентрації діацетилу від періоду витримання партій у теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння з використанням штаму дріжджів LCC290, штаму дріжджів LCC3021 і дріжджів, іммобілізованих за допомогою карагінанового гелю, у газліфтній системі. Дані для варіанта бродіння з використанням штаму дріжджів LCC3021 і дріжджів, іммобілізованих за допомогою карагінанового гелю, скореговані шляхом введення поправки на час для досягнення такого ж вихідного стану, що і для варіанта бродіння з використанням штаму LCC290.

Деякі інші параметри (видимий вміст екстрактивних речовин, дійсний вміст екстрактивних речовин, розрахований вихідний вміст екстрактивних речовин, колір, ступінь гіркоти), істотний вплив на які робить розведення продукту, необхідне для доведення концентрації етанолу від її початкового значення до кінцевого значення, рівного 5,0 об.%, відрізнялися від контролю, оскільки для продуктів, одержаних за допомогою безперервного процесу, було потрібно більше розведення водою для досягнення необхідного вмісту етанолу внаслідок більш високих вихідних концентрацій етанолу (70 г/л у порівнянні з 60 г/л при періодичному процесі). На Фіг.6.82 представ-

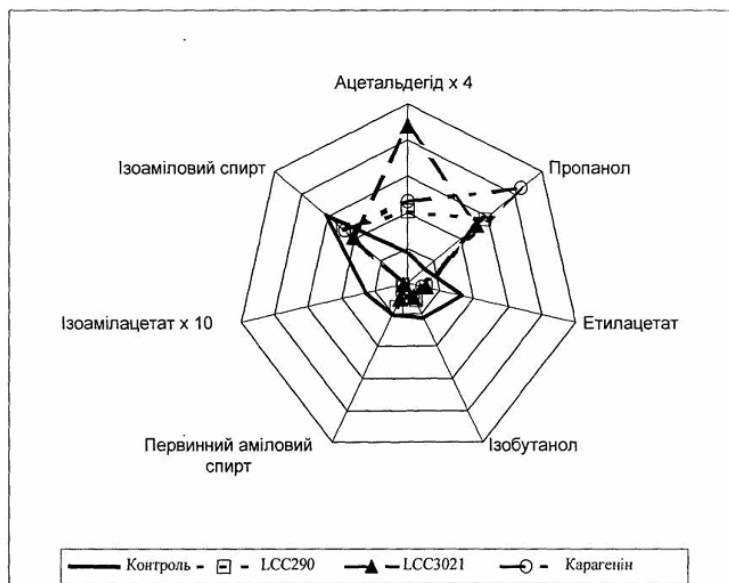
лено кругову діаграму вмісту спирту, діацетилу, значень рН, кольори і ступені гіркоти для тих же рідких продуктів, які були описані вище. Рівень спирту, діацетилу і значення рН були в межах норми, у той час як колір і ступінь гіркоти виходили за зазначені межі. Більш блідий колір обумовлений великим розведенням, якому піддавали рідкий продукт, одержаний за допомогою безперервного процесу, і його можна регулювати шляхом посилення забарвлення живильних речовин, які присутні у суслі. Ступінь гіркоти також залежить від зазначеного процесу розведення і його можна також регулювати за допомогою підживлення суслу.

Таблиця 6.3

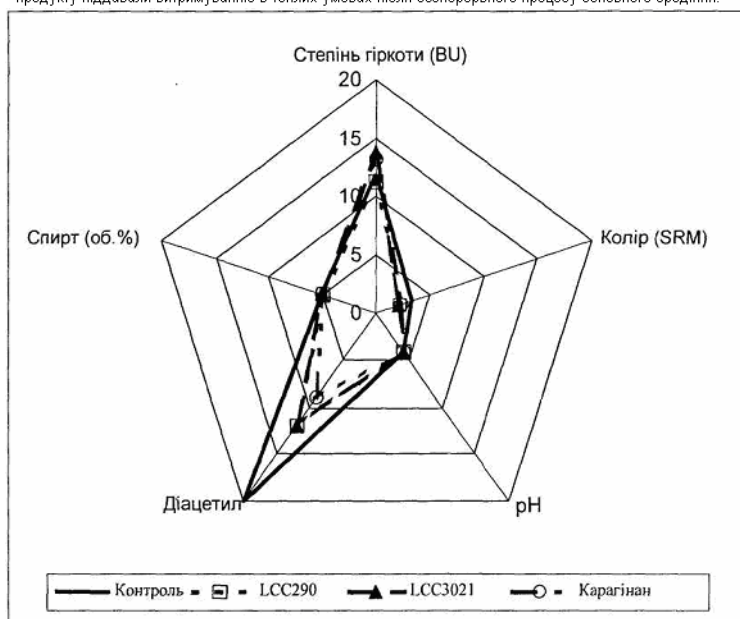
Узагальнення результатів аналізу партій пива, одержаних з використанням газліфтної системи

Компоненти	Рідкий продукт, одержаний за допомогою промислового процесу періодичного бродіння	Рідкий продукт, одержаний шляхом безперервного бродіння з використанням штаму LCC290	Рідкий продукт, одержаний шляхом безперервного бродіння з використанням штаму LCC3021	Рідкий продукт, одержаний шляхом безперервного бродіння з використанням карагінану
Повітря (мл)	<1	0,40	0,35	0,35
Діоксид вуглецю (%)	2,75	2,90	2,81	2,73
Діоксид сірки (мг/л)	<10	0	0	0
Диметилсульфід (мкг/л)	<70	59	30	30
Ступінь гіркоти (BU)	12,00	11,30	13,74	13,18
Колір (SRM)	3,20	2,20	2,10	2,30
pH	4,10	4,15	4,10	4,09
Діацетил (мкг/л)	<20	12	12	9
Спирт (об.%)	5,00	4,99	5,03	5,04
Спирт (мас.%)	3,93	3,93	3,96	3,96
Видимий вміст екстрактивних речовин (°P)	1,55	1,02	1,40	1,44
Дійсний вміст екстрактивних речовин (°P)	3,36	2,84	3,24	3,27

Розрахований початковий вміст екстрактних речовин (°P)	11,0	10,5	11,0	11,0
Помутніння в теплих умовах (FTU)	<200	45	50	47
Початкове холодне помутніння (FTU)	<100	43	51	54
Піна (с)	>170	167	187	175
Ацетальдегід (мг/л)	4,4±1,3	10,0	21,9	11,6
Пропанол (мг/л)	12,8±6,8	57,6	51,7	84,3
Етилацетат (мг/л)	32,4±4,3	11,0	10,6	8,7
Ізобутанол (мг/л)	21,6±3,4	10,6	8,3	8,9
Первинний аміловий спирт (мг/л)	20,0±2,3	15,2	9,4	6,4
Ізоаміловий спирт (мг/л)	60,9±8,6	48,0	40,9	46,5
Ізоамілацетат (мг/л)	2,5±0,7	0,32	0,25	0,18



Фіг. 6.81 Кругова діаграма компонентів зразків пива, одержаних за допомогою безперервного процесу в газліфтній системі з використанням штаму дріжджів LCC290, штаму дріжджів LCC3021 або штаму дріжджів LCC3021, іммобілізованих за допомогою гранул з карагінанового гелю. На цьому графіку представлені вмісти складних ефірів і спиртів сивушних масел у готових зразках пива. Всі партії продукту піддавали витримуванию в теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння.



Фіг. 6.82 Кругова діаграма характеристик зразків пива, одержаних за допомогою безперервного процесу в газліфтній системі з використанням штаму дріжджів LCC290, штаму дріжджів LCC3021 або штаму дріжджів LCC3021, іммобілізованих за допомогою гранул з карагінанового гелю. На цьому графіку представлені вмісти складних ефірів і спиртів сивушних масел у зразках готового пива. Всі партії продукту піддавали витримуванию в теплих умовах після безперервного процесу основного бродіння.

6.6.2 Вибір найкращого газу, який розпилюють

Діоксид вуглецю є легко доступним для більшості пивоварних заводів, оскільки він являє собою природний побічний продукт дріжджового бродіння. На пивоварних заводах збирають CO₂, що виділився, і потім промивають газ для вилучення невеликих домішок, що можуть бути перенесені в загальний потік (як правило, сірчистих сполук). Потім цей очищений потік стискають і зберігають у вигляді рідини для наступного використання на пивоварному заводі (з чистотою 99,95%). Застосування діоксиду вуглецю як газу, який розпилюють, у безперервному процесі бродіння є логічним з погляду виробництва. На заводі можна використовувати власну систему збору і повторно використовувати CO₂, що виділяється у ферментері безперервної дії. Застосування інших газів може тільки ускладнювати існуючі на заводі технологічні процеси.

Однак, для того, щоб процес безперервного бродіння став реальною альтернативою існуючій технології періодичного бродіння, необхідно, щоб він дозволяв робити продукт, що максимально відповідає по якості відомим маркам пива, які виробляють у даний час. Можна припускати, що шляхом мінімізації біологічних/біохімічних впливів, яким дріжджі піддаються при безперервному процесі бродіння, може виявитися можливим досягати такої відповідності продуктів. Відомо, що діоксид вуглецю впливає на метаболізм дріжджів у процесі основного бродіння. Цей вплив підсилюється у високих циліндроконічних резервуарах, де властивий такій системі тиск над поверхнею рідини перешкоджає вільному вивільненню CO₂ з рідкого середовища. Ці обставини приводять до виробництва сортів пива із зниженим вмістом складних ефірів і підвищеним вмістом спиртів сивушних масел. Були початі успішні спроби видалити частину цього CO₂ із суміші, що зброджується, шляхом періодичної ін'єкції потоку допоміжного газу в нижню частину циліндроконічного резервуару. У результаті цього інгібуючий вплив CO₂, очевидно, зменшувався, що приводило до одержання продуктів з більш низьким вмістом спиртів і більш високим вмістом складних ефірів.

На основі цих даних була вивчена можливість застосування в газліфтній системі як газ, що розпилюють, газоподібного азоту замість діокси-

ду вуглецю. Були відібрані кілька зразків рідини, яку піддавали бродінню в газліфтних реакторах об'ємом 50л, і вони були піддані наступним стадіям обробки на експериментальному пивоварному заводі фірми Labatt (Labatt Experimental Brewery). Через 14 годин рідину, відібрану з реактора (час перебування в реакторі 24 години), так зване "зелене пиво", відокремлювали шляхом декантації від дріжджів, які знаходяться в реакторі. Потім цю рідину витримували протягом 48 годин при кімнатній температурі (21°C), що дозволяло знизити вміст як діацетила, так і ацетальдегіду, до рівня, що задовольняє специфікації фірми Labatt (вміст діацетила <30мкг/л і вміст ацетальдегіду <10мг/л). Потім цю рідину піддавали дозріванню шляхом охолодження протягом 7 днів і після цього обробляли за допомогою стандартних промислових методів.

У таблиці 6.4 наведено порівняння характеристик зразків готового пива, одержаного шляхом безперервного бродіння, з використанням штаму дріжджів LCC290 у системах, у яких застосовували розпилення CO₂ і N₂, з характеристиками стандартного виробленого в промисловому масштабі пива (контроль). Рідина, отримана з використанням розпилення азоту мала більш кращі характеристики у порівнянні з рідиною, виробленою в промисловому масштабі. На основі проведених аналізів

встановлено, що в рідині, яку тестують, вміст 1-пропанолу був більш ніж у два рази вище, у той час як концентрація диметилсульфіду була приблизно в три рази нижче. Одержані оцінки кольору і ступеня гіркоти були вище, ніж для виробленої в промисловому масштабі рідини, такі ж результати були одержані при оцінці піноутворення, що проводили відповідно до NIBEM-тесту. Пиво, отримане з використанням розпилення CO₂, мало більш низький вміст складних ефірів (етилацетату, ізоамілацетату) і більш високий вміст 1-пропанолу, ніж рідина, одержана з використанням розпилення азоту. Були розраховані відношення вмісту складних ефірів (етилацетату, ізоамілацетату, етилгексаноата, етилоктаноата, етилдеканата) до вмісту спирту сивушних масел (1-пропанолу, ізобутанолу, ізоамілового спирту) для контрольної рідини, рідини, одержаної з використанням розпилення азоту і рідини, одержаної шляхом розпилення CO₂, і було встановлено, що вони становили 0,30, 0,27, 0,15 відповідно.

Таблиця 6.4

Узагальнення результатів хімічних аналізів для декількох продуктів, одержаних шляхом безперервного бродіння за допомогою газліфтної системи, завантаженої суперфлюкцентним штамом дріжджів LCC290

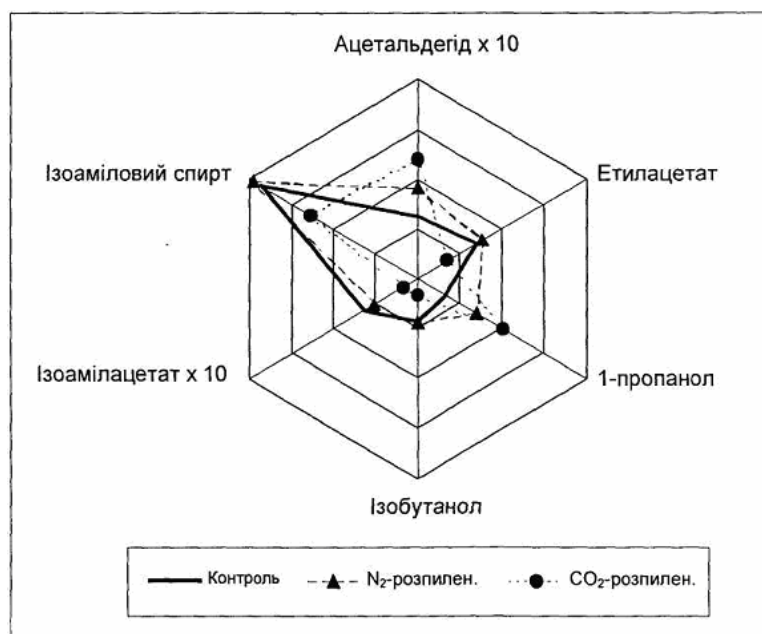
Аналізована характеристика	Рідина, отримана в промисловому масштабі за допомогою періодичного процесу бродіння	Рідина, отримана за допомогою безперервного процесу бродіння з використанням розпилення азоту	Рідина, отримана за допомогою безперервного процесу бродіння з використанням розпилення CO ₂
Ацетальдегід (мг/л)	2,53	3,68	4,80
Етилацетат (мг/л)	28,08	30,90	14,14
1-пропанол (мг/л)	13,03	28,45	40,03
Ізобутанол (мг/л)	17,15	17,89	7,01
Ізоамілацетат (мг/л)	2,57	2,06	0,69

Ізоаміловий спирт (мг/л)	74,54	78,45	51,35
Етилгексаноат (мг/л)	0,140	0,180	0,074
Етилоктаноат (мг/л)	0,110	0,280	0,059
Етилдеканат (мг/л)	0,0079	0,0630	0,0081
Діацетил (мкг/л)	6	9	10
2,3-пентандіон (мкг/л)	4	5	14
Діоксид сірки (мг/л)	1,3	1	0
Диметилсульфід (мкг/л)	79	24	64
Ступінь гіркоти (BU)	11,5	20,6	15,5
Колір (SRM)	31	4,1	3,7
Піноутворення (с)	176	210	195
FAN (мг/л)		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
Спирт (об.%)	4,93	5,74	5,17

На Фіг.6.83 представлено кругову діаграму, що характеризує вміст складних ефірів, спиртів сивушних масел і ацетальдегіду для трьох рідин. Профіль для рідини, одержаної з використанням розпилення азоту, дуже близький до профілю для контрольного пива за винятком того, що для нього характерно більш високий вміст пропанолу. Для зразка, одержаного шляхом бродіння з використанням розпилення CO₂, виявлений набагато більш низький вміст складних ефірів і спирту сивушних масел, що не відповідає контролю. У рідинах, одержаних при обох варіантах безперервного бродіння рівні діацетилю й ацетальдегіду були нижче рівнів, зазначених у специфікації фірми Labatt.

Ці результати дозволяють припустити, що розпилення азоту приводить до підвищення виробництва складних ефірів до рівня, характерного для сортів пива, що надходять до продажу, у той час як розпилення діоксиду вуглецю приво-

дить до одержання рідин, що мають порівняно низькі концентрації складних ефірів. Ці результати дозволяють припустити, що в умовах розпилення CO₂ змінюється метаболізм дріжджів. Незалежно від газу, який розпилюють, рівні пропанолу в пиві, отриманому за допомогою безперервного процесу бродіння, були набагато вищі, ніж рівні, характерні для контрольних зразків пива, що випускається в промисловому масштабі. Хоча концентрації пропанолу були набагато нижчі границі смакового відчуття, що становить 100мг/л, зазначені розходження можуть свідчити про злека змінений метаболізм при безперервному процесі бродіння в порівнянні з періодичним процесом бродіння. Можливо також, що більш високий рівень пропанолу обумовлений безперервним виробництвом амінокислоти треоніна, з якої в результаті розщеплення оксокислот утворюється пропанол.



Фіг. 6.83 Кругова діаграма, на якій наведено порівняння вмісту складних ефірів і спиртів сивушних масел у рідинах, одержаних за допомогою безперервного процесу бродіння в газліфтній системі з використанням розпилення азоту і розпилення CO₂ і в рідині, виробленій в промисловому масштабі.

Глава 7.0 Висновки

На основі результатів досліджень, проведених при створенні даної дисертації, можна зробити наступні висновки. У пілотному газліфтному біореакторі об'ємом 50л з трубою для відсмоктування при використанні його як ферментер для безперервного основного бродиння з наступним витримуванням партії протягом 2 днів для контролю вмісту діацетила можна робити пиво прийнятної якості, що не має основних смакових дефектів. Для бродиння суслу, що має високу питому вагу, (17,5°P) з одержанням кінцевого збродженого бульйону (2,5°P) необхідно забезпечувати мінімальний час перебування в реакторі 24 години або заміну 1 об'єму реактора в день. При використанні газліфтної системи як носії можна використовувати суперфлокулентний штам дріжджів LCC290, помірно флокулентний штам дріжджів LCC3021 і іммобілізовані за допомогою к-карагінану дріжджі. Для газліфтної системи з трубою для відсмоктування застосування більш важких попередньо сформованих носіїв типу скляних гранул Siran® і гранул з діатомової землі Celite® не може служити реальною альтернативою зазначеним носіям. Можна забезпечувати як мінімум 2-місячну безперервну роботу при використанні гранул з к-карагінанового гелю і як мінімум 3-місячну безперервну роботу у випадку бродиння з використанням штамів LCC290 і LCC3021 без випадків яких-небудь забруднень мікроорганізмами або виникнення нестабільностей у роботі реактора. Крім того, при використанні безперервної системи протягом тривалих періодів роботи можна було здійснювати можливі і передбачувані зміни застосовуваного в промисловому масштабі суслу, яке постачають.

При безперервному бродинні із застосуванням суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290 і азоту як газ, який розпилюють, з наступним витримуванням партії протягом 2 днів одержували продукт, смак якого найбільшою мірою відповідав смакові контролюваного пива, що випускається в промисловому масштабі. Витримування протягом 2 днів, призначене для зниження високих концентрацій діацетила в рідині, що виходить з ферментера, у якому здійснювали безперервне головне бродиння, виявилось ефективним, хоча і не оптимальним механізмом контролю. Здатності зменшувати вміст діацетила у всіх трьох систем, які тестували безперервного бродиння були дуже близькими і, як це й очікувалося раніше, ця властивість могла бути обумовлена типом штаму. Тривалість витримування партій не впливала на вміст складних ефірів і спиртів сивушних масел у пиві в процесі витримування.

Використання 3% кисню в газі, який розпилюють, забезпечувало адекватні рівні підживлення суслу киснем, приводячи до збереження життєздатної популяції дріжджів (понад 90%) протягом процесу бродиння, при цьому вироблені зразки пива мали прийнятні смакові характеристики. При безперервному бродинні з використанням штаму дріжджів LCC290 і штаму дріжджів LCC3021 як іммобілізуючих матриць псевдостатичний стан досягався швидше, ніж при використанні системи на основі гранул з к-карагінанового

гелю. Нестабільність процесу бродиння на основі іммобілізації на к-карагінані, що може бути обумовлена збільшенням популяції іммобілізованих дріжджів, приводила до бродиння продукту нижче необхідного рівня. Для ідеального безперервного процесу виробництва ця особливість є вкрай небажаною, оскільки тривалий початковий період приводить до збільшення часу, необхідного для того, щоб відреагувати і здійснити повторний запуск після катастрофічного збою. При наявності більш тривалої початкової фази для того, щоб процес мав переваги, необхідно також, щоб фаза безперервного процесу була більш тривалою.

При тестуванні на пілотних установках безперервний процес виготовлення селективних гранул дозволяв одержувати необхідну кількість гранул. Однак необхідна подальша оптимізація процесу виготовлення гранул для забезпечення виготовлення гранул з більш вузьким діапазоном розподілу розмірів. Необхідно також оцінити процес з погляду його придатності для промислового виробництва. Для того, щоб розглянутий процес можна було реалізувати для цієї цілі, необхідно крім змішувача типу Kenics, що застосовували в даному дослідженні, знайти і вивчити новий тип змішувача, за допомогою якого збільшення масштабу виробництва можна досягати шляхом збільшення діаметра, а не тільки кількості статичних змішувачів.

Метод відстеження на основі імпульсного введення кислоти, застосований у даній дисертації, дозволив оцінювати час змішування і швидкість циркуляції в пілотному біореакторі об'ємом 50л у процесі реального бродиння з використанням суперфлокулентного штаму дріжджів LCC290, помірно флокулентного штаму дріжджів LCC3021 і дріжджів, іммобілізованих на к-карагінані. Дані, одержані при вивченні змішування, апроксимували за допомогою розкладання по синусоїдах і на основі цього розраховували час змішування і швидкість циркуляції.

Газліфтна система з трубою для відсмоктування забезпечувала швидке змішування, що характеризується розрахованими часами змішування менше 200с для всіх трьох типів іммобілізуючих носіїв. Для всіх трьох вивчених варіантів час змішування злепка зменшувався при збільшенні зведеної швидкості газу. При усіх вивчених приведених швидкостях газу (від 2 до 6мм/с) система на основі штаму дріжджів LCC290 мала найменші часи змішування (від 100 до 120с). Часи циркуляції рідини для всіх трьох типів носія були дуже близькими незалежно від зведеної швидкості газу. Вони зменшувалися також по лінійному закону при відповідному збільшенні швидкості газу. Повне змішування рідини (98%-а реакція на імпульс) для всіх тестованих іммобілізуючих носіїв відбувалося протягом 3-6 циклів циркуляції в реакторі. Ці результати підтверджують, що вивчена пілотна система об'ємом 50л забезпечувала адекватне змішування при безперервному процесі бродиння. Занадто короткі часи змішування свідчили б про можливу наявність мертвих зон, що є небажаним для бродиння пива.

Результати досліджень, проведених при створенні даної докторської дисертації, перекон-

ливо свідчать про можливості продовження робіт з конструювання, виготовлення і запуску в дію більш великомасштабних систем на експериментальному пивоварному заводі фірми Labatt (Labatt Experimental Brewery). Як перспективну систему рекомендовано використовувати газліфтний біореактор із трубою для відсмоктування з застосуванням суперфлокulentного штаму дріжджів LCC290 і азоту як газ, який розпилюють, з наступним витриманням партії протягом 2 днів при 21°C.

Частина 2:

Розділ 4. Матеріали і методи

4.1 Штам дріжджів і його характеристики

У даному дослідженні використовували лагерний штам пивних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з колекції культур фірми Labatt (LCC), реєстраційний номер 3021. *Saccharomyces cerevisiae* є синонімом *Saccharomyces uvarum* Beijerinck var. *carlsbergensis* Kudryavtsev, 1960 (Kurtzman, 1998). Штам LCC 3021 не росте при 37°C. Це дозволяє відрізнити лагерний штам дріжджів LCC 3021 від більшості видів дріжджів для виробництва елю, що ростуть при 37°C і більш високих температурах. Штам дріжджів LCC 3021, як і більшість лагерних дріжджів, являє собою штам дріжджів низового бродіння, однак, він має характерні відмінності. Цей штам може зброджувати глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, рафінозу і мелібіозу, але не крохмалі. Здатність зброджувати мелібіозу є характерною ознакою, за якою систематики відрізняють його від дріжджів для виробництва елю.

Як і більшість штамів пивних дріжджів, LCC 3021 є поліплоїдним і розмножується шляхом мітотичного ділення. У нормальних умовах при виробництві пива лагерні дріжджі не розмножуються шляхом мейозу. Це є кращим з погляду одержання генетично стійкого штаму пивних дріжджів, оскільки кроссінговер генетичного матеріалу є менш ймовірним (Kreger-vanRij, 1984).

4.2 Одержання інокуляту дріжджів

Дріжджі брали з пробірки, що зберігалася в криогенних умовах у рефрижераторі при -80°C і робили посів штрихом на пептонне агарове живильне середовище, що містить дріжджовий екстракт (Peptone Yeast-Extract Nutrient) (PYN) (пептон, 3,5г/л; дріжджовий екстракт, 3,0г/л; KH_2PO_4 , 2,0г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0г/л; глюкоза, 20,0г/л; агар, 20,0г/л у dH_2O), для одержання колоній, які добре розділилися. За допомогою стерильної петлі відбирали кілька колоній із дріжджів, вирощених протягом 3-4 днів на планшетах, і цими колоніями інокулювали 10мл сусла, що знаходиться в лабораторній пробірці. Дріжджі вирощували протягом ночі при 21°C, цю культуру позначали як "культура, вирощена протягом ночі", і потім її додавали до більшого об'єму сусла, як правило, який становить 200мл, для збільшення біомаси дріжджів. У наступні дні цю суміш додавали до іншого ще більшого об'єму сусла і т.д. доти, поки не одержували необхідну кількість біомаси дріжджів. Як правило, було потрібно одержувати приблизно 20г лагерних дріжджів на літр сусла. Для підготовки дріжджів для інокуляції культуру піддавали центрифугуванню при 4°C і

$1,0 \times 10^4$ об./хв (радіус=0,06м) протягом 10хв Після центрифугування рідину зливали і з пеллетів одержували відповідну вологу масу дріжджів для засівання сусла.

4.3 Середовище для бродіння сусла

Фірма Labatt Breweries of Canada поставляла пивне сусло з питомою вагою 17,5°P. Концентрація вуглеводів, які зброджують, питома вага і вміст вільного азоту аміногруп у пивному суслі, що використовували для бродіння при проведенні даного дослідження, приведені в додатку А 2.1. Додаткові подробиці, що стосуються складу сусла, наведені в [Dale та ін., 1986, Hoekstra, 1975, Hough та ін., 1982, Kiopfer, 1974 і Taylor, 1989].

Періодичний процес бродіння:

Сусло витримували в автоклаві протягом 45хв при 100°C і потім охолоджували перед здійсненням інокуляції гранулами з іммобілізованими клітинами або вільно суспендованими дріжджами.

Безперервний процес бродіння:

Сусло, що застосовували в процесі безперервного бродіння, піддавали миттєвій пастеризації (пристрій типу Fisher Plate Heat Exchanger, combi-flow Type Eurocal 5FH) перед введенням у газліфтний біореактор і регулярно здійснювали моніторинг цього сусла з погляду забруднення мікроорганізмами як це описано в розділі 4.6. Якщо в суслі виявляли забруднення, то його негайно видаляли і вводили нове сусло, отримане з пивоварного заводу.

Пастеризатор миттєвої дії функціонував при об'ємній витраті $0,8 \text{ м}^3/\text{год}$. Установка мала циліндричну секцію для зберігання, у якій сусло витримували при середній температурі 85°C, причому мінімальна температура становила 80°C. Об'єм секції для витримання становив $1,13 \times 10^{-2} \text{ м}^3$, що забезпечувало час перебування в секції для витримання 51с. Після здійснення стадії нагрівання сусло, випущене з установки, швидко охолоджували до температури 2°C.

4.4 Метод іммобілізації

Каппа-карагінановий гель X-0909 був люб'язно наданий фірмою Copenhagen Pectin A/S. Гранули з каппа-карагінанового гелю, що містять захоплені клітини лагерних дріжджів, одержували за допомогою процесу з використанням статичного змішувача, що докладно описаний у [Neufeld і ін. (1996)], при вихідному завантаженні клітин 10^7 - 10^8 клітин/мл гелю, конкретну величину якої встановлювали для кожного експерименту. Як проілюстровано на Фіг.15, процес з використанням статичного змішувача оснований на одержанні емульсії, що складається з неводної безперервної фази, яка являє собою рослинну олію (кукурудзяну олію Mazola), і водної диспергованої фази, що являє собою розчин каппа-карагінану (3%мас./об.) у KCl (0,2%мас./об.), інокульований дріжджами, за допомогою послідовно підключених статичних змішувачів з поліацеталю (фірма Cole-Palmer Instrument Co., США). У секції, що підігривається, при використанні схеми, коли дріжджі швидко змішували з розчином карагінану з утворенням емульсії, підтримували температуру 37°C. Гелеутворення крапельок каппа-карагінану в емульсії індукували шляхом швидкого охоло-

дження за допомогою крижаної бані і наступного отвердіння в бані, що містить хлорид калію (22г/л). Для одержання суміші дріжджів і карагінану використовували статичний змішувач, що має 24 елемента, діаметром 6,4мм. Для одержання емульсії застосовували другий змішувач діаметром 12,7мм, що має 42 елемента. Гранули, що застосовувалися в експериментах при проведенні даного дослідження, мали розмір у діапазоні 0,5-2,0мм.

4.5 Кумулятивне розподілення розмірів гранул з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані клітини дріжджів

З виготовленої партії гелевих гранул, загальний об'єм якої становив 30л, випадковим образом відбирали зразки гранул з каппа-карагінанового гелю для розрахунку розподілення розмірів часток на основі величини маси у вологому стані. Маса кожного зразка у вологому стані становила приблизно 500г. Розподіл розмірів гранул визначали шляхом просівання. Гранули пропускали через сита з розміром отворів 2,0, 1,7, 1,4, 1,18, 1,0 і 0,5мм. Для полегшення просівання кожного зразка гранул використовували 4,5л розчину KCl з концентрацією 22г/л. Передбачалося, що гранули з каппа-карагінанового гелю мали ідеально сферичну форму, тому діаметр отворів сита приймали як діаметр часток. Передбачалося також, що щільність часток була постійною і не залежала від розміру часток.

4.6 Підрахунок кількості клітин дріжджів і оцінка життєздатності Життєздатність вільно суспендованих клітин дріжджів і концентрація клітин:

Для оцінки життєздатності клітин дріжджів використовували прийнятий American Society of Brewing Chemists International метод забарвлення метиленовим синім (Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1992). Забарвлення дозволяє визначати, чи є популяція дріжджів життєздатною або нежиттєздатною, на основі здатності живих клітин окисляти барвник, у результаті чого утвориться його знебарвлена форма. Нежиттєздатні клітини не можуть окисляти барвник і тому забарвлення залишається синім. Барвник метиленовий синій, забуферений розчином Фінкі-Лантуха (Fink-Kuhles), одержували шляхом змішування 500мл розчину А (0,1г метиленового синього/500мл dH_2O) з 500мл розчину Б (498,65мл 13,6г KH_2PO_4 /500мл dH_2O , змішаного з 1,25мл 2,5г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /100мл dH_2O), з одержанням кінцевого забуференого розчину метиленового синього з рН 4,6.

Розведений розчин дріжджів змішували в лабораторній пробірці з розчином метиленового синього, одержуючи суспензію, при аналізі якої в полі зору мікроскопа знаходилося приблизно 100 клітин дріжджів. Невелику краплю добре перемішаної суспензії поміщали на предметне скло мікроскопа і накривали покривним склом. Після контактування протягом 1-5хв підраховували кількість клітин, забарвлених у синій колір і кількість клітин, що залишилися безбарвними. Відсоток життєздатних клітин виражали у вигляді відсотка від загальної кількості підрахованих клітин. Концентрацію клітин визначали за допомогою

світлового мікроскопа і гемацитометра типу Hemacytometer (фірма Hauser Scientific Company).

Життєздатність іммобілізованих клітин і концентрація клітин:

Гелеві гранули відокремлювали від рідини, яку зброджують, шляхом пропускання суміші через стерильне сито (розмір пор 500мкм) і промивання 10мл дистильованої води. 1мл гелевих гранул, що містять захоплені клітини дріжджів, вносили в стерильний контейнер для зразків об'ємом 50мл, що містить 19мл дистильованої води. Потім гранули руйнували за допомогою пристрою типу Polytron® (фірма Brinkmann Instruments) для вивільнення клітин з гелю. Після цього життєздатність і концентрацію клітин оцінювали відповідно до методу, описаному для вільно суспендованих клітин.

4.7 Мікробіологічний аналіз

Аналіз рідкої фази: При безперервному бродінні зразки для мікробіологічного аналізу відбирали щонайменше один раз у тиждень. Сусло, що застосовували для безперервного бродіння, перед переносом у біореактор тестували також у відношенні забруднення. Для тестування з метою виявлення присутності як аеробних, так і анаеробних бактерій, зразки поміщали на стандартний пивний агар (Universal Beer Agar) (UBA, фірма Difco Laboratories), доповнений 10мг/л циклогексимида, і інкубували протягом 10 днів при 28°C. Планшети, що тестували у відношенні забруднення анаеробними бактеріями, поміщали в анаеробну посудину, у якій знаходився пакет, що містить AnaeroGen® (фірма Oxoid), що поглинав весь кисень, який знаходиться в посудині, у результаті чого створювалося анаеробне навколишнє середовище. Для перевірки анаеробних умов у посудині застосовували анаеробний індикатор (фірма Oxoid), колір якого ставав рожевим у присутності кисню. Забруднення дріжджами дикого типу оцінювали шляхом посіву на середовище для вирощування дріжджів (агар YM, фірма Difco Laboratories), доповнене CuSO_4 (0,4г/л), і інкубації протягом 7 днів при 25°C. Для виявлення зразків, що містять забруднення у вигляді дріжджів нелагерного типу, використовували вирощування на описаному вище лептонному живильному середовищі, що містить дріжджовий екстракт (PYN), протягом 7 днів при 37°C. Відсутність росту дріжджів на середовищі PYN при 37°C свідчило про відсутність дріжджів для виробництва елю або забруднень мікроорганізмами, що ростуть при 37°C.

Аналіз гелевої фази:

Аналіз здійснювали в лабораторії фірми, у якій проводили дослідження, для того, щоб гарантувати, що призначені для використання при бродінні гранули з іммобілізованими клітинами перед їх введенням у біореактор не містять забруднюючих бактерій. Основною ціллю було уникнути забруднення організмами, що приводять до псування пива, такими як *Pediococcus* sp. та *Lactobacillus* sp. або дріжджами дикого типу. 3мл гранул з карагінанового гелю інокулювали в 100мл декількох описаних нижче різних середовищ і поміщали в колби об'ємом 250мл при 25°C,

що струшували при 100об./хв. у шейкері, який термостатують. Для виявлення бактерій, що приводять до псування пива, таких як *Pediosoccus* sp. і *Lactobacillus* sp., як напівселективне середовище застосовували NBB-бульйон (бульйон для виявлення бактерій, що приводять до псування пива) (Nachweis von Bierschadlichen Bacterien) (BBL каталожний номер 98139, NBB Broth Base, 0,02г/л циклогексимида). Для виявлення забруднення дріжджами дикого типу як напівселективне середовище використовували бульйон, що містить сульфат міді (16г/л YM-бульйону, фірма Difco; 0,4г/л CuSO_4). Нарешті, для виявлення бактерій, що присутні у воді, стічній воді, молочних продуктах і харчових продуктах, використовували бульйон, застосовуваний у стандартних методах (STA) з додаванням циклогексимида (16г/л бульйону "Standard Methods", фірма Difco; 0,02г/л циклогексимида) [Power і McCuen, 1988]. Вибирали селективні середовища для того, щоб протягом 3 днів знайти й ідентифікувати можливі організми, що приводять до псування пива. Забруднені зразки виявляли по наявності каламуті у зразку, що служило підставою для припущення про присутність забруднення.

Метод виявлення клітин дріжджів з дефіцитом респіраторної здатності (RD): метод на основі накладання хлориду трифенілтетразолія (ТФХ):

Цей метод застосовували для того, щоб відрізнити дріжджі з дефіцитом респіраторної здатності від іншої частини популяції дріжджів, і він оснований на тому, що ТФХ являє собою безбарвну сіль, що при відновленні утворює осад червоного кольору. Якщо шар ТФХ наносять на колонії дріжджів, які вирощують на лептонному агаровому живильному середовищі, що містить дріжджовий екстракт (YPD) (екстракт дріжджів, 10г/л; пептон, 20г/л; декстроза, 20г/л; агар, 20г/л у dH_2O), то дріжджі, що мають респіраторну здатність, відновлюють ТФХ і ці колонії здобувають забарвлення від темно-рожевого до червоного. Однак дріжджі, з дефіцитом респіраторної здатності не відновлюють барвник і зберігають свій початковий колір.

Здійснювали серійні розведення культур до одержання необхідної для висівання концентрації мікроорганізмів, що становить ~ 100 клітин/0,2мл. Потім планшети з YPD інкубували протягом приблизно 3 днів при 21°C доти, поки колонії дріжджів, що знаходяться в аеробному навколишньому середовищі, не ставало можливим розрізнити неозброєним оком. На кожен планшет при 50°C наносили 20мл агару, що містить ТФХ. Після охолодження кожного з зазначених розчинів до 50°C , призначений для нанесення покриття агар, що містить ТФХ, одержували шляхом змішування в співвідношенні 1:1 розчину А (12,6г/л Na_2PO_4 ; 11,6г/л Na_2HPO_4 ; 30,0г/л агару dH_2O , який автоклаували при 121°C , 15хв.) з розчином Б (2,0г/л хлориду 2,3,5-трифенілтетразолія в dH_2O , який автоклаували при 121°C , 15хв.). Планшети зчитували після 3 годин інкубації при температурі навколишнього середовища. Відсоток RD виражали у вигляді відсотка незабарвлених колоній від загальної кількості виявлених колоній.

4.8 Вивчення за допомогою скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю

Гранули з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані дріжджі, видаляли з біореактора через порт для відбору зразків і поміщали в скляну пробірку об'ємом 10мл із кришкою, що загвинчується, у невеликому об'ємі бульйону, який зброджують. Пробірку відразу ж поміщали на лід і переносили в ізолюваний контейнер для РЕМ-установки. Гранули з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані дріжджі, фіксували в 2об.% глутаровому альдегіді, приготовленому у фосфатному буфері Соренсена, 0,07М, рН 6,8 (Hayat, 1972). Потім здійснювали наступну фіксацію в 1%мас./об. тетроксиді осмію, приготовленому в тому ж самому буфері, і дегідратацію за допомогою серійних спиртових розчинів із зростаючою міцністю 50, 70, 80, 90, 95, 100об.%, що здійснювали в кожному випадку протягом 15хв., і потім її проводили ще тричі в 100%-ному спирті. Перед здійсненням висушування при критичній точці (температурі) (фірма Ladd Research Industries, Берлінгтон, штат Вермонт) за допомогою діоксиду вуглецю, деякі гранули заморожували в рідкому азоті, руйнували і вносили в 100%-ний спирт. Руйнування при заморожуванні дозволяє мінімально ушкоджувати внутрішню поверхню гранул. Після висушування при критичній точці на зразки напилювали покриття (пристрій для напилювання покриття типу Polaron SC500, фірма Instruments, Великобританія) у вигляді шару золотого/палладій товщиною 30нм і потім сканували за допомогою емісійного електронного скануючого мікроскопа типу Hitachi S-4500 (фірма Nissei Sangyo, Токіо, Японія).

4.9 Протокол відбору зразків з біореактора

Резервуар, приєднаний до порту для відбору зразків з біореактора (мембранний клапан для відбору зразків типу Scandi-Brew Type T Membrane Sample Valve), заповнювали 70об.%-ним розчином етанолу для підтримання асептичних умов в області отворів у період між відборами зразків. Для відбору зразка заглушку видаляли з основи резервуару, що містить етанол, здійснювали злив і ретельно промивали етанолом перед відкриттям порту. Зразки збирали в склянку з кришкою, яка загвинчується, що має буртик, при цьому об'єми варіювалися в межах 5-60мл у залежності від типу проведеного аналізу. Для оцінки забруднення мікроорганізмами 10мл рідини, яку зброджують, накачували за допомогою вакуумного насоса через стерильний мембранний фільтр. Мембрану з розміром пор 0,45мкм поміщали на відповідне селективне середовище як описано в розділі 4.6.

Для хімічного аналізу 60мл зразка відбирали через мембрану з склянки об'ємом 100мл із кришкою, що загвинчується, і фільтрували за допомогою шприца з використанням фільтруючої системи на основі двошарового шприца Шлейхера і Шуля (Schleicher і Schull) типу FP-050 з розміром пор 5мкм і 0,45мкм. Потім необхідний об'єм зразка переносили в склянку з об'ємом простору над рідиною 20мл і закривали шляхом обтиску з використанням тefлонової мембрани й алюмінієвої

кришки. Необхідні об'єми зразків перераховані в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

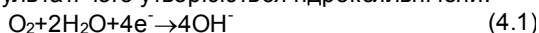
Необхідні об'єми
зразків для різних хімічних аналізів

Зразок	Об'єм (мл)
Етанол	5
Діюли з коротким ланцюгом	10
Летучі речовини у пиві	12
Близькі за будовою дикетони	5
Вуглеводи/питома вага/	12
Вільний азот аміногруп/протеїн	12

4.10 Вимірювання вмісту розчиненого кисню

Аналізатор розчиненого кисню д-ра Тієдіга (Thiedig) типу Digoх 5 дозволяє вимірювати концентрацію розчиненого кисню в діапазоні 0,001-19,99мг/л у суслі, суслі, яке зброджують, і пиві (Anon, 1998). Vlácha і Uhlig, (1985) протестували велику кількість засобів для вимірювання концентрації розчиненого кисню в пиві й встановили, що аналізатор типу Digoх дозволяє одержувати достовірні точні результати.

Електрохімічний метод вимірювання, який застосовують в аналізаторі Digoх 5, оснований на використанні триелектродного амперометричного пристрою, оснащеного потенціометром. Оцінку кількості клітин робили з використанням вимірювального електрода (катода) і протиелектрода (анода). Ці електроди вводили в рідину, у якій було потрібно виміряти концентрацію кисню. Після фіксації певного вимірювального потенціалу на вимірювальному електроді відбувається реакція. На великому срібному вимірювальному електроді молекули кисню перетворюються в гідроксильні іони. Дві молекули води вступають у взаємодію з другою молекулою кисню відповідно до рівняння 4.1, поглинаючи чотири електрони, у результаті чого утворюються гідроксильні іони.



Анод з нержавіючої сталі поглинає чотири електрони, що вивільняються на катоді, створюючи електричний струм. Відповідно до рівняння 4.2, вимірюваний струм, I , прямо пропорційний концентрації кисню, $C_{\text{L},\text{O}}$:

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

де константа K залежить від константи Фарадея, кількості електронів у молекулі, площі поверхні катода і товщини прикордонного шару на поверхні вимірювального електрода.

Константа, характеристики і вимірювальний потенціал мають вирішальне значення для вибірконості (у відношенні кисню) і точності вимірювань. Вимірювану напругу стабілізують за допомогою контрольного електрода, який не підживлюють струмом. Це поряд із стабілізатором напруги, що забезпечує електронний зворотний зв'язок, створює постійний вимірюваний потенціал. Поверхня вимірювального електрода за допомогою електроліту з'єднана через діафрагму з контрольным електродом.

Погрішність у перерахунку на вимірюваний

діапазон кінцевої концентрації розчиненого кисню, становила $\pm 3\%$ (Anon, 1998). Аналізатор розчиненого кисню калібрували по методу активного калібрування Тієдіга (Thiedig Active Calibration), відповідно до якого за допомогою Digoх 5 на основі закону Фарадея одержували певну кількість кисню (0,500мг/л) і потім його піддавали перехресній перевірці з використанням матриці вимірних значень. Це давало можливість протягом однієї хвилини здійснювати калібрування приладу при тиску, температурі й умовах потоку, що відповідали умовам експерименту. Оскільки обмін молекулами в датчику являє собою процес дифузії, то він залежить від температури, підвищення якої приводить до великих швидкостей реакції і збільшує силу вимірюваного струму. Тому прилад Digoх 5 був оснащений також датчиком, що вимірював температуру і мав автоматичну компенсацію флуктуацій.

Digoх 5 має певні переваги в порівнянні з датчиками вмісту кисню мембранного типу. Оскільки для використання Digoх не потрібен електроліт, то втрата чутливості порівняно мала і на вимірювальному електроді відбуваються тільки незначні відкладення. За допомогою активного калібрування можна здійснювати також оцінку чутливості в будь-який момент часу. За допомогою простої процедури можна здійснювати очищення електрода і повторне калібрування приладу. У більшості мембранних датчиків на катоді відкладається хлорид срібла, у результаті чого відбуваються зміни в розчинах електролітів, що приводять до поступового зменшення вимірюваних величин. З цієї причини рекомендуються мембрани й електроліти замінювати через кожні кілька тижнів і потім повторно калібрувати, що вимагає значного часу і є обтяжливою задачею. Калібрування мембранних датчиків, як правило, проводять у лабораторії при рівнях насичення киснем, що може приводити до помітних помилок, особливо при вимірюваннях дуже низьких рівнів кисню в середовищі, що являє собою сусло і пиво. Температура впливає на мембранні датчики кисню: може змінюватися проникність мембрани, може змінюватися парціальний тиск кисню і може змінюватися розчинність кисню в електроліті. Здійснення температурної компенсації для цих трьох факторів у мембранних датчиках є трудним.

Вимірювання вмісту розчиненого кисню в суслі в процесі зберігання:

Гнучкий трубопровід типу Tygon®, що задовольняє вимогам для транспортування харчових продуктів (внутрішній діаметр ¼ дюйма) з'єднували в асептичних умовах з портом для відбору зразків, розташованим поблизу верхньої частини кінцевої основи резервуарів для збереження сусла, T-1 і T-2 (див. розділ 4.2.1). За допомогою шлангового насоса з перемінною швидкістю через блок для аналізу пропускали потік з об'ємною витратою 11л/год. (пристрій типу Masterflex® L/S™ Digital Standard Drive, каталожний номер фірми Cole-Palmer P-07523-50). Вимірювання вмісту розчиненого кисню здійснювали через 4-5хв.

Вимірювання вмісту розчиненого кисню в біореакторі:

Перед здійсненням вимірювання вмісту розчиненого кисню в біореакторі блок аналізу Digox 5 піддавали санітарній обробці. Вхідний отвір датчика приєднували до стерильного трубопроводу типу Tygon®, що задовольняє вимогам для транспортування харчових продуктів (внутрішній діаметр ¼ дюйма). Через аналізатор протягом 15хв пропускали за допомогою насоса 70об.-% ний розчин етанолу з об'ємною витратою приблизно 10л/год. Аналізатор розчиненого кисню був з'єднаний із краном системи води, яку використовують в лабораторії, і через датчик протягом мінімум 2 годин пропускали гарячу воду (70°C). Цей метод використовували замість стерилізації паром, оскільки матеріали, з яких виготовлений блок для аналізу, не витримували температуру понад 70°C. Після санітарної обробки протягом 2 годин трубопроводи на вході і на виході пристрою перекривали для підтримання стерильних умов в аналізаторі. При використанні витяжного ковпака з ламінарним потоком тільки що стерилізовані трубопроводи приєднували до вхідного і вихідного отворів аналізатора. Потім вільні кінці трубопроводу приєднували в асептичних умовах до розташованих на верхній кришці біореактора портів з нержавіючої сталі, що мають внутрішній діаметр ¼ дюйма, і починали вимірювання. Якщо порти біореактора не використовували, то їх герметично закривали за допомогою стерилізованого трубопроводу типу Tygon®, що має невелику довжину, який задовольняє вимогам для транспортування харчових продуктів.

Вміст розчиненого кисню в газліфтному біореакторі вимірювали в режимі on-line шляхом відбору рідини із бульйону, який зброджують, через порт, вбудований у верхню кришку біореактора. Рідину, що зброджують, яка виходить з біореактора, пропускали через фільтр із нержавіючої сталі (див. розділ 4.1.2), приєднаний до трубопроводу з нержавіючої сталі діаметром ¼ дюйма, що проходив через кришку біореактора. Потім рідину пропускали через гнучкий трубопровід типу Tygon® діаметром ¼ дюйма, що задовольняє вимогам для транспортування харчових продуктів, що був приєднаний до шлангового насоса з перемінною швидкістю (типу Masterflex® L/S Digital Standard Drive, каталожний номер фірми Cole-Palmer P-07523-50), що забезпечує об'ємну витрату 11л/год через блок для аналізу розчиненого кисню. Потім рідину, що зброджують, повторно використовували, пропускаючи через другий порт із нержавіючої сталі діаметром ¼ дюйма, що проходить через верхню кришку біореактора. Для зв'язку датчика з біореактором використовували трубопровід типу Tygon®, що задовольняє вимогам для транспортування харчових продуктів (Cole-Palmer, 1999), внаслідок того, що в специфікації постачальника було зазначено, що його можна використовувати для вимірювання низьких рівнів проникності для кисню, $30\text{см}^3\text{мм}/(3\cdot\text{см}^2\cdot\text{смHg})\times 10^{-10}$. Вимірювання проводили після здійснення циркуляції протягом 4-5хв.

4.11 Хімічний аналіз

Калібрування проводили з використанням відповідних стандартних реактивів. Всі реактиви, що застосовували для аналізу, мали чистоту >99%. При необхідності здійснювали додаткове очищення шляхом дистиляції.

4.11.1 Етанол

Концентрацію етанолу визначали методом газової хроматографії (ГХ) із внутрішнім стандартом, затвердженим Технічним комітетом і Редакційним комітетом Американського товариства хіміків-пивоварів (1992). Дегазовані зразки, оброблені безпосередньо ізопропанолом, що використовували як внутрішній стандарт, 5об.%, і вводили в газовий хроматограф типу Perkin Elmer 8500, оснащений полум'яно-іонізаційним детектором (FID) і автоматизованим пристроєм для збору зразків типу Dynatech. Використовували колонку, заповнену Chromosorb 102, 80-100меш, як газ-носії застосовували гелій. Умови хроматографування: швидкість потоку 20мл/хв, температура інжектора 175°C, температура детектора 250°C, температура колонки 185°C.

4.11.2 Узагальнення даних про вміст вуглеводів

Концентрації глюкози, фруктози, мальтози, DP3 (мальтотриоза), DP4 (мальтотетроза), полі-1 (полісахаридний пік 1) і гліцерину оцінювали кількісно за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням хроматографа типу Spectra-Physics (SP8100XR), оснащеного катіонообмінною колонкою (типу Bio-Rad Aminex, HPX-87K) і детектором коефіцієнта відображення (типу Spectra-Physics, SP6040XR). Як рухливу фазу використовували вторинний кислий фосфат калію, 0,01М, крім того, система включала автоматизований пристрій для збору зразків типу Spectra-Physics (SP8110). Пристрій працював при протитиску 800фунтів/кв. дюйм. Швидкість потоку зразка і елюента через колонку становила 0,6мл/хв, температура колонки становила 85°C, а температура детектора 40°C. Об'єм, який ін'єктували, становив 10мкл.

4.11.3 Питома вага

У даному описі питому вагу суслу і середовища, яке зброджують, виражали в одиницях дійсного вмісту екстрактивних речовин (градус Плато (Plato), °P), що являють собою одиниці, прийняті в пивоварній промисловості.

Зразки збродженої рідини фільтрували як описані в розділі 4.8, і змішували перед проведенням аналізу з використанням цифрового денситометра (типу Anton Paar DMA-58 Densitometer) з метою визначення питомої ваги суслу (у градусах Плато). Для визначення питомої ваги зразки збродженої рідини вносили в скляні U-подібні пробірки, які струшували з використанням електронного пристрою, що дозволяло непрямим шляхом визначати градус Плато.

Градус Плато являє собою чисельне значення процентного вмісту (%мас/об.) сахарози у водному розчині при 20°C, питома вага якого є такою ж, що й у розглянутого суслу. Оскільки шкала градусів Плато і відповідні таблиці, що зв'язують питому вагу розчину з концентраціями розчинених речовин, оснований на використанні водного

розчину сахарози, то вони дозволяють зробити тільки наближену оцінку кількості екстракту. Поняття «екстракт» відноситься до загальної кількості придатної розчинної маси речовин, таких як вуглеводи, протеїни, таніни, що утворюються в результаті зброджування продукту "як такого", та/або можливо в результаті процесингу (Hardwick, 1995). У пивоварній промисловості екстракт дотепер усе ще характеризують за допомогою питомої ваги, вираженої в градусах Плато, оскільки не має іншого більш придатного методу, що краще відбивав би варіабельність композицій сусла різного походження.

4.11.4 Вміст загального діацетилю

Вміст загального діацетилю (2,3-бутандіону) у пиві і зразках збродженого продукту вимірювали з використанням методу відбору зразків для аналізу з простору над рідиною, наступного розділення за допомогою капілярної ГХ (хроматограф типу Hewlett-Packard 5890) і виявлення на основі методу захоплення електронів (ECD), затвердженого Технічним комітетом і Редакційним комітетом Американського товариства хіміків, що працюють у пивоварній промисловості (1992). Метод називають методом визначення "вмісту загального діацетилю", оскільки при його використанні вимірюють кількість діацетилю і його попередника, альфа-ацетолактата. Як газ-носії застосовували 5%-ний метан в аргоні при швидкості потоку 1,0мл/хв і використовували колонку J & W DB-Wax. Співвідношення розділених компонентів у суміші становило 2:1, як допоміжний газ використовували гелій при швидкості 60мл/хв. Температура інжектора становила 105°C, а температура детектора 120°C.

Система була оснащена автоматизованим пристроєм типу Hewlett Packard 7694E для відбору зразків для аналізу з верхньої частини резервуару, як внутрішній стандарт використовували 2,3-гександіон. Тривалість циклу вимірювання зразка становила 40хв, при цьому час врівноважування становив 30хв при 65°C, час створення надлишкового тиску становив 2хв при 4,8фунтів/кв. дюйм, час заповнення контуру становив 0,2хв., час врівноважування контуру 0,1хв і час введення проби 0,27хв. Тиск носія становив 18,8фунтів/кв. дюйм, температура в передавальному трубопроводі 95°C і температура контуру 65°C.

4.11.5 Летких речовини в пиві

Вміст летких речовин у пиві, включаючи ацетальдегід, етилацетат, ізобутанол, 1-пропанол, ізоамілацетат, ізоаміловий спирт, етилгексаноат і етилоктаноат, вимірювали, застосовуючи метод аналізу зразків із простору над рідиною резервуару за допомогою ГХ (хроматограф Hewlett Packard 5890) з використанням внутрішнього стандарту (н-бутанол) і полум'яно-іонізаційного детектора (FID). Як газ-носії використовували гелій при 6,0мл/хв, ГХ був оснащений автоматизованим пристроєм типу Hewlett Packard 7694 для відбору зразків для аналізу з простору над рідиною резервуару.

Температура інжектора газового хроматографа становила 200°C, а температура детектора - 220°C. Профіль температури термостата: 40°C

(5хв), 40-200°C (10°C/хв), 200-220°C (50°C/хв), 220°C (5хв.). Гази для FID включали носій, який пропускали з витратою 6,0мл/хв, гелій з витратою 30мл/хв і при тиску 28фунтів/кв. дюйм, H₂ з витратою 50мл/хв і при тиску 25фунтів/кв. дюйм і повітря з витратою 300мл/хв і при тиску 35фунтів/кв. дюйм.

Мембрану продували при витраті 0,8мл/хв. Тиск на вході становив 4,0фунтів/кв. дюйм. Коли до порту для ін'єкції приєднували за допомогою голки автоматизований пристрій для відбору зразків, тиск у резервуарі становив 15,9фунтів/кв. дюйм, тиск носія - 7,1фунтів/кв. дюйм, тиск на вході в колонку - 4фунти/кв. дюйм, витрата розділяючого потоку становила 18мл/хв і витрата через колонку становила 6мл/хв. Температури в різних зонах становили: у резервуарі 70°C, у контурі 80°C, у передавальному трубопроводі 150°C.

Тривалість циклу ГХ становила 40хв., при цьому час врівноважування становив 35хв при 65°C, час створення надлишкового тиску становив 0,25хв., час заповнення контуру становив 0,1хв., час врівноважування контуру 0,1хв., час введення проби 3хв., а об'єм проби, що вводиться, становив 1мл.

4.11.6 Вміст вільного азоту аміногруп (FAN)

Для визначення вмісту вільного азоту аміногруп у зразку середовища, яке зброджують, застосовували затверджений Технічним комітетом і Редакційним комітетом Американського товариства хіміків, які працюють в області пивоваріння, (1992) міжнародний метод визначення вільного азоту аміногруп з використанням спектрофотометра типу Perkin Elmer LS50B. Цей спектрофотометричний метод оснований на кольоровій реакції між нінгідрином і азотом, що присутні у зразку. Ступінь абсорбції безпосередньо зв'язаний з кількістю азоту присутнього в аміногрупах.

а) реагент для кольорової реакції:

19,83г вторинного кислого фосфату натрію (Na₂HPO₄)

30,00г вторинного кислого фосфату калію (KH₂PO₄)

2,78г моногідрату нінгідрину

1,50г фруктози

б) реагент для розведення:

2,00г йодату калію (KIO₃)

596мл дистильованої деіонізованої води

404мл 95об.% етанолу

зберігали в холодильнику і використовували при кімнатній температурі.

в) маточний розчин гліцину: 0,1072г/100мл дистильованої деіонізованої води

г) стандартний розчин гліцину: маточний розчин розбавляли в співвідношенні 1:100 (об./об.) дистильованою деіонізованою водою. Цей стандартний розчин містив 2мг/л FAN.

Зразки розбавляли в співвідношенні 100:1 дистильованою водою і 2мл розведеного зразка вносили в кожну з 3 лабораторних пробірок. Контрольні зразки одержували шляхом внесення 2мл дистильованої деіонізованої води в кожну з трьох лабораторних пробірок. Приготовлювали також три пробірки, кожна з яких містила по 2мл стандартного розчину гліцину.

До всіх зразків додавали по 1мл реагенту для кольорової реакції і потім їх поміщали рівно на 16хв у водяну баню при 100°C. Після цього лабораторні пробірки охолоджували протягом 20хв у водяній бані при 20°C. Потім у кожну лабораторну пробірку додавали по 5мл реагенту для розведення і ретельно перемішували. Після цього зразкам давали відстоятися протягом 10-15хв. Потім за допомогою спектрофотометра вимірювали абсорбцію при довжині хвилі 570nm і розраховували вміст FAN у зразку за допомогою рівняння 4.3.

$$FAN(мг/л) = (A_F - A_B - A_F)2d/A_S \quad (4.3)$$

де FAN являє собою вміст вільного азоту аміногруп у зразку в мг/л, A_F являє собою середнє значення коефіцієнтів абсорбції для розчинів, які тестують, A_B являє собою середнє значення коефіцієнтів абсорбції для контролів, A_F являє собою середнє значення поправки на коефіцієнти абсорбції для темних видів сусла і пива, 2 являє собою вміст FAN у стандартному розчині гліцину, d являє собою коефіцієнт розведення зразка і A_S являє собою середнє значення коефіцієнтів абсорбції для стандартного розчину гліцину.

Розділ 5. Безперервний процес бродіння з використанням системи газліфтного біореактора

Для безперервного процесу бродіння при виробництві пива була вибрана система газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування внаслідок того, що були опубліковані дані про те, що вона забезпечує високі характеристики масообміну (рідина - тверда речовина) і змішування. Масообмін рідина - тверда речовина є особливо важливим, оскільки він забезпечує перенесення живильних речовин від рідкої фази до твердого біокатализатора, що містить іммобілізовані клітини, забезпечуючи тим самим інкапсульовані клітини дріжджів субстратом. Такі біореактори забезпечують також гарну аерацію, споживають невелику кількість енергії і прості для виготовлення. Це робить системи газліфтних біореакторів дуже привабливими для використання при великомасштабному виробництві, наприклад, для промислового застосування при обробці стічних вод [Driessen та ін., 1997; Heijnen, 1993].

5.1 Опис газліфтного біореактора з трубою для відсмоктування

У даному розділі приведений докладний опис газліфтного біореактора, що застосовували при проведенні розглянутої роботи.

5.1.1 Корпус біореактора

Сконструйований для проведення досліджень у рамках даної роботи газліфтний біореактор об'ємом 13л (робочий об'єм 8л) із трубою для відсмоктування, представлений на Фіг.16, мав трифазний псевдозріджений шар (рідина/тверда речовина/газ), у якому іммобілізовані клітини знаходилися в стані суспензії завдяки циркуляції всередині рідини, що підтримували за допомогою газоподібного діоксиду вуглецю [Heijnen, 1996]. Фотографія корпусу біореактора наведена на Фіг.17, а докладне креслення з докладними розмірами наведено на Фіг.18. Діоксид вуглецю і повітря надходили в нижню конічну частину біореактора через виготовлений шляхом спікання розподільник газу з нержавіючої сталі (форсунка

для продувки CO₂, каталожний номер 9222, фірма Hagedorn & Gannon, США), що має довжину 0,11м і зовнішній діаметр 0,013м. Діоксид вуглецю використовували як псевдозріджуючий газ, а повітря використовували для забезпечення клітин дріжджів киснем.

Труба для відсмоктування, концентрично розташована всередині колончатого біореактора, функціонувала як стояк для проходу газів у цій системі з псевдозрідженим шаром, у той час як кільцевий канал, який знаходився ззовні, служив як зливна труба. Внутрішня труба для відсмоктування була відділена від циліндричної частини сепаратора часток за допомогою трьох стрижнів з нержавіючої сталі, розташованих у верхній області біореактора, яка розширюється. У тому випадку, якщо фітинги труби для відсмоктування і сепаратора часток знаходяться всередині біореактора, мінімізується ризик забруднення мікроорганізмами з навколишнього середовища.

Спочатку біореактор мав на виході сито з визначеним розміром отворів для відділення іммобілізованих клітин від рідини. Однак сито мало тенденцію до забруднення, тому для відділення гранул з іммобілізованими клітинами від рідини в той момент, коли вони виходять з верхньої частини труби, що відсмоктує, і втікають у кільцевий канал, використовували циліндр із нержавіючої сталі. Частки повинні зіштовхуватися з циліндром і повертатися назад у загальну масу рідкої фази, а не залишати біореактор у результаті витікання. Таким чином, поблизу вихідного отвору біореактора малася невелика область, у якій були відсутні частки, що містять іммобілізовані клітини. Розширена верхня частина біореактора дозволяла також збільшити площу поверхні для видалення бульбашок газу.

5.1.2 Верхня кришка біореактора

На Фіг.19 представлено схематичне зображення верхньої кришки біореактора. Для зменшення ризику забруднення кількість портів у верхній кришці була зведена до мінімуму. Порти або з'єднували безпосередньо з верхньою кришкою шляхом зварювання, або використовували фітинги, які ущільнюються вручну (типу Swagelok®). У верхній кришці знаходилися порт для інокуляції, вимірювальний канал для введення термометра, мембрана для відбору газу і порти для вилучення рідини і для повторного використання при вимірюваннях вмісту кисню. Датчик температури вводили у вимірювальний канал для введення термометра і з'єднували із зворотним контуром системи, що включає контролер температури. Контролер температури давав сигнал на електромагнітний клапан, що починав або припиняв подачу гліколя в тепловий кожух біореактора. Температуру спостерігали за допомогою термометра (термометр типу Cole-Palmer Waterproof Thermocouple, каталожний номер 90610-20) і зонда типу T, вбудованого шляхом зварювання у верхню кришку біореактора. Вміст розчиненого кисню вимірювали за допомогою аналізатора розчиненого кисню (фірма Dr. Theidig, типу Digox 5), при використанні якого було потрібно забезпечити потік рідкого бульйону через блок для аналізу із швидкістю 9-11л/год. для одержання

точних даних про вміст кисню. Для вимірювання вмісту кисню рідину відбирали з біореактора через трубу з внутрішнім діаметром $\frac{1}{4}$ дюйма, що проходила через верхню кришку за допомогою звареного з'єднання і, як показано на Фіг.20, кінець труби був оснащений фільтром для вилучення великих часток з рідини, яку прокачують за допомогою насоса через аналізатор розчиненого кисню. Потім рідину повертали в біореактор через інший порт діаметром $\frac{1}{4}$ " у верхній кришці.

5.1.3 Санітарні клапани для асептичного відбору зразків

Біореактор був оснащений мембранним клапаном для відбору зразків (типу Scandi-Brew®), вбудованим у стінку біореактора за допомогою зварювання. Клапан був призначений для відбору зразків в асептичних умовах. Мембрана служила для безпосередньої ізоляції від середовища, яке зброджують, що дозволяло здійснювати повну стерилізацію клапана за допомогою пари і спирту з використанням двох вихідних отворів (Фіг.18). Невеликий зовнішній резервуар, який оточував мембрану, що містив етанол, служив для забезпечення стерильності в період між відбором зразків. Цей клапан використовували для відбору з біореактора всіх зразків і передбачалося, що склад рідини в точці відбору зразків не має істотних відмінностей від складу рідини, що виходить з випускного отвору біореактора. Як вказувалося в главі «Матеріали і методи» даної роботи, зразки з біореактора відбирали через клапан, розташований на зовнішній стінці біореактора. Для того, щоб перевірити припущення про те, що склад рідини, що виходить через випускний отвір біореактора, є таким же, що й у рідини, відібраної з внутрішньої області біореактора, проводили оцінки часу змішування.

Для визначення часу змішування в газліфтному біореакторі використовували метод імпульсних трасерів (Chisti, 1989). 1мл 10н. HCl вводили шляхом швидкої ін'єкції в кільцевий канал біореактора і реєстрували зміну значення pH з часом, при цьому за момент часу $t=0$ с приймали момент часу, у який здійснювали ін'єкцію. Значення pH повертали до вихідного значення шляхом ін'єкції 10н. NaOH. Електрод для вимірювання значення pH (фірма Cole-Palmer, каталожний номер P-05990-90) мав довжину 277мм і діаметр 3,5мм. Для моніторингу значення pH використовували датчик для вимірювання значення pH типу Ingold Model 2300. Двоточкове калібрування здійснювали з використанням сертифікованих стандартних буферів, а саме, зеленого буфера фірми Beckman з pH 7,0, каталожний номер 566002 і червоного буфера фірми Beckman з pH 4,0, каталожний номер 566000. Дані реєстрували з частотою 3750Гц протягом 300с за допомогою програмного забезпечення, створеного Cheryl Hudson і John Beltrano у 1994 і модифікованого Norm Mensour у 1999 (Університет Західного Онтаріо, Лондон, провінція Онтаріо).

Значення pH потім згладжували за допомогою основного на алгоритмі Savitsky-Golay програмного забезпечення TableCurve 2D (Jandel Scientific Software, фірма Labtronics, Гельф, провінція Онтаріо). Алгоритм Savitzky-Golay являє

собою працюючий у тимчасовій області метод згладжування, оснований на апроксимації обмірюваних значень pH по методу найменших квадратів поліномом четвертого порядку з використанням рухливого вікна (Anon, 1996). Потім згладжені дані стандартизували і будували залежність ΔpH від часу. За час змішування приймали проміжок часу до першої хвилини, коли значення pH досягло $\sim 95\%$ від значення в рівноважному стані. Час змішування вимірювали з використанням трьох різних об'ємних витрат діоксиду вуглецю: $283\text{см}^3/\text{хв}$, $472\text{см}^3/\text{хв}$ (у даній роботі використовували поняття об'ємної витрати) і $661\text{см}^3/\text{хв}$. В усіх трьох випадках значення pH у біореакторі врівноважувалося (досягало $\sim 95\%$ від значення в рівноважному стані) менш, ніж за 2хв, що видно з даних, представлених у Додатку 1. Очевидно, такий час змішування занадто малий для підтвердження початкового припущення про те, що в біореакторі відбувалося гарне змішування. Це дозволило зробити припущення про те, що зразки рідини, відібрані поблизу стінки біореактора, не мають істотних відмінностей від рідини, що витікає з вихідного отвору при середньому часі перебування рідини в біореакторі, що становить 24 години. З представлених на кресленнях даних випливає, що існує визначена рециркуляція рідини, на яку накладається змішування шляхом диспергування, що є типовим для газліфтних біореакторів (Chisti, 1989).

5.2 Блок-схема системи безперервного бродіння пива

Блок-схема системи безперервного бродіння пива, що знаходилася в призначеному для виробництва невеликих партій пива пілотному пивоварному заводі компанії фірми Labatt Brewing Company Limited у Лондоні, провінція Онтаріо, приведена на Фіг.21, а докладний опис її елементів дано в таблиці 5.1. У цілому процес полягав у тому, що пивне сусло, що надходить із заводу фірми Labatt у м. Лондон, стерилізували за допомогою стерилізатора миттєвої дії (типу Fisher Plate Heat Exchanger, combi-flow Type Eurocal 5FH) і зберігали у великих резервуарах для витримання (T-1 і T-2). При безперервному процесі бродіння сусло вносили з контрольованою швидкістю в газліфтний біореактор (BR-1), що містив іммобілізовані клітини дріжджів. Зброджена рідина витікала з газліфтного біореактора і її збирали в резервуар-накопичувач (T-3). У наступних розділах приведений докладний опис функціонування системи безперервного бродіння пива, представленої на Фіг.21.

5.2.1 Збір і зберігання сусла

Неоксигеноване сусло для безперервного процесу бродіння одержували з заводу фірми Labatt, м. Лондон, за допомогою трубопроводу і заливали в циліндроконічний резервуар для зберігання об'ємом 1600л, попередньо продутий діоксидом вуглецю для того, щоб мінімізувати поглинання кисню суслом. Всі резервуари цього масштабу, включаючи резервуари для збереження сусла, T-1 і T-2, перед використанням очищали і піддавали санітарній обробці відповідно до методу високоефективної обробки (Best Practices), прийнятому на фірмі Labatt. Потім сус-

ло піддавали миттєвій пастеризації і переносили в придатний резервуар для зберігання сусла при 2°C, T-1 або T-2 (також попередньо продутий діоксидом вуглецю). Сусло витримували в цих резервуарах при 2°C до 2 тижнів, поставляючи рідину в біореактор BR-1, у якому здійснювали безперервний процес бродіння. Після закінчення двотижневого періоду підживлення біореактора змінювали так, щоб подача сусла відбувалася з другого резервуару, що містить свіже сусло. Для мінімізації часу простоювання обладнання при переключенні на свіже сусло використовували два ідентичних резервуари для зберігання сусла, T-1 і T-2. В усіх випадках сусло аналізували у відношенні забруднення як мінімум за два дні до внесення в біореактор (BR-1). Якщо сусло виявлялося забрудненим, його вилучали і негайно набирали і пастеризували свіже сусло.

Мінімізація концентрації розчиненого кисню в суслі в процесі зберігання:

Ціль полягала в тому, щоб зберігати сусло з мінімальним вмістом кисню, витримуючи його на постійному рівні, і при низькій температурі, але не заморожуючи сусло. Для цього було необхідно запобігти небажаним реакціям в суслі, які погіршують якість, що обумовлені хімічними взаємодіями з киснем [Narzip та ін., 1993], забезпечити регулярну подачу сусла в біореактор і мінімізувати ризик забруднення сусла мікроорганізмами в процесі зберігання. Циліндроконічні резервуари (T-1 і T-2), які мають великий об'єм 1600л (повний об'єм), що використовували для зберігання сусла, призначеного для безперервного процесу бродіння, спочатку були сконструйовані як ферментери для періодичного процесу бродіння, а не як резервуари для зберігання сусла. Внаслідок цього система охолодження цих резервуарів не могла підтримувати температуру сусла строго на рівні 2°C. Після витримання сусла протягом трьох днів різниці температур між різними областями резервуару досягала 15°C (таблиця 5.2).

Такі теплі області в резервуарі підвищують ризик росту мікроорганізмів. Таким чином, для таких резервуарів необхідно здійснювати перемішування для забезпечення однакової низької температури.

Тому в основу конічної частини кожного резервуару для зберігання (T-1 і T-2) був встановлений трубчастий розпилювач. Були проведені експерименти для визначення найкращого протоколу заповнення резервуару суслом і підтримання постійних низьких рівнів розчиненого кисню. У першому експерименті резервуар для зберігання заповнювали суслом без здійснення оксигенації і піддавали миттєвій пастеризації. Після заповнення резервуару 1600л сусла, у нижній частині резервуару розпорошували діоксид вуглецю з витратою 0,113м³/год. В другому експерименті сусло знову брали без здійснення оксигенації і піддавали миттєвій пастеризації. У цьому варіанті резервуар для зберігання продували діоксидом вуглецю (0,85м³/год) за 3 години до заповнення і невелику кількість діоксиду вуглецю (0,113м³/год) безупинно розпорошували в резервуарі для зберігання після внесення сусла в резервуар. Цим невеликим потоком діоксиду вуглецю безупинно

барботували сусло, яке знаходиться в резервуарі, у то час як воно подавалося для безперервного бродіння. В обох експериментах регулярно протягом тижневого періоду зберігання здійснювали моніторинг концентрації розчиненого кисню.

На Фіг.5.7 представлено залежність концентрації розчиненого кисню від часу зберігання. У тому випадку, коли резервуар для зберігання попередньо не продували діоксидом вуглецю, сусло могло поглинати деяку кількість кисню з повітря, що знаходилося в просторі над рідиною. Таким чином, без попередньої продувки резервуару потрібно істотно більш тривалий період часу для того, щоб концентрація розчиненого кисню в суслі досягла мінімального і постійного рівня. Якщо здійснювали попередню продувку резервуару, то концентрація розчиненого кисню в суслі залишалася на постійному низькому рівні протягом всього періоду зберігання. Тому попередня продувка резервуарів для зберігання сусла (T-1 і T-2) і продовження пропускання невеликого потоку діоксиду вуглецю через сусло в процесі зберігання для підтримання невеликого надлишкового тиску в резервуарах були прийняті як складова частина процедури зберігання сусла для всіх дослідів з використанням безперервного процесу бродіння.

Робили також порівняння профілів температури в резервуарах для зберігання для варіантів з розпиленням 0,113м³/год діоксиду вуглецю і без розпилення. Це здійснювали при використанні води, а не сусла, за допомогою датчика температури типу T, з'єднаного з термометром (Cole-Palmer Waterproof Thermocouple Thermometer, каталожний номер 90610-20). Водопровідною водою (1600л) заповнювали резервуар для зберігання сусла і врівноважували протягом трьох днів, при цьому реєстрували температуру в різних областях резервуару для зберігання. Потім через воду в резервуарі протягом 24 годин пропускali діоксид вуглецю з витратою 0,113м³/год і знову реєстрували температуру. У кожному випадку реєстрували температуру навколишнього середовища, температуру в резервуарі для зберігання підтримували на рівні 2,0°C.

Як видно з даних, представлених у таблиці 5.2, при розпиленні діоксиду вуглецю розподілення температури в резервуарах для зберігання було більш рівномірним, при цьому в областях, у яких проводили вимірювання, температура варіювалася від 0,1 до 4,1°C і вміст резервуарів не замерзав. Така знижена температура допомагала попереджати небажаний ріст мікроорганізмів у суслі в процесі зберігання.

Газ випускали з резервуарів для зберігання сусла через стерильний газовий фільтр, розміщений у верхній частині резервуару. Потім сусло перекачували за допомогою шлангового насоса з перемінною швидкістю (P-1) (Masterflex® L/S Digital Standard Drive, фірма Cole-Palmer, каталожний номер P-07523-50) у біореактор (BR-1) об'ємом 8л через впускний отвір з використанням гнучкого трубопроводу Norprene® Food Grade L/S 16, придатного для переносу харчових продуктів.

5.2.2 Безперервний процес бродіння з використанням газліфтно́ї системи біореактора з тру-

бою для відсмоктування

Сусло вводили в нижню конічну частину біореактора BR-1 через порт діаметром 1/4". Суміш стерилізованих за допомогою фільтру (фірма Millipore, Millex®-FG₅₀, фільтрувальний пристрій з розміром отворів 0,2мкм) повітря і діоксиду вуглецю (з чистотою 99,99 %) подавали в біореактор через виготовлений шляхом спікання розпилювач з нержавіючої сталі. Для контролю швидкості потоку діоксиду вуглецю при стандартних умовах (СТТ - стандартна температура і тиск) використовували витратомір (R-3), а для контролю швидкості потоку повітря при СТТ використовували попередньо відкалібрований контролер масової витрати (M-1). Зброджена рідина витікала з верхньої частини біореактора і перетікала через армований трубопровід із ПВХ із внутрішнім діаметром 1" у резервуар для збору (T-3) об'ємом 30л, виготовлений з нержавіючої сталі, який охолоджували за допомогою зовнішнього змійовика, що містить гліколь, і витримували при температурі 4°C.

5.2.3 Збір продукту

Резервуар для збору продукту (T-3) мав великий вхідний порт (внутрішній діаметр 1"), що був сконструйований таким чином, щоб для мінімізації ціноутворення зброджена рідина могла стікати по стінці резервуару для збору. Цей резервуар також був оснащений стерильним газовим фільтром (фірма Millipore, Millex®-FG₅₀, фільтрувальний пристрій з розміром отворів 0,2мкм) для випуску газу з біореактора (BR-1) і резервуару для збору (T-3). Резервуар для збору періодично спорожняли з використанням клапана діаметром 1/4" (V-12), розташованого на відстані 2" над основою резервуару.

5.2.4 Контур охолодження за допомогою гліколя

Гліколь надходив з Лондонського пивоварного заводу в пілотну установку, призначену для виробництва невеликих кількостей пива, при температурі - 23°C і тиску 45фунтів /кв. дюйм і його пропускали через охолоджуючі кожухи резервуарів для витримування суслу (T-1 і T-2), газліфтного біореактора (BR-1) і резервуару для збору продукту (T-3). Два резервуари для витримування суслу і біореактор були оснащені зондами для вимірювання температури рідкої фази, що, у свою чергу, служили для контролю потоку холодного гліколя в кожухах резервуарів. У резервуарах для зберігання суслу сусло знаходилося при 2°C, у той час як температуру всередині біореактора підтримували на рівні 12-22°C у залежності від конкретного експерименту. Резервуар для збору продукту не мав автоматизованої системи контролю температури, замість цього вручну регулювали потік гліколя, підтримуючи температуру в резервуарі на рівні приблизно 4°C. Не було потрібно строго контролювати температуру в резервуарі для збору продукту (T-3), оскільки в цей резервуар просто зливали рідину і не піддавали аналізу або подальшій обробці.

Гліколь використовували також у кожусі і для охолодження трубопроводів для подачі суслу з резервуарів для зберігання суслу (T-1 і T-2) у біореактор (BR-1). Після циркуляції в такому ко-

жусі гліколь повертали в основну трасу пілотного пивоварного заводу для виготовлення невеликих партій пива і потім повертали на завод у Лондоні, як правило, при температурі - 15°C і тиску 40фунтів/кв. дюйм.

5.3 Протокол стерилізації біореактора

Біореактор (BR-1) заповнювали 2об.%-ним розчином Diversol® CX/A (фірма DiversyLever, Канада), дезинфікуючої поверхнево-активної речовини, і витримували протягом ночі при розпиленні газу. Потім реактор спорожняли і промивали холодною водою. Цей цикл промивання з використанням дезинфікуючого розчину і води повторювали два рази. Для підготовки біореактора до стерилізації за допомогою пари від'єднували трубопроводи, що подають сусло і газ. Трубопровід, що подає пар, приєднували до впускного отвору біореактора і відкривали наступні клапани: впускний і продувний клапани біореактора (V-7, V-6), клапан для впуску газу (V-17), клапани для випуску продукту (V-9, V-11), мембранні клапани для відбору зразків (V-8, V-10) і дренажний порт резервуару для збору (V-12). Потім повільно відкривали клапан подачі пари з заводської траси і клапани біореактора регулювали таким чином, щоб на виході кожного зовнішнього отвору з'являвся струмок пари. Після 60-хвилинної обробки паром усі зовнішні клапани біореактора закривали (V-17, V-8, V-10, V-12) за винятком клапана для перепуску суслу (V-6). Після закриття клапана подачі пари закривали клапан для перепуску суслу і до резервуару для збору приєднували стерильний фільтр для запобігання забруднення в результаті попадання нестерильного повітря в систему при її охолодженні. Трубопровід подачі газу в біореактор також знову приєднували до V-17 після відключення трубопроводу подачі пари з заводської траси для того, щоб підтримувати надлишковий тиск при охолодженні системи.

5.4 Запуск системи бродиння

Пивне сусло, що надходить із заводу, збирали в резервуар високого тиску з нержавіючої сталі об'ємом 20л і витримували в автоклаві протягом 45хв при 100°C. Імобілізовані клітини вносили в асептичних умовах в охолоджене сусло (40об.%). Герметично закритий резервуар транспортували в пілотний завод з виробництва невеликих кількостей пива, де знаходилася біореакторна система. Резервуар об'ємом 20л був оснащений фітингом швидкого з'єднання (фірма Cornelius Anoka, штат Міннесота, США), що приєднували за допомогою затискача до армованого трубопроводу з ПВХ діаметром 3/8" (фірма Cole-Parmer, США). Інший кінець трубопроводу з ПВХ приєднували за допомогою затискача до мембранного клапана (V-8) для відбору зразків, що знаходиться в стінці біореактора. У резервуар об'ємом 20л подавали простерилізований фільтрацією діоксид вуглецю при тиску 10фунтів/кв. дюйм і відкривали оснащений мембраною порт так, щоб суміш, що містить іммобілізовані клітини надходила з резервуару в біореактор, при цьому інокулят не піддавався впливові повітря, що знаходиться зовні. Внутрішні деталі фітингів "швидкого з'єднання" резервуару об'ємом 20л видаляли для того, щоб запобігти закупорці

імобілізованими клітинами при їх переносі в біореактор. Кумулятивне розподілення розмірів часток (нижній розмір) для гранул з каппа-карагінанового гелю приведено на Фіг.5.8. Розрахований середньоарифметичний діаметр часток, D_{pam} , становив 1,252мм, а середній розмір часток по Саутеру (Sauter), D_{psm} , становив 1,17мм. Середній діаметр часток становив 1,255мм. Експериментальні дані і результати розрахунків середнього діаметра часток наведені в додатку 1.

Після інокуляції імобілізованими клітинами біореактор працював у періодичному режимі доти поки концентрації цукру і діацетилю не досягали необхідних значень, що становили менш 3° Плато для питомої ваги і менш 100мкг/л для концентрації діацетилю. Потім систему підготували для роботи в безперервному режимі. Для промивання гарячою водою і стерилізації паром трубопроводу, що подає сусло, відкривали клапани V-2 (або V-4 для T-2), V-5 і V-6, у той час як клапани V-1 (або V-3 для T-2) і V-7 залишалися закритими, ізолюючи трубопровід подачі сусла. Трубопровід подачі сусла промивали гарячою водою з температурою приблизно 80°C, що подавали через V-2 (або V-4 для T-2). Після циклу промивання гарячою водою до цього ж отвору приєднували трубопровід подачі пари з заводу і здійснювали стерилізацію паром трубопроводу подачі сусла як

мінімум протягом 30хв. У той момент часу, коли відключали трубопровід подачі пари, закривали також пропускний клапан (V-6). Після охолодження системи клапан V-2 (або V-4 для T-2) закривали і від'єднували трубопровід подачі пари. Відкривали клапан у резервуарі для сусла, V-1 (або V-3 для T-2), і пропускний клапан (V-6) і включали насос для закачування сусла (P-1). Сусло спускали в каналізаційну трубу через пропускний клапан (V-6) доти, поки конденсат у трубопроводі не був замінений свіжим холодним суслом. У цей момент часу пропускний клапан закривали і відкривали вхідний клапан біореактора, що знаходиться на реакторі, (V-6), починаючи безперервний процес бродіння.

Кожні два тижні здійснювали зміну резервуару, з якого подавали сусло, шляхом підключення до іншого резервуару для зберігання сусла (T-1 і T-2). Після подачі сусла протягом двох тижнів з T-1 виключали насос безперервного підживлення P-1 і закривали клапан (V-5) на вході в біореактор. Потім трубопровід подачі сусла приєднували до другого резервуару для зберігання сусла (T-2) і промивали і стерилізували трубопровід як описано у попередньому розділі. Поновлення безперервного процесу бродіння супроводжувалося дуже невеликим часом простою, який становив менше однієї години.

Таблиця 5.1

Детальний опис елементів, зазначених на блок-схемі на Фіг.5.6; ПТФЕ, поліетрафторетилен; НС, нержавіюча сталь






Елемент	Опис	Розмір	Матеріал конструкції
BR-1	Біореактор	8л нетто	316 НС
T-1	Резервуар для сусла	1600л нетто	316 НС
T-2	Резервуар для сусла	1600л нетто	316 НС
T-3	Резервуар для пива	30л нетто	316 НС
P-1	Насос (шланговий, з перемінною швидкістю) для подачі сусла з T-1 у BR-1	<0,08л/хв	Гнучкий армований НС трубопровід з Norprene®, придатний для подачі харчових продуктів
F-1	Газовий фільтр на виході з T-1	<4 бар	поліпроп., мембрана з ПТФЕ з порами 0,2мкм
F-2	Газовий фільтр на вході в T-1	<2 бар	поліпроп., мембрана з ПТФЕ з порами 0,2мкм
F-3	Газовий фільтр на виході з T-2	<4 бар	поліпроп., мембрана з ПТФЕ з порами 0,2мкм
F-4	Газовий фільтр на вході T-2	<2 бар	поліпроп., мембрана з ПТФЕ з порами 0,2мкм
F-5	Газовий фільтр на вході BR-1	<2 бар	поліпроп., мембрана з ПТФЕ з порами 0,2мкм
F-6	Газовий фільтр на виході з T-3	<2 бар	поліпропілен, РТФЕ-мембрана з порами 0,2
M-1	Контролер масообміну повітря для BR-1	<500 sccm	316 НС, нейлон, Viton® "O"-кільця
R-1	Витратомір для діоксиду вуглецю для T-1	<10 scfh	316 НС, акриловий блок
R-2	Витратомір для діоксиду вуглецю для T-2	<10 scfh	316 НС, акриловий блок
R-3	Витратомір для діоксиду вуглецю для BR-1	<2,5 scfh	316 НС, акриловий блок
PR-1	Регулятор тиску діоксиду вуглецю для T-1 і T-2	<100фунтів/кв дюйм	316 НС
PR-2	Регулятор тиску для діоксиду вуглецю для BR-1	<100фунтів/кв дюйм	316 НС
PR-3	Регулятор тиску повітря для BR-1	<100фунтів/кв дюйм	316 НС
V-1	Клапан (дросельний) для сусла в T-1	1"	316 НС, Viton® сідло
V-2	Клапан (дросельний) для сусла в контурі CIP у T-1	1"	316 НС, Viton® сідло
V-3	Клапан (дросельний) для сусла в T-2	1"	316 НС, Viton® сідло
V-4	Клапан (дросельний) для сусла в контурі CIP у T-2	1"	316 НС, Viton® сідло

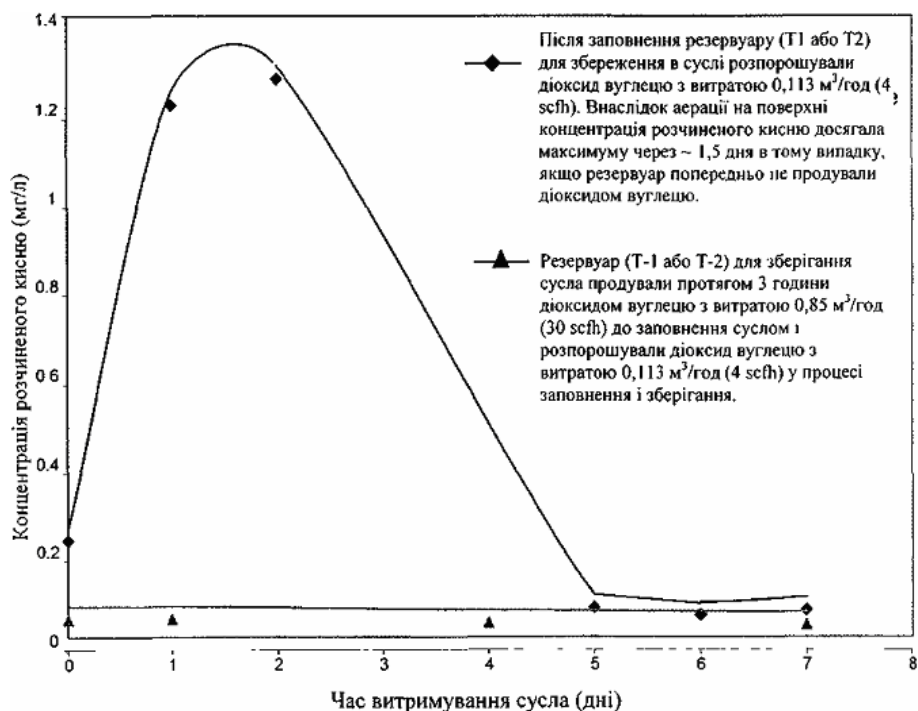
Продовження таблиця 5.1

Докладний опис елементів, зазначених на блок-схемі на Фіг.21

Елемент	Опис	Розмір	Матеріал конструкції
V-5	Клапан (кульовий) для подачі суслу в колекторі	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-6	Пропускний клапан (кульовий) для впуску суслу в BR-1	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-7	Клапан (кульовий) для впуску суслу в BR-1	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-8	Клапан (мембранний) на стінці BR-1	12мм	316 НС, силіконове сідло
V-9	Клапан (дросельний) для випуску пива з BR-1	1"	316 НС, вітонове сідло
V-10	Клапан (мембранний) випуску суслу з BR-1	12мм	316 НС, силіконове сідло
V-11	Клапан (дросельний), вторинний, для випуску пива з BR-1	1"	316 НС, вітонове сідло
V-12	Клапан (кульовий) для випуску рідини з T-3	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-13	Клапан (кульовий) для трубопроводу, що подає діоксид вуглецю в T-1 і T-2	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-14	Клапан (дросельний) для подачі діоксид у вуглецю в T-1	1/2"	316 НС, силіконове сідло
V-15	Клапан (дросельний) для подачі діоксид у вуглецю в T-2	1/2"	316 НС, силіконове сідло
V-16	Клапан (дросельний) для трубопроводу подачі діоксид у вуглецю в BR-1	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-17	Клапан (швидкого спрацювання) для впуску газу в BR-1	1/4"	316 НС, силіконове сідло
V-18	Клапан (кульовий) для трубопроводу подачі повітря в BR-1	1/4"	316 НС, силіконове сідло

Символи, використані на Фіг.21:

-  Гнучкий конектор і муфта
-  Газовий фільтр
-  Регулятор тиску
-  Насос
-  Клапан

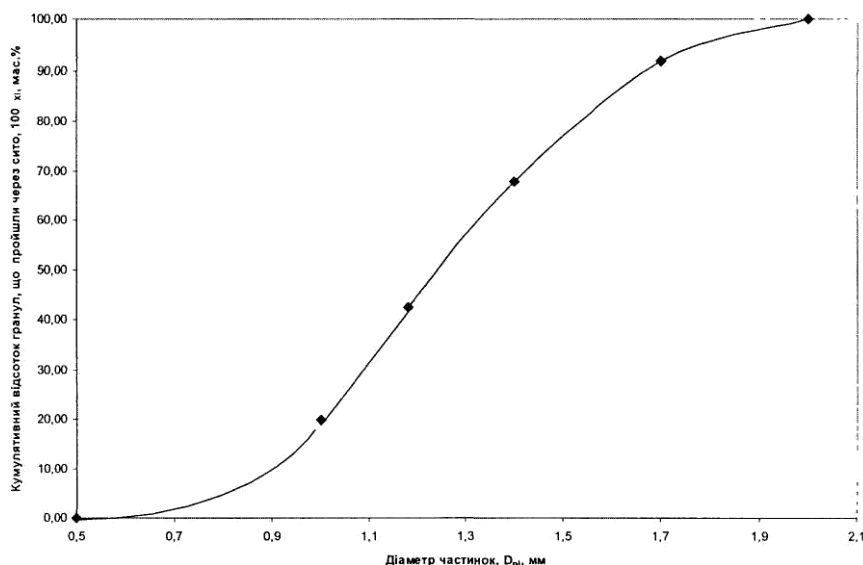


Фіг. 5.7. Залежність концентрації розчиненого кисню в суслі від часу витримування в резервуарі для зберігання суслу (T-1 або T-2) при різних умовах заповнення резервуару.

Таблиця 5.2

Температурний профіль води в резервуарі для зберігання суслу (Т-1 або Т-2) після врівноваження протягом трьох днів без розпилення діоксиду вуглецю і після розпилення протягом 24 годин діоксиду вуглецю з витратою 0,113см³/год

Місце, у якому проводили вимірювання всередині циліндроконічного резервуару	Температура (°C)	
	Без розпилення	З розпиленням
	CO ₂	CO ₂
На 10см нижче поверхні рідини і на відстані 10см від стінки резервуару	20,6	0,4
На 10см нижче поверхні рідини й у центрі резервуару	20,1	0,1
На дні циліндричної частини і на відстані 10см від стінки резервуару	3,8	3,7
На дні циліндричної частини й у центрі резервуару	3,7	4,1
У навколишньому середовищі пілоотної установки	21,4	19,8



Фіг. 5.8. Кумулятивне розподілення розмірів часток для гранул з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані клітини дріжджів (n = 5)

¹Розділ 6. Іммобілізація лагерних пивних дріжджів за допомогою каппа-карагінанового гелю (¹ Версія раздела 6.0 была опубликована [Pilkington и др., 1999]).

Кілька груп вчених вивчали різні типи матриць для фізичного утримання цілих клітин, у тому числі гелі на основі альгінату кальцію [Bejar та ін., 1992; Curin та ін., 1987; Masschelein і Ramos-Jeunehomme, 1985; Nedovic та ін., 1996; Shindo та ін., 1994; White і Portno, 1978], арапозі [Hooijmans та ін., 1990; Lundberg і Kuchel, 1997] і карагінану [Norton та ін., 1995; Wang та ін., 1982]. Карагінан являє собою матеріал, придатний для використання в харчових продуктах, і він є кращим для інкапсуляції клітин завдяки його більш високій механічній міцності в порівнянні з іншими гелями [Buyukgungor, 1992].

У першій частині цієї глави представлені результати моніторингу колонізації дріжджовими клітинами гранул з каппа-карагінанового гелю протягом трьох повторних циклів періодичного бродіння. Досліджували життєздатність іммобілізованих клітин і клітин, що знаходяться в рідкій фазі. Параметри бродіння, включаючи вміст ета-

нолу, мальтози, мальтотриози, фруктози і глюкози, вимірювали при повторних процесах бродіння і потім порівнювали з результатами, отриманими при контрольних бродіннях з використанням тільки вільно суспендованих клітин дріжджів у таких же живильних середовищах.

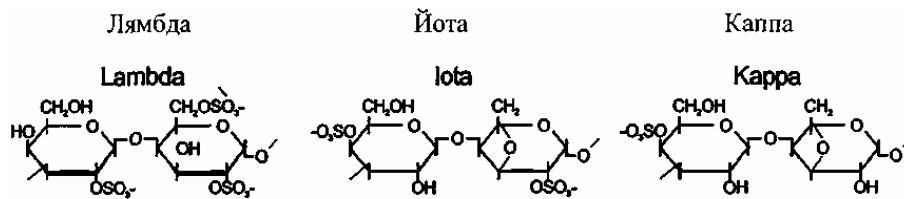
В даний час є лише невелика кількість публікацій, що стосуються фізичного впливу на клітини при тривалій іммобілізації PVirkajarvi і Kronlof, 1998] і безперервній дії зовнішніх стресів і продуктів бродіння. В другій частині даної глави розглядається життєздатність, розподіл популяції клітин і фізичні характеристики клітин дріжджів, іммобілізованих у гранулах з карагінанового гелю, протягом тривалого періоду безперервного процесу бродіння в газліфтному біореакторі. Протягом тривалих періодів часу проводилася також оцінка відносного відсотка дріжджів з респіраторним дефіцитом у популяції іммобілізованих і вільно суспендованих клітин у біореакторі.

Карагінан складається з повторюваних фрагментів 3-6-ангідрогалактози і різні типи карагінану розрізняються кількістю і положенням сульфатних ефірних груп на повторюваних фрагментах

галактози. Схема механізму гелеутворення карагінану представлена на Фіг.22. Якщо карагінан знаходиться в розчиненому стані, то його полісахаридні ланцюги утворюють статистичний клубок. Коли утвориться достатня кількість спіралей для забезпечення зшивання з утворенням безперервної сітки, відбувається гелеутворення. Чим більше спіралей утвориться або чим більше спіралей утворюють агрегати, тим більш міцним і більш твердим стає гель [Rees, 1972].

Лямбда-, йота- і каппа-карагінани являють собою три типи карагінану, які найбільш часто зустрічаються. Як проілюстровано на Фіг.6.2, вони розрізняються вмістом сульфатного ефіру, а вміст сульфатного ефіру впливає на розчинність полісахаридного ланцюга. Лямбда-карагінан є

найбільше сульфованим і в нього відсутня здатність утворювати гель [Marrs, 1998]. Йота-карагінан утворює дуже еластичний слабкий гель у присутності іонів кальцію і не має помітного синерезису. Синерезис виникає в тому випадку, якщо для гелю тенденція до подальшого утворення спіралей або агрегатів настільки сильна, що сітка скорочується, викликаючи виділення рідини (так званий «плач») [Rees, 1972]. Каппа-карагінан є помірно сульфованим і тому утворює більш міцний і більш твердий гель у присутності іонів калію і має певний синерезис. Підвищена міцність гелю, утвореного каппа-карагінаном, робить його кращим з погляду іммобілізації цілих клітин дріжджів.



Фіг. 6.2. Хімічна структура лямбда-, йота- і каппа -карагінанів.

Важливою характеристикою карагінану є його зворотні, в залежності від температури, гелеутворюючі властивості. При охолодженні розчину карагінану в'язкість підвищується і відбувається гелеутворення. При нагріванні розчину в'язкість знижується і карагінан знову переходить у розчинений стан. Контролюючи склад розчину гелеутворюючих катіонів можна змінювати температуру, при якій карагінан трансформується з розчину в гель. Температура гелеутворення каппа-карагінана підвищується при збільшенні концентрації хлориду калію в розчині. Це явище використовували при розробці процесу іммобілізації клітин, оскільки в такий спосіб можна було уникнути значних флуктуацій температури [Neufeld та ін., 1996]. Температуру гелеутворення карагінану можна контролювати таким чином, щоб вона була досить висока для того, щоб він знаходився у вигляді гелю в умовах бродіння, але досить низька для того, щоб клітини дріжджів могли змішуватися з карагінаном у його розчиненому стані без пагубних впливів на життєздатність до здійснення гелеутворення з утворенням гранул.

Проте існує ряд факторів, що свідчать про необхідність проведення подальших досліджень впливу іммобілізації гелевих матриць на метаболізм і фізіологію клітин дріжджів. Іммобілізовані клітини знаходяться не в такому ж мікрооточенні, що і вільні клітини в рідкій фазі, оскільки існують додаткові бар'єри, обумовлені наявністю гелевої матриці й інших захоплених клітин дріжджів, який необхідно перебороти, перш ніж субстрат досягне їхньої поверхні (Фіг.23). Були проведені численні дослідження швидкості масопереносу в гелевих матрицях [Estep та ін., 1992; Hannoun і Stephanopoulos, 1986; Korgel та ін., 1992; Kurosawa та ін., 1989; Merchant та ін., 1987;

Oyaas та ін., 1995; Venancio и Tiexiera, 1997] для кращого розуміння можливих негативних впливів, що може зробити обмеження надходження живильних речовин до іммобілізованих клітин на здатність до зброджування. Ефективні коефіцієнти дифузії невеликих молекул у карагінановому гелі порівняні з коефіцієнтами дифузії тих же молекул у чистій воді і гель дозволяє здійснювати молекулярну дифузію невеликих молекул, таких як глюкоза й етанол. Однак при типовому процесі бродіння з використанням іммобілізованих клітин живильні речовини крім молекулярної дифузії в основному швидко переносяться до гранул з іммобілізованими клітинами шляхом конвекції [Hannoun і Stephanopoulos, 1986]. Після того як живильні речовини досягають гранул, транспорт стає порівняно повільним, оскільки домінує молекулярна дифузія. Це означає, що клітини дріжджів, що знаходяться на периферії гелевих гранул, можуть мати виражені переваги у відношенні надходження живильних речовин у порівнянні з клітинами, що знаходяться в центрі гранул.

Необхідно враховувати також вік іммобілізованих дріжджів. Захоплені клітини при безперервному процесі бродіння старіють протягом декількох місяців і вони можуть здійснювати бродіння у певних псевдостационарних умовах. Однак при періодичному процесі бродіння клітини дріжджів знаходяться в умовах навколишнього середовища, що змінюються з часом, і клітини повторно використовують лише в обмеженій кількості циклів бродіння, після чого їх видаляють. Потрібні додаткові дослідження для вивчення довгострокового впливу безперервного процесу бродіння на життєздатність клітин дріжджів, що зв'язана з продуктивністю процесу бродіння.

У частині А даної глави приведені дані про

дослідження кінетики колонізації дріжджами гранул з каппа-карагінанового гелю протягом трьох повторних циклів періодичного процесу бродіння. При цьому здійснювали моніторинг життєздатності і концентрацій клітин іммобілізованих і вільно суспендованих дріжджів, а також визначали вміст етанолу, градус Плато і концентрацію цукру.

У частині Б вивчені впливи часу бродіння на положення і розподіл клітин у гелевих гранулах і на морфологію клітин дріжджів. Застосовували метод растрової електронної мікроскопії (РЕМ) для дослідження клітин дріжджів, іммобілізованих у каппа-карагінані в різних областях гелевої гранули, у чотири різні моменти часу: 1) відразу після виготовлення гранул; 2) через два дні періодичного процесу бродіння; 3) через два місяці безперервного процесу бродіння в пілотному газліфтному біореакторі; 4) через шість місяців безперервного процесу бродіння в пілотному газліфтному біореакторі. Оцінювали також життєздатність дріжджів і концентрацію як іммобілізованих, так і клітин, що знаходяться в рідкій фазі. Оцінювали також відносний відсоток дріжджів з респіраторним дефіцитом (іммобілізовані і вільні клітини в рідкій фазі) через п'ять місяців безперервного процесу бродіння в газліфтному біореакторі і порівнювали з відсотком, одержаним при використанні традиційного періодичного процесу бродіння пива. У даному дослідженні використовували застосовуваний для промислового виробництва штам лагерних дріжджів.

6.1 Експериментальний метод

Одержання гранул з каппа-карагінанового гелю:

Каппа-карагінановий гель X-0909 був люб'язно наданий фірмою Copenhagen Pectin A/S. Гранули з каппа-карагінанового гелю, що містять захоплені клітини лагерних дріжджів, одержували способом з використанням статичного змішувача при вихідному завантаженні клітин, що становить $2,6 \times 10^7$ клітин/мл гелю [заявка на патент 2133789 (Neufeld та ін., 1996)], при цьому діаметр гранул становив 0,5-2,0 мм.

Середовище, яке зброджують:

Фірма Labatt Breweries of Canada поставляла пивне сусло з питомою вагою 17,5°P, що докладно описано в розділі «Матеріали і методи».

Частина А: Кінетика дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю, при повторюваному періодичному процесі

Бродіння здійснювали в колбах Ерленмейєра об'ємом 2 л при 21°C при струшуванні зі швидкістю 150 об/хв. Завантаження носієм, що являє собою гранули з іммобілізованими клітинами, становила 40 об.%, а загальний об'єм середовища, яке зброджують, становив 1 л. Кожен цикл бродіння здійснювали протягом 7 днів. У циклі R1 свіжі гранули з іммобілізованими клітинами вносили в сусло і після закінчення бродіння ці гранули відокремлювали від середовища, яке зброджували, пропускаючи суміш через стерильне сито з нержавіючої сталі (розмір отворів 500 мкм). Потім гранули повторно вносили в тій же пропорції у свіже стерилізоване сусло для здійснення другого (R2) і третього (R3) циклів періодичного бродіння. Відбір зразків здійснювали двічі в день

протягом перших трьох днів, а потім один раз у день на четвертий і п'ятий дні для кожного циклу бродіння. Досліди з бродіння проводили в двох або трьох повторностях. Всі досліди з бродіння проводили, використовуючи як контроль процеси бродіння за допомогою вільно суспендованих клітин, які здійснювали в тих же умовах за винятком того, що вільні клітини вносили в середовище, яке зброджують, в концентрації 4 г/л. Проводили аналіз зразків для визначення життєздатності і концентрації вільних і іммобілізованих клітин і концентрації вуглеводів, що знаходяться в рідкій фазі, і етанолу.

Коефіцієнти виходу, $Y_{P/S}$, етанолу, виробленого із субстратної, повністю зароджуваної, глюкози розраховували за допомогою рівняння 3.20 для трьох циклів бродіння з використанням іммобілізованих клітин і для контрольного варіанта з використанням вільних клітин. Для усіх варіантів бродіння коефіцієнти виходу розраховували починаючи з моменту початку бродіння до того часу, коли завершувалося поглинання мальтози.

Продуктивність реактора з погляду одержання етанолу, $V_{\text{етанол}}$, що являє собою кількість одержаного етанолу, поділена на загальний робочий об'єм біореактора і на час бродіння, розраховували за допомогою рівняння 3.25 для R1, R2 і R3 і для контрольного варіанта з використанням вільних клітин від моменту початку бродіння до того часу, коли завершувалося поглинання мальтози. Як для коефіцієнтів виходу, так і для продуктивності з погляду одержання етанолу, варіанти з використанням іммобілізованих клітин і вільно суспендованих клітин не відрізнялися один від одного.

Локальну максимальну відносну швидкість росту, μ , і час подвоєння кількості клітин розраховували для усереднених даних для контролю, одержаних з використанням вільних клітин, за допомогою рівнянь 3.3 і 3.4.

Частина Б: Життєздатність і морфологічні характеристики іммобілізованих дріжджів протягом тривалого періоду бродіння

Умови періодичного процесу бродіння:

Досліди з вивчення періодичного процесу бродіння проводили в колбах Ерленмейєра об'ємом 2 л при 21°C при струшуванні зі швидкістю 150 об/хв. Завантаження носієм становило 40 об.%, а загальний об'єм середовища, яке зброджують, становив 1 л.

Умови для безперервного процесу бродіння:

Для вивчення безперервного процесу бродіння використовували пілотні газліфти біореактори з трубою для відсмоктування. Всі дані одержували з використанням біореактора з робочим об'ємом 8 л за винятком мікрофотографій, які одержували за допомогою сканування протягом 2 місяців у біореакторі об'ємом 50 л із застосуванням такого ж середовища, яке зброджують, і методу іммобілізації. Гранули з іммобілізованими клітинами (40 об.%) піддавали псевдозрідженню в біореакторах за допомогою суміші повітря і діоксиду вуглецю. Біореактори функціонували при різних умовах, при цьому температуру бродіння встановлювали на рівні 12, 17 і 22°C, а час перебування в біореакторі становив від 0,9 до 1,8

днів. В експерименті, який проводили протягом 6 місяців, максимальна концентрація етанолу в газліфтному реакторі досягала 73 кг/м^3 , при цьому середня концентрація дорівнювала 58 кг/м^3 .

Мікробіологічний аналіз:

З рідкої фази газліфтного біореактора щонайменше один раз на тиждень відбирали зразки для тестування відносно різних видів забруднень, включаючи дріжджі дикого типу, дріжджі не лагерного типу й аеробні й анаеробні бактерії, що приводять до псування пива. Через п'ять місяців клітини дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, аналізували в двох повторностях для виявлення мутацій, що обумовлюють респіраторний дефіцит.

Растрова електронна мікроскопія (РЕМ):

Гранули з каппа-карагінанового гелю (діаметром 1,0-1,5 мм), що містять іммобілізовані клітини лагерних дріжджів, відбирали для аналізу за допомогою РЕМ у чотири різні моменти часу: 1) після виготовлення гранул, що містять іммобілізовані клітини і до інокуляції гранул у середовище, яке зброджують; 2) через 2 дні періодичного процесу бродіння; 3) через 2 місяці безперервного процесу бродіння в пілотному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування; 4) через 6 місяців безперервного процесу бродіння в пілотному газліфтному біореакторі з трубою для відсмоктування. Метод проведення РЕМ-аналізу і готування відповідних зразків описані в розділі 4.7.

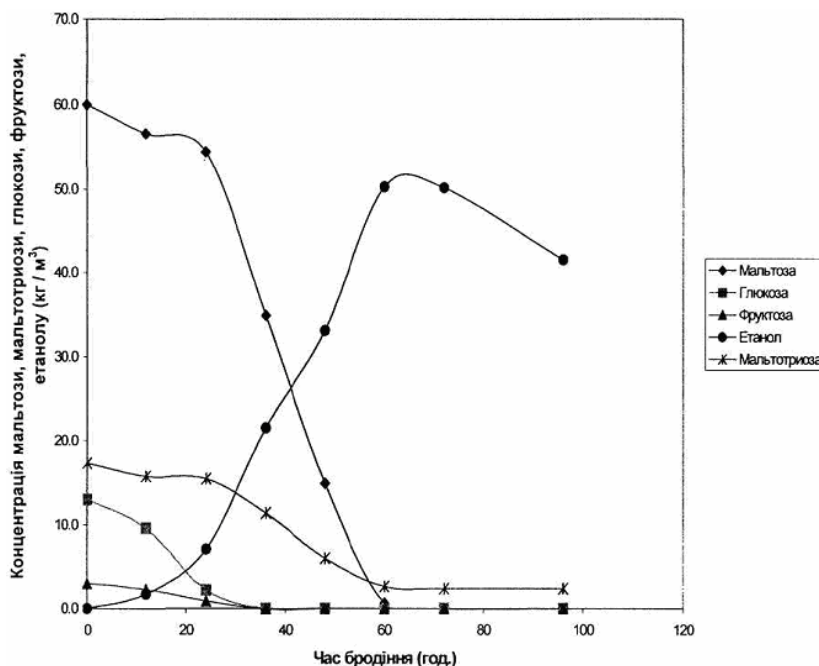
За допомогою методів, описаних у розділі 4.6, оцінювали концентрацію і життєздатність клітин (іммобілізованих і вільно суспендованих) у ті ж моменти часу, коли проводили РЕМ-аналізи.

6.2 Результати й обговорення

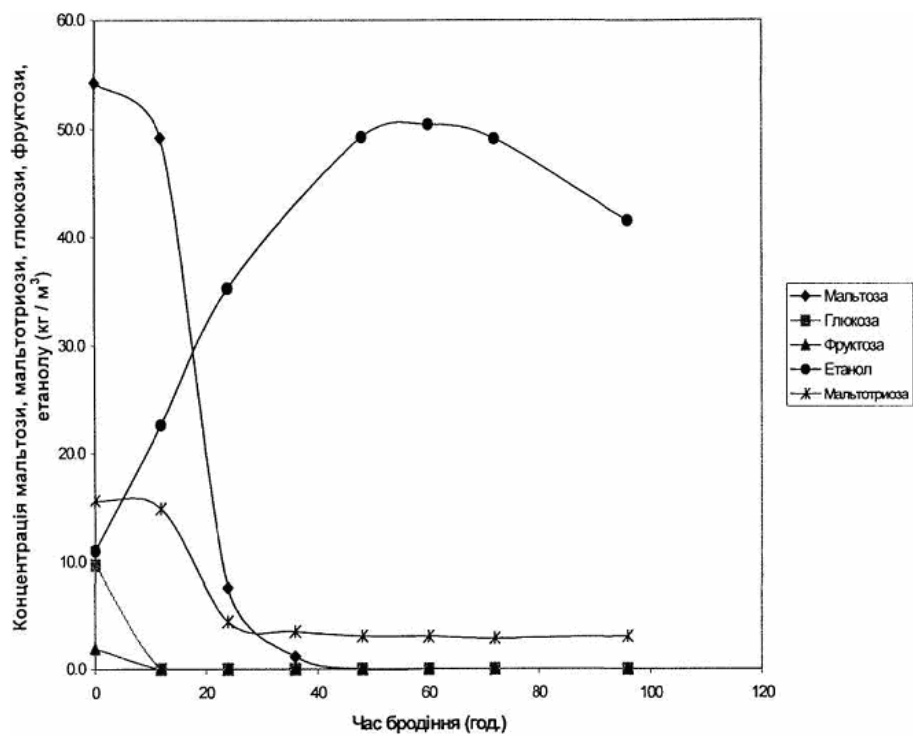
Частина А: Кінетика повторного процесу бро-

діння дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю

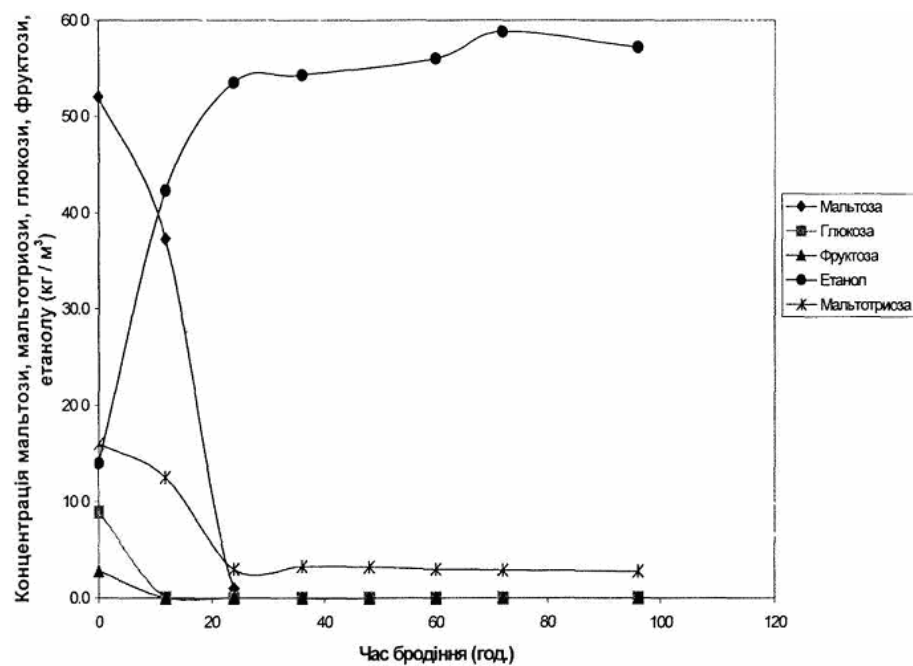
Час бродіння істотно зменшувався щоразу після повторного внесення іммобілізованих клітин у свіже сусло, як це проілюстровано на Фіг.6.4(а), (б) і (в), де приведені залежності вмісту мальтози, мальтотриози, глюкози, фруктози й етанолу від часу бродіння для трьох повторних циклів періодичного бродіння. З даних, приведених на цих кресленнях, випливає, що час, необхідний для повного поглинання цукру, становив 64 години для R1, 44 годин для R2 і 26 годин для R3. Дані, наведені на Фіг.6.5, свідчать про те, що при контрольному бродінні з використанням вільно суспендованих клітин без гранул з іммобілізованими клітинами для повного поглинання цукру було потрібно 82 години. З графіків, наведених на Фіг.6.4, випливає, що найбільш висока кінцева концентрація етанолу досягалася в останньому з трьох повторних циклів бродіння партій з використанням іммобілізованих клітин. Оскільки каппа-карагінан являє собою гідрогель, то деяка кількість етанолу переносилася разом із гранулами, коли їх повторно вносили у свіже сусло. Внаслідок цього у вихідний момент часу (нуль) для R2 і R3 у рідині, яку зброджують, була присутня деяка кількість етанолу і початкові концентрації глюкози, мальтози, мальтотриози і фруктози у випадку бродіння з використанням іммобілізованих клітин (Фіг.6.4) були менше, ніж у випадку контрольного бродіння з використанням вільних клітин (Фіг.6.5). Тому для зазначених варіантів бродіння розраховували коефіцієнти виходу, так що можна було аналізувати шляхом порівняння виходу продукту, що представляють собою кількість етанолу, що утворився, (у г) на 1г поглиненого цукру.



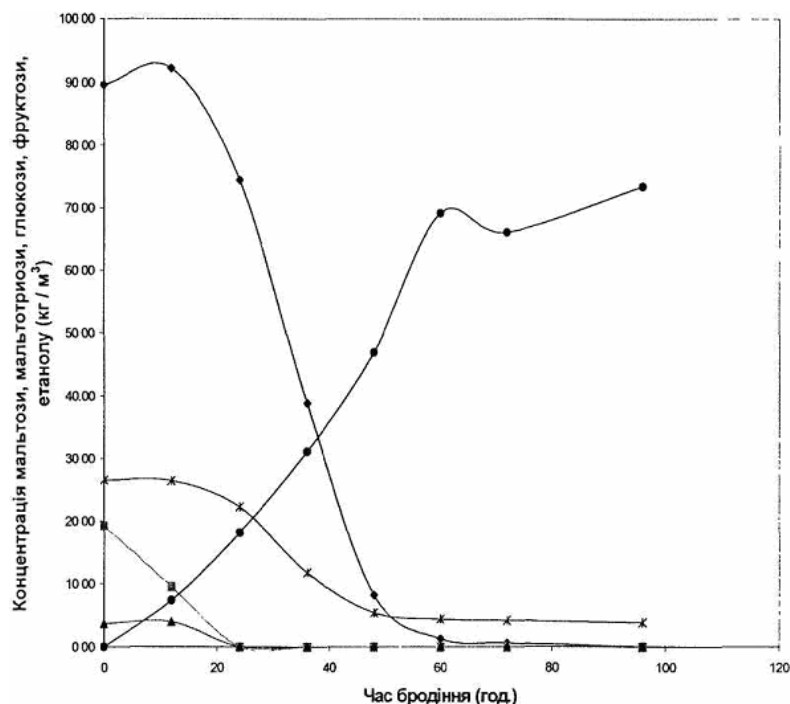
Фіг. 6.4. а) Варіант R1, залежність концентрацій мальтози, мальтотриози, глюкози, фруктози й етанолу від часу бродіння при повторних періодичних бродіннях з використанням клітин лагерних дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю.



Фіг. 6.4. б) Варіант R2, залежність концентрацій мальтози, мальотриози, глюкози, фруктози й етанолу від часу бродіння при повторних періодичних бродіннях з використанням клітин лагерних дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю.



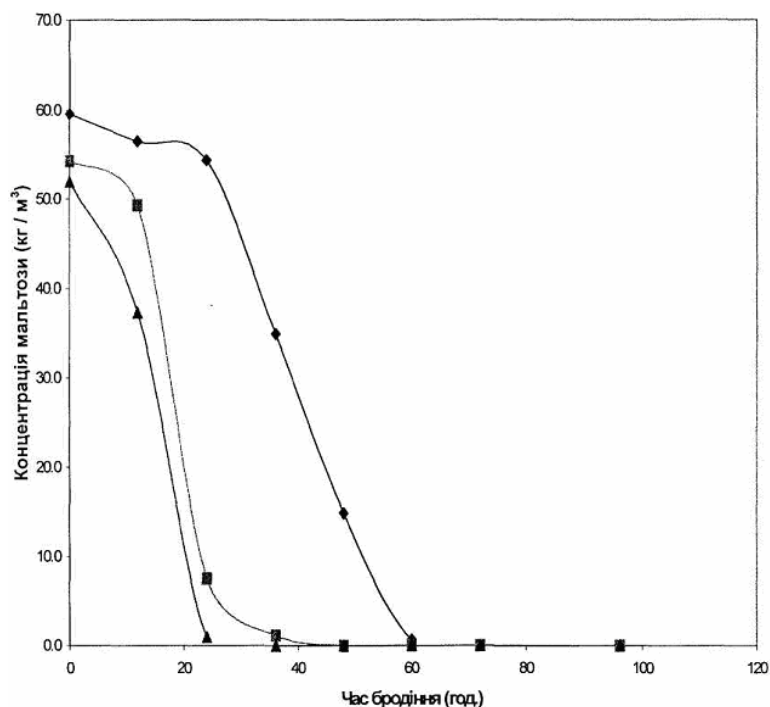
Фіг. 6.4. в) Варіант R3, залежність концентрацій мальтози, мальотриози, глюкози, фруктози й етанолу від часу бродіння при повторних періодичних бродіннях з використанням клітин лагерних дріжджів.



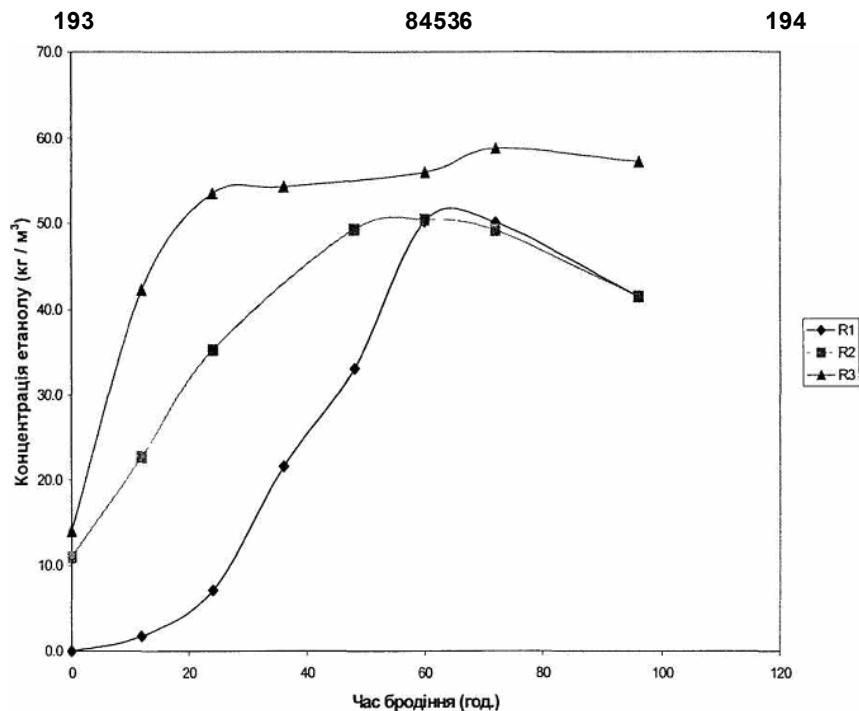
Фіг. 6.5. Залежність концентрацій мальтози, мальтотриози, глюкози, фруктози й етанолу від часу бродіння при контрольному бродінні з використанням вільно суспендованих лагерних дріжджів (що не містять іммобілізованих клітин).

На Фіг.6.6(а) і (б) представлено порівняння залежностей концентрацій мальтози й етанолу від часу бродіння для варіантів R1, R2 і R3. При повторному циклі R1 клітини дріжджів поглинали мальтозу практично відразу після їх внесення у свіже сусло. Концентрації етанолу при повторному циклі R1 швидше досягали свого піка, при цьому концентрації були більш високими, ніж при

двох перших процесах бродіння партій. Як впливає з графіків, наведених на Фіг.6.6(б), початкове запізнювання виробництва етанолу в циклі R1 істотно зменшувалося, коли ці іммобілізовані клітини повторно застосовували в циклі R2, і зменшувалося ще більше після повторного застосування в циклі R3.



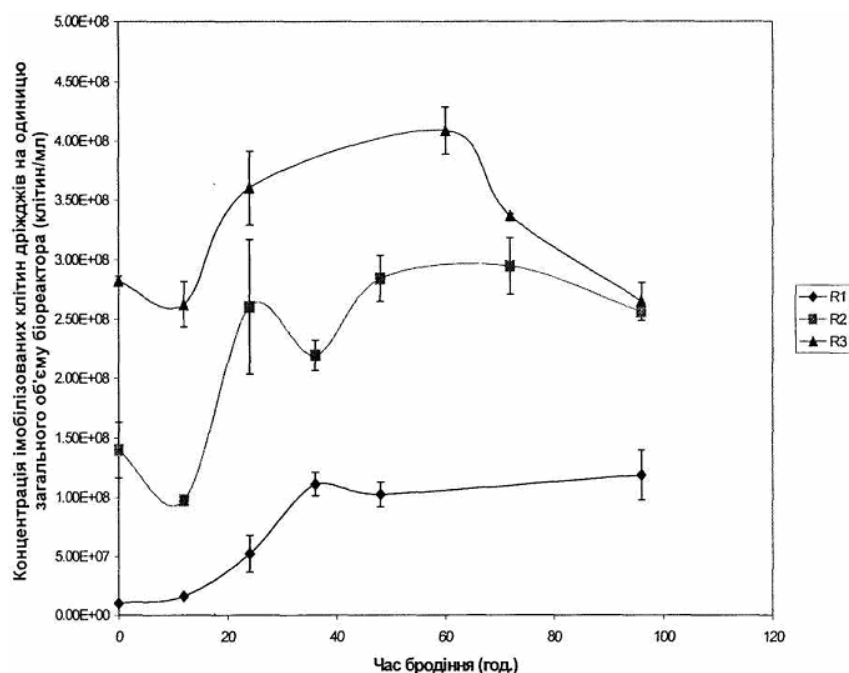
Фіг. 6.6. а) Залежність концентрації мальтози від часу бродіння при повторних процесах бродіння партій, R1, R2 і R3, з використанням клітин лагерних дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю.



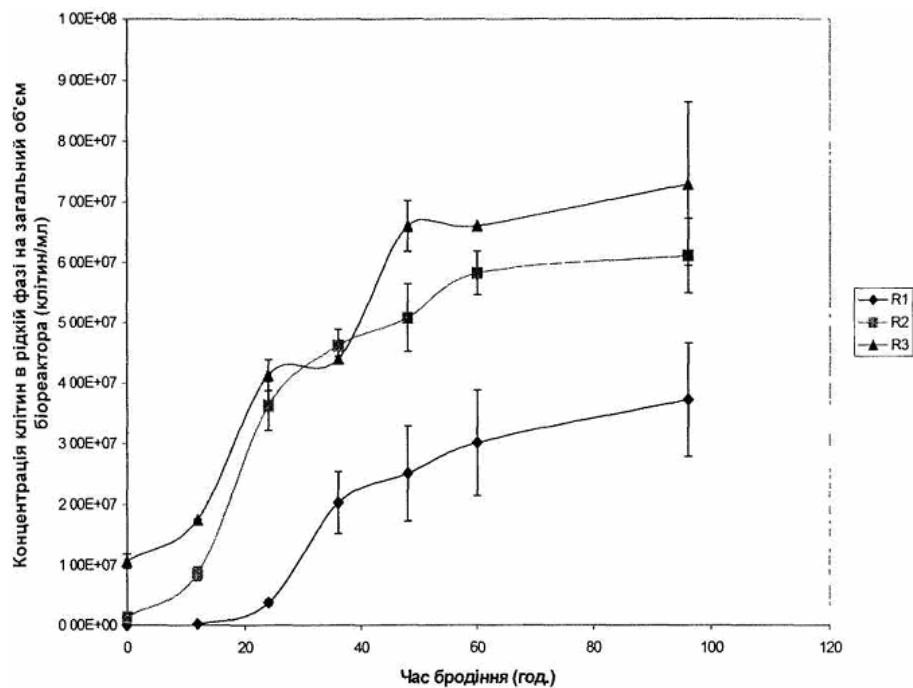
Фіг. 6.6. б) Залежність концентрації етанолу від часу бродіння при повторних процесах бродіння партій, R1, R2 і R3, з використанням клітин лагерних дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю.

На Фіг.6.7(а) представлена залежність концентрації іммобілізованих клітин, яка поділена на повний об'єм біореактора, від часу бродіння для R1, R2 і R3. Залежність вивільнення вільних клітин з іммобілізуючої клітини матриці в загальну рідку фазу від часу бродіння, отримана в цих варіантах бродіння, приведена на Фіг.6.7(б). На Фіг.6.7(в) представлений загальний вміст іммобілізованих і вільних клітин, поділений на загальний об'єм реактора, для трьох партій. На Фіг.6.7(а) видно, що для R1 концентрація іммобілізованих клітин у каппа-карагінановому гелі про-

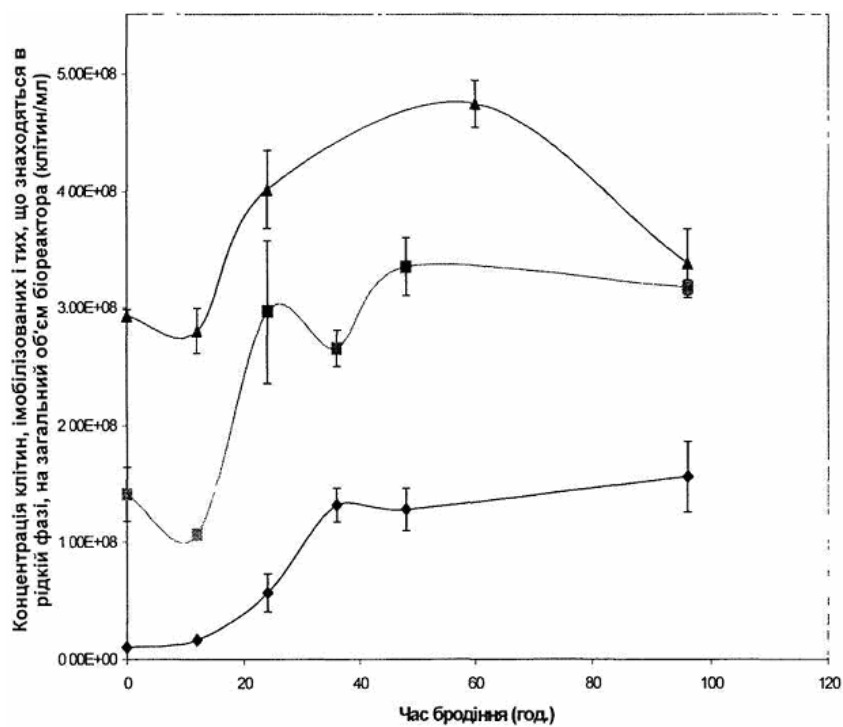
довжує зростати після початкової інокуляції в сусло. Якщо гранули повторно вносили у свіже сусло для повторного циклу R2, всередині гелевих гранул продовжувався ріст клітин. Після третього внесення інкапсульованих клітин у свіже сусло швидкість збільшення концентрації іммобілізованих клітин знижувалася. Профіль концентрації вільних клітин, що вивільнилися з матриці каппа-карагінанового гелю в загальну рідку фазу, іммобілізованих клітин і загальної кількості клітин у циклі бродіння R1 представлений на Фіг.6.8.



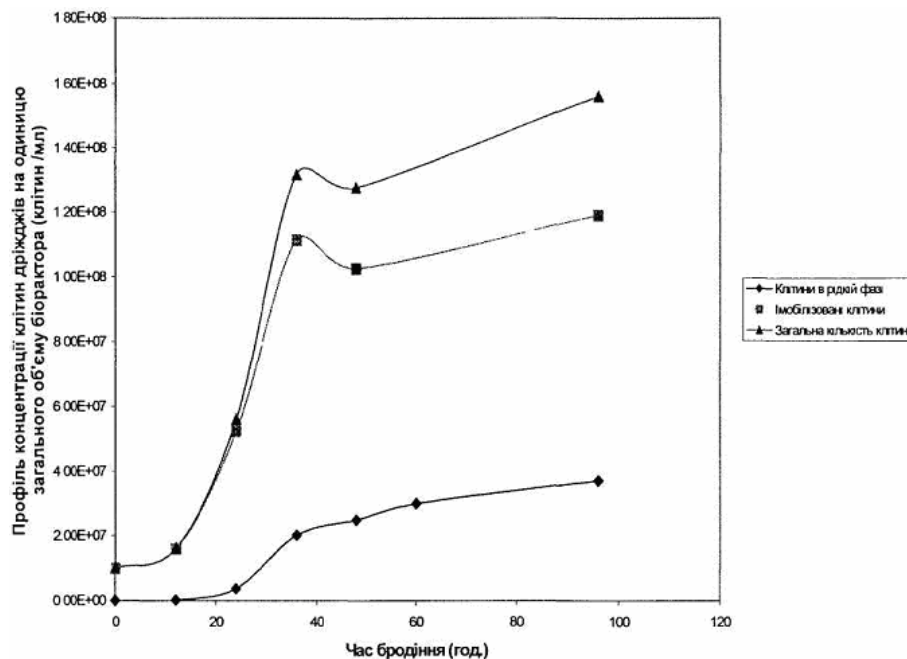
Фіг. 6.7. а) Залежність середньої концентрації іммобілізованих клітин дріжджів у перерахунку на загальний об'єм біореактора від часу бродіння для циклів бродіння R1, R2 і R3. «Вуса» позначають верхні і нижні межі експериментальних даних ($n=2$).



Фіг. 6.7. б) Залежність концентрації клітин лагерних дріжджів, що вивільнилися в загальну рідку фазу, у перерахунку на повний об'єм біореактора від часу бродіння для циклів бродіння R1, R2 і R3. «Вуса» позначають верхні і нижні межі експериментальних 5 даних ($n=2$).



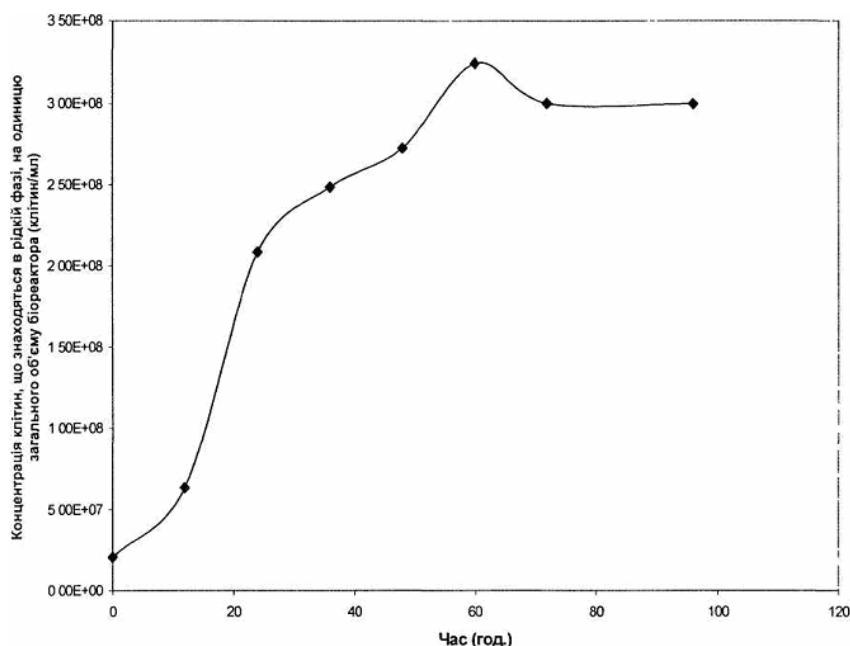
Фіг. 6.7. в) Залежність загальної концентрації клітин лагерних дріжджів (імобілізованих і тих, що знаходяться в рідкій фазі) у перерахунку на загальний об'єм біореактора від часу бродіння для циклів бродіння R1, R2 і R3. «Вуса» позначають верхні і нижні межі експериментальних даних ($n=2$).



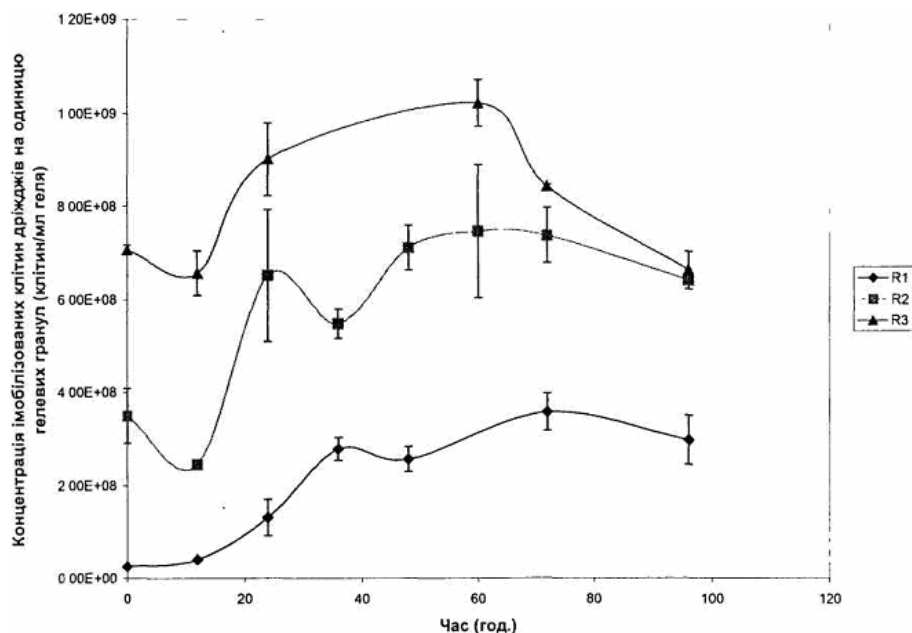
Фіг. 6.8. Залежність профілю концентрації іммобілізованих клітин, клітин, які знаходяться в рідкій фазі, і всіх клітин (іммобілізованих і таких, які знаходяться в рідкій фазі) від часу бродіння для R1, першої з трьох повторних стадій періодичного процесу бродіння з використанням клітин лагерних дріжджів, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю.

У циклі R1 концентрація іммобілізованих клітин у гранулі з каппа-карагінанового гелю зростала з такою ж швидкістю, що і при контрольному бродінні, при якому використовували тільки клітини, які знаходяться в рідкій фазі. Це підтверджувалося порівнянням залежності середнього росту вільних клітин при контрольному бродінні, представленої на Фіг.6.9, з аналогічною залежністю росту іммобілізованих у карагінані клітин, одержаної в циклі R1 (Фіг.6.10). У циклі R1 гелеві гранули були ще не повністю колонізовані і, оче-

видно, гелева матриця не справляла інгібуючого впливу на ріст клітин дріжджів, які знаходяться в гранулах. У циклі R2 матриця, очевидно, обмежувала ріст клітин, які знаходяться всередині гелевої гранули, про що свідчить менш інтенсивне збільшення кількості клітин протягом даного циклу бродіння. Це може бути обумовлено природою гелю або нагромадженням клітин дріжджів всередині гранул, або недостатнім надходженням живильних речовин до клітин.



Фіг. 6.9. Залежність середньої концентрації вільно суспендованих клітин лагерних дріжджів у перерахунку на загальний об'єм біореактора ($n=3$) від часу бродіння для варіанта контрольного бродіння. У цих варіантах бродіння іммобілізовані клітини були відсутні.



Фіг. 6.10. Залежність концентрації лагерних дріжджів у 1мл гелевих гранул від часу бродіння для стадій бродіння R1, R2 і R3. «Вуса» позначають верхні і нижні межі експериментальних даних (n=2).

У таблиці 6.1 представлені дані про виходи етанолу, $Y_{P/S}$, одержані з використанням як субстрату цукрів, які зброджують, для трьох стадій періодичного процесу бродіння і контрольного варіанта. У таблиці 6.2 приведені також характеристики об'ємної продуктивності біореактора для виробництва етанолу, розраховані на основі даних, представлених у таблиці 6.1. Виходи етанолу в результаті зброджування цукрів для всіх варіантів процесів бродіння незначно відрізнялися один від одного або від контролю. Всі виходи були вище 90% від теоретичного виходу, розрахованого на основі рівняння Гей-Люссака, що становив 0,51. Як зазначалося вище, внаслідок виробництва біомаси й інших побічних продуктів, що виробляються клітинами дріжджів, не вдається досягти ефективності вище 95% від теоретичної [Hardwick, 1995]. Об'ємна продуктивність біореактора по відношенню до виробництва етанолу в дослідях з використанням трьох повторних процесів бродіння партій при кожному завантаженні істотно відрізнялася від продуктивності при повторному завантаженні. Виробництво етанолу зростало з кожним циклом повторного періодичного процесу бродіння й у циклі R3 іммобілізовані клітини мали більшу продуктивність, ніж у випадку контрольного бродіння. Загальна кількість етанолу, виробленого в циклі R2, несуттєво перевищувала кількість, вироблену в циклі R1, однак тривалість бродіння була більш ніж у два рази менша, ніж час бродіння в циклі R1 і при контрольному бродінні. Існує багато факторів, які мо-

жуть сприяти підвищенню швидкості бродіння при кожному повторному завантаженні з використанням іммобілізованих клітин, такі, як адаптація клітин дріжджів до умов бродіння і постійно зростаюча концентрація клітин. Загальна кількість клітин на одиницю об'єму біореактора ставала істотно більш високою, ніж у контролі, тільки в циклі R3. З представленої на Фіг.6.7(б) залежності концентрації вільно суспендованих клітин (що вивільнилися з гелевої матриці) у загальному об'ємі рідини від часу бродіння випливає, що кількість клітин, що вивільнилися з гелевих гранул, зростає на кожній наступній стадії періодичного процесу. В міру підвищення ступеня заповнення гранул клітинами дріжджів, очевидно, усе більша кількість клітин вивільняється в загальну рідину фазу. Husken і ін. (1996) провели дослідження, у яких вивчали експансію колонії клітин мікроорганізмів і викид/вивільнення клітин з каппа-карагінанових гелевих матриць. Vives і ін. (1993) опублікували дані про те, що вони одержали максимальну концентрацію клітин дріжджів у гранулах з каппа-карагінанового гелю, що становить 10^9 клітин на 1г гелю, яка відповідає концентрації в гелевих частках, що одержували в циклі R2. Аналогічні максимальні концентрації клітин були одержані при безперервному процесі бродіння, описаному в частині Б. Однак, слід зазначити, що максимальні величини завантаження гелевої матриці клітинами можуть залежати від вихідного завантаження клітинами, складу гелю та інших факторів.

Таблиця 6.1

Вихід, $Y_{P/S}$, продукту, P, що являє собою етанол, який утвориться із субстратів, глюкози (Glc), фруктози (Frc), мальтози (Mal) і мальтотриози (DP3) для R1, R2, R3 і контрольне бродіння з використанням вільно суспендованих клітин

Періодичний процес	t_f^*	t_0	Glc _f	Frc _f	Mal _f	DP3 _f	P _f	Glc ₀	Frc ₀	Mal ₀	DP3 ₀	P ₀	$Y_{P/S}$
Бродіння	(год.)		(кг/м ³)										
R1	64,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	50,1	13,0	3,0	60,0	17,4	0,0	0,5
R2	44,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	49,0	9,7	2,0	54,3	15,7	11,0	0,5
R3	26,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	54,0	8,9	2,8	52,0	16,0	14,0	0,5
Вільні клітини, контроль	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

* Символ t_f являє собою час (у год.), необхідний для завершення поглинання мальтози, а нижній індекс 1 являє собою, що концентрації розглянутих компонентів вимірювали в даний момент часу, $t = t_f$.

Таблиця 6.2

Порівняння продуктивності біореактора у відношенні виробництва етанолу [$V_{\text{етанол}} = (\text{кг виробленого етанолу}) / (\text{м}^3 \text{ об'єму біореактора} \cdot \text{год.})$] при періодичному процесі бродіння з використанням іммобілізованих клітин (R1, R2 і R3) із продуктивністю при періодичному процесі бродіння з використанням вільних суспендованих клітин

Бродіння	$V_{\text{етанол}} \text{ (кг/м}^3 \text{ год.)}^*$
R1	0,470
R2	0,668
R3	1,246
Вільні клітини, контроль	0,805

* розраховано після завершення поглинання мальтози.

Ще одним фактором, що впливає на підвищення об'ємної продуктивності біореактора при кожному наступному циклі періодичного процесу бродіння, є адаптація клітин дріжджів. До кінця першого циклу бродіння клітини дріжджів адаптують механізм свого метаболізму до конкретних умов бродіння. Це може приводити до зменшення фази запізнювання на початку наступного циклу бродіння, збільшуючи тим самим швидкість бродіння. У даному дослідженні всі контрольні досліди з бродіння проводили з використанням свіжоприготовлених лагерних дріжджів. Викликає інтерес провести досліди з використанням повторного внесення вільно суспендованих контрольних дріжджів поряд з повторним внесенням іммобілізованих клітин для подальшої оцінки такого впливу в порівнянні з впливами, викликаними зміною концентрації клітин.

Дані, приведені на Фіг.6.11, свідчать про те, що життєздатність іммобілізованих клітин, яку оцінювали за допомогою методу на основі барвника метиленового синього, як індикатора, була низкою (<50%), коли іммобілізовані клітини спочатку вносили в сусло в циклі R1, однак після бродіння протягом 48 годин життєздатність іммобілізованих клітин перевищувала 90%. Клітини дріжджів швидко колонізували гранули і життєздатність зберігалася на високому рівні в циклі R3. Однак при повторенні циклу R3 життєздатність злегка зменшувалася до моменту закінчення бродіння. При цьому у всіх трьох повторних

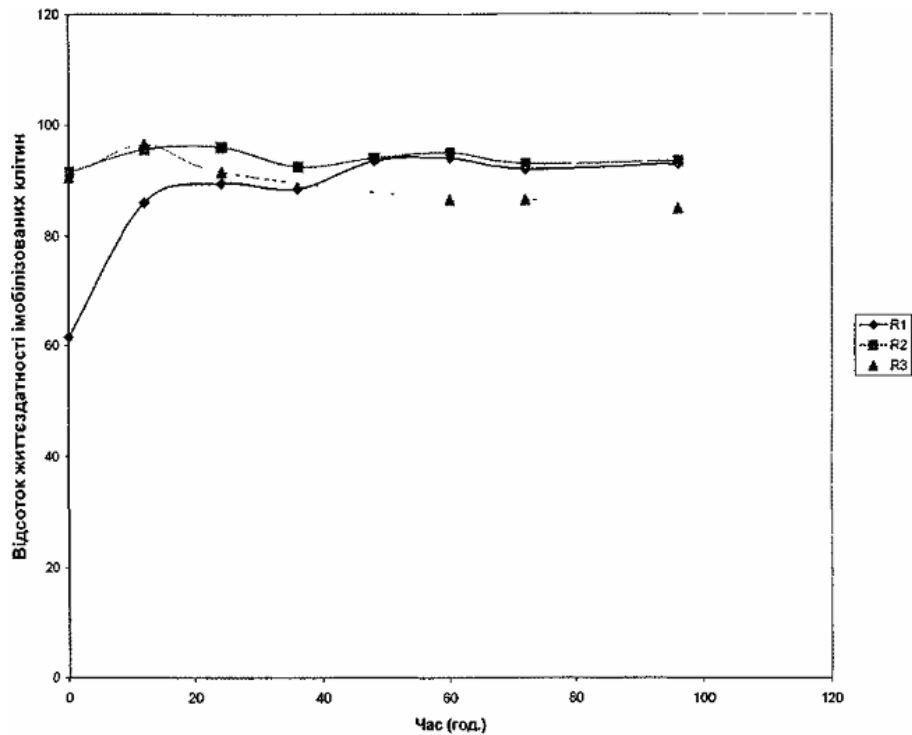
процесах бродіння вільні клітини, що вивільнилися в основне рідке середовище, мали більшу життєздатність, ніж їх іммобілізовані копії. Іммобілізуюча матриця може впливати на життєздатність клітин дріжджів (обмеження масопереносу і/або просторові обмеження), або може бути, що з іммобілізуючої матриці вивільняються в основне рідке середовище в основному життєздатні клітини, а не клітини, що мають низьку життєздатність.

На основі середніх значень, одержаних за результатами трьох незалежних контрольних дослідів з бродіння при використанні вільно суспендованих дріжджів, що представлені в додатку 1, була побудована залежність $\ln(X/X_0)$ від часу бродіння, приведена на Фіг.6.12. Нахил являє собою локальну максимальну питому швидкість росту клітин при 21°C у пивному суслі при струшуванні із швидкістю 150 об./хв. Було встановлено, що локальна максимальна питома швидкість росту дріжджів становила 0,096 год.⁻¹, а час подвоєння кількості клітин становив 7,22 год. Величина $j_{\text{ітах}}$, отримана в даній роботі, позначена як локальна цтах, оскільки, як це було відзначено в розділі, присвяченому теорії, дійсне значення цтах, що фігурує в рівнянні Монода (Monod), може бути досягнуто тільки в тому випадку, коли S істотно перевищує константу Монода, K_s .

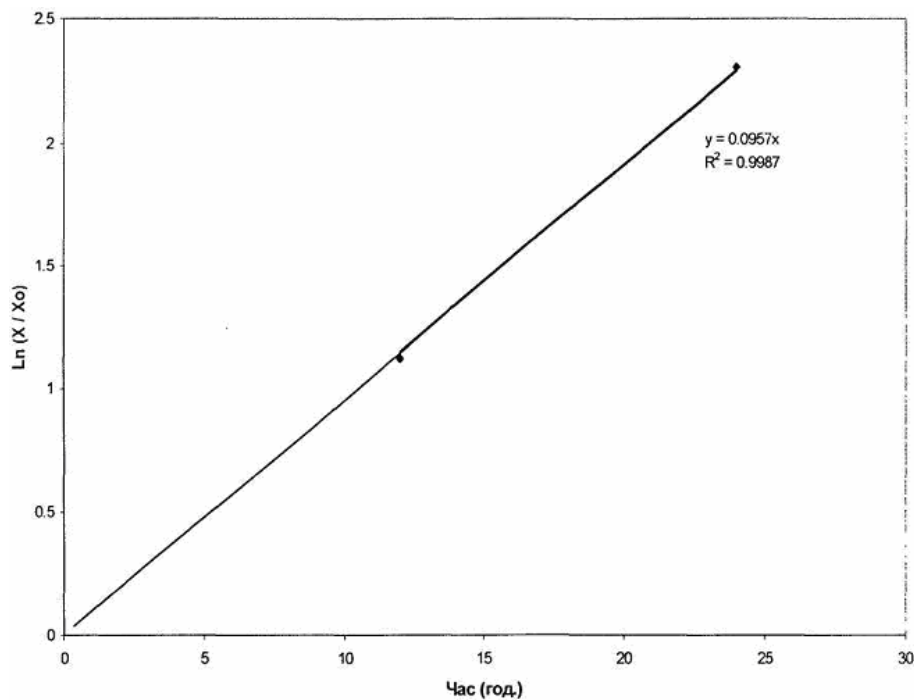
Необхідне проведення подальших робіт для оцінки константи Монода, K_s , що лімітує субстрату в таких дослідах з бродіння, для того, щоб підтвердити, що розраховане локальне значення

μ_{\max} являло собою дійсне максимальне значення,

яке визначається рівнянням Монода.



Фіг. 6.11. Залежність життєздатності іммобілізованих клітин лагерних дріжджів (оцінена з використанням метиленового синього) від часу бродіння для циклів бродіння R1, R2 і R3.



Фіг. 6.12. Залежність $\ln(X/X_0)$ від часу бродіння протягом фази експонентного росту, розрахована на основі середніх значень, одержаних у досліді з бродіння при використанні вільно суспендованих дріжджів, де X являє собою концентрацію клітин у момент часу t , а X_0 являє собою концентрацію клітин у момент часу $t=0$ ($n=3$).

Частина Б: Життєздатність і морфологічні характеристики іммобілізованих дріжджів протягом тривалого періоду бродіння

Перед внесенням гелевих гранул у середовище, яке зброджують, і здійсненням наступного

процесу виробництва за допомогою статичного змішувача з використанням гранул з іммобілізованими клітинами концентрація клітин становила 2.6×10^7 клітин/мл гелевих гранул (див. таблицю 6.3, де приведені середні значення для двох зра-

зків). Зображення, одержані за допомогою РЕМ, показали, що клітини були відділені одна від од-

ної і рівномірно розподілені в гелевій гранулі (Фіг.24).

Таблиця 6.3

Залежність життєздатності (оцінка за допомогою метиленового синього) і концентрації вільно суспендованих і іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю клітин лагерних дріжджів від часу бродіння

Час	Процес бродіння	Вільні суспендовані дріжджі, які знаходяться в рідкій фазі		Іммобілізовані дріжджі в гелевій фазі	
		Життєздатність (%)	Концентрація клітин (клітин/мл рідини)	Життєздатність (%)	Концентрація клітин (клітин/мл гелю)
0	н/в	н/в	н/в	н/в	2,6E+07
2 дні	періодичний	98	5,5E+07	92	2,35E+08
2 місяці	безперервний	93	2,35E+08	76	8,60E+08
6 місяців	безперервний	92	2,11E+08	<50*	1,40E+09*

* На основі даних, одержаних з використанням одного зразка.

Після періодичного процесу бродіння протягом 2 днів життєздатність становила >90%, а концентрація клітин у гелевій гранулі зростала в десять разів (таблиця 6.3). Клітини (з життєздатністю >90%) починали також вивільнятися з гелю в загальну рідку фазу суміші, яка зброджується, досягаючи концентрації 10^9 клітин/мл рідкого середовища. Всередині гелевих гранул відбувалося утворення невеликих колоній дріжджів, при цьому на окремих клітинах можна було побачити брунькові перегородки (див. Фіг.25).

Життєздатність іммобілізованих клітин дріжджів знижувалася після безперервного процесу бродіння протягом 2 місяців у газліфтному біореакторі (таблиця 6.3), однак клітини, що знаходяться в основній рідкій фазі, зберігали високу життєздатність (>90%), і ці дані підтверджувалися при проведенні декількох незалежних дослідів з використанням безперервного процесу бродіння в пілотних газліфтних біореакторах. Результати аналізу за допомогою РЕМ, представлені на Фіг.26, показали, що протягом двох місяців великі колонії дріжджів утворюються в периферичній області гранули, що підтверджує результати, одержані іншими дослідниками [Bancel і Hu, 1996; Godia та ін., 1987; Wada та ін., 1979; Wang та ін., 1982]. Для декількох зразків на основі візуалізації за допомогою РЕМ було проведено порівняння морфології дріжджів, що знаходяться поблизу зовнішнього краю іммобілізуючої клітини гранули, і дріжджів, що знаходяться в центрі гелевої гранули. Клітини, розташовані на периферії гранул, мали яйцеподібну форму і численні брунькові перегородки (Фіг.27), що свідчать про розмноження дріжджів [Smart, 1995]. Зображення клітин, що знаходяться в центрі гранули (Фіг.28), свідчать про те, що вони є недорозвиненими й у них мало ознак утворення брунькових перегородок. Відсутність брунькових перегородок може бути показником можливого обмеження надходження живильних речовин, наприклад, кисню, у центр гранул. Нерівна поверхня клітин дріжджів, що видна на Фіг.28, може бути також свідченням старіння клітини [Barker і Smart, 1996; Smart, 1999].

Життєздатність дріжджів, іммобілізованих всередині карагінанового гелю, знижувалася до рівня нижче 50% після шести місяців безперервного процесу бродіння в газліфтному біореакторі (таблиця 6.3). Слід зазначити, що хоча була отримана лише єдина експериментальна точка при оцінці концентрації клітин і життєздатності через шість місяців, дані, одержані після закінчення 5-місячного періоду, були аналогічними, тобто концентрація іммобілізованих клітин становила $1,14 \times 10^9$ клітин/мл гелю і життєздатність становила <50%. У той час як життєздатність іммобілізованих клітин з часом знижувалася, життєздатність клітин, що знаходяться в основній рідкій фазі, залишалася досить високою. Крім того, незважаючи на низьку життєздатність іммобілізованих у гранулах клітин у цілому в біореакторі після шести місяців безперервного процесу бродіння одержували повністю зброджене пиво. Можливі причини одержаних результатів полягають у значному впливі вільно суспендованих клітин дріжджів, що мають високу життєздатність, на процес бродіння. Можливо на результат впливали життєздатні іммобілізовані клітини, локалізовані на периферії гелевої гранули, де є менше перешкод для переносу маси, ніж для клітин, локалізованих у центрі гранули. Неясно, чи володіють іммобілізовані клітини здатністю самостійно перерозподілятися всередині гелевої матриці, або ці клітини постійно залишаються в області їх вихідної локалізації. Після шестимісячного безперервного процесу бродіння була досягнута максимальна концентрація 10^9 клітин/мл гелевої гранули.

На Фіг.29 представлено повне зображення гранули, отримане з допомогою РЕМ. Такі гранули мали порожній центр, і результати досліджень великої кількості гранул свідчать про те, що приблизно половина гранул мала таку структуру. Порожня порожнина може утворюватися внаслідок деградації структури карагінанового гелю і цей процес далі може стимулюватися при підготовці препаратів для РЕМ. У свіжих препаратах гранул такі пусті порожнини не виявлені. У попередніх роботах інших авторів [Bancel та ін., 1996] було встановлено, що зростаючі клітини викликають ослаблення гелевої структури. Audet і ін.

(1988) відзначали, що додавання камеді ріжково-го дерева до каппа-карагінану змінює механічну міцність гелевих гранул, призначених для іммобілізації бактерій.

Протягом всього 6-місячного експерименту з вивчення бродіння пива газліфтний біореактор щонайменше один раз у тиждень тестували у відношенні забруднення. Протягом усього часу експерименту не було виявлено ніякого забруднення бактеріями. В останні два місяці досліду були виявлені забруднюючі дріжджі в концентраціях, що варіювалися від 1 до 5 ОЕ/мл. Ці дріжджі могли рости на середовищі PYN при 37°C, але не могли рости в аеробних або анаеробних умовах на середовищі DUBA (вибіркове середовище для бактерій), не мали здатності зброджувати декстрини і не росли на середовищі, що містить CuSO_4 (вибіркове середовище для дріжджів дико-го типу).

Через п'ять місяців середній відсоток клітин дріжджів з респіраторним дефіцитом становив 7%, що перевищувало звичайний відсоток при використанні цього штаму при промисловому періодичному процесі бродіння (який становить у середньому 2%). Аналогічні результати були одержані іншими дослідниками [Norton і D'aMore, 1995]. Дріжджі з респіраторним дефіцитом утворюються в результаті мутації, що приводить до того, що дріжджі стають нездатними розщеплювати глюкозу з утворенням діоксиду вуглецю і води. Такі дріжджі мають мітохондрії з постійно порушеною активністю й утворюються, як правило, у результаті мутації мітохондриальної ДНК [Hardwick, 1995].

До помилкових висновків можуть приводити артефакти, що виникають при підготовці зразків для РЕМ-аналізу. Для неінвазивного дослідження іммобілізованих клітин застосовували такі методи, як спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР) [Fernandez, 1996] і конфокальна мікроскопія [Bancel і Hu, 1996]. Метод ЯМР дозволив дослідникам вивчити транспорт, потік і просторовий розподіл клітин і біохімічних продуктів у біоплівках. Дослідниками [Bancel і Hu, 1996] було також продемонстровано, що можна застосовувати конфокальну лазерну растрову мікроскопію для вивчення клітин, іммобілізованих у пористих желатинових мікроносіях, за допомогою серійних оптичних зрізів.

Хоча в пивоварній промисловості як стандартний індикатор життєздатності клітин застосовують метиленовий синій, цей метод має цілий ряд недоліків [Mochaba та ін., 1998]. Оцінка того, є популяція клітин дріжджів життєздатною або нежиттєздатною, за допомогою цього методу базується на здатності життєздатних клітин окисляти барвник до його знебарвлення. Нежиттєздатні клітини не мають здатності окисляти барвник і тому зберігають синє забарвлення [O'Connor-Cox та ін., 1997]. Методи підрахунку клітин у культурах на планшетах і покривних стеклах ґрунтовані на здатності клітин до росту й утворення макроколоній на агарових планшетах або мікроколоній на середовищах, нанесених на предметні стекла мікроскопа (Technical Committee and Editorial

Committee of the ASBC, 1992). У проведених в даний час на фірмі Labatt дослідженнях з оцінки життєздатності дріжджів в іммобілізуючих матрицях протягом тривалих періодів часу застосовують не тільки метод, оснований на використанні барвника метиленового синього, але і зазначені вище методи, а також знаходиться в процесі розробки метод конфокальної мікроскопії з використанням прижиттєвого забарвлення об'єктів. На додаток до оцінки життєздатності клітин у майбутніх дослідженнях варто оцінювати також «життєву силу» іммобілізованих клітин. Якщо поняття життєздатності відноситься до здатності клітин рости і репродукуватися, то життєва сила характеризує ферганську здатність дріжджів, активність або здатність відновлюватися після стресу [Smart та ін., 1999].

Глава 7. Забезпечення необхідного смаку при використанні газліфтної системи безперервного бродіння пива

7.1 Експериментальний метод

Застосування безперервного процесу бродіння для виробництва пива дуже сильно відрізняється від застосування інших процесів з використанням іммобілізованих клітин, оскільки якість одержаного продукту не можна оцінювати з погляду тільки одного компонента, що визиває інтерес, такого як етанол. Скоріше якість залежить від співвідношення численних хімічних сполук, які необхідно збалансувати для одержання якісного кінцевого продукту. Були вивчені впливи вмісту кисню на метаболіти дріжджів, які додають смаку пиву, при безперервному процесі основного бродіння і протягом вторинного періоду витримування партій. В обох випадках оцінювали також вплив часу перебування в реакторі на вміст метаболітів, що додають смак. Нарешті, до смаку, що поставляється для безперервного процесу бродіння, додавали фермент, що надходить до продажу, який являє собою альфа-ацетолактатдекарбоксилазу і здійснювали моніторинг загальної концентрації діацетилю в рідкій фазі.

7.1.1 Вплив відносного вмісту повітря в псевдозріжджуючому газі біореактора на метаболізм дріжджів при безперервному процесі основного бродіння

Кількість повітря, а отже і кисню, в псевдозріжджуючому газі біореактора варіювали в залежності від часу перебування в реакторі, при цьому температуру та інші контрольовані параметри процесу підтримували на постійному рівні. Загальну об'ємну витрату газу підтримували на постійному рівні, що становить 472 мл/хв при СТД, температура становила 15°C, у досліді використовували гранули з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані клітини штаму LCC 3021 дріжджів, при цьому початкове завантаження клітинами становило 1×10^8 клітин/мл гелю. Дослід проводили при чотирьох різних об'ємних витратах повітря, який пропускається через систему (таблиця 7.1), середній час перебування в біореакторі, R_t , становив 1,18 дня.

Таблиця 7.1

Об'ємні витрати повітря, що вводиться в біореактор через розпилювач при безперервному процесі бродіння. Загальна об'ємна витрата газу, який вводиться в біореактор, становила 472мл/хв при СТД, іншу частину газу становив діоксид вуглецю

Об'ємна витрата повітря (мл/хв.)	Відсоток повітря в псевдозріджуючому газі (об. %)	Початок (день)	Закінчення (день)	Загальний час (дні)
94	19,9	10	26	17
354	75,0	27	40	14
34	7,2	41	58	18
0	0	59	66	8

У процесі експерименту проводили наступні аналізи: вимірювали вміст вільного азоту аміногруп (FAN), загальних вуглеводів, які зброджують (таких як глюкоза), етанолу, загального діацетилу, летучих речовин, що утримуються в пиві (певних складних ефірів і спиртів), а також концентрації клітин дріжджів у рідкій фазі і життєздатність. Як мінімум один раз у тиждень проводили також тестування біореактора у відношенні кантамінації.

Концентрацію розчиненого кисню в загальній рідкій фазі біореактора вимірювали після того, як вважалося, що для даної витрати повітря безперервний процес бродіння досягав псевдостационарного стану (як мінімум після трьох циклів перемішування).

7.1.2 Період витримування партій після бродіння: Вплив дії кисню на продукти метаболізму дріжджів

Було встановлено, що навіть у тому випадку, коли кількість кисню в псевдозріджуючому газі біореактора була відносно невеликою (34мл/хв при СТД), концентрації ацетальдегіду і загального діацетилу в умовах експерименту, проведеного відповідно до методу, описаному в розділі 7.1.2, були неприйнятно високими для лагерного пива Північно-американського типу, що поставляється до продажу. Тому використовували новий підхід, який полягає в тому, що рідину, відібрану з біореактора, у якому здійснювали безперервний процес бродіння, витримували у вигляді однієї партії протягом 48 годин при злегка підвищеній температурі, що рівна 21°C, для зменшення концентрації двох вище зазначених сполук. Аналогічно результатам, приведеним у попередньому розділі, дані, представлені в розділі 7.1.2, свідчать про значний вплив кількості повітря в псевдозріджуючому газі на вміст оцінюваних сполук, що додають смаку. Тому проводили порівняльне дослідження впливу аеробних і анаеробних умов на вміст метаболітів дріжджів, що додають смаку, після здійснення основного бродіння, коли здійснювали вторинне витримування партій продукту.

У цьому досліді безперервний процес основного бродіння здійснювали в газліфтному біореакторі об'ємом 50л з використанням високо флокулентного штаму дріжджів LCC3021, оскільки для дослідження був потрібний об'єм зразка, істотно перевищуючий можливості біореактора об'ємом 8 л. Використовували наступні робочі параметри: витрата CO₂ - 1180мл/хв., повітря -

189мл/хв при СТД у псевдозріджуючому газі, середній час перебування в біореакторі, R1, становив 1,0 день, температура становила 15°C, при цьому використовували сусле для лагерного пива з великою питомою вагою 17,5°P.

Усього було відібрано 4 зразки (у склянці об'ємом 100мл, що закупорювали шляхом обтиску кришки), при цьому дві склянки знаходилися в анаеробних умовах, а дві інші - в аеробних умовах.

Процедура відбору зразків в анаеробних умовах полягала в наступному: дві склянки об'ємом 100мл із кришками, що закупорюються шляхом обтиску, і шість склянок об'ємом 25мл із кришками, що закупорюються шляхом обтиску, автоклавували і потім поміщали в бокс (типу Labmaster 100, mbraun, США), у якому створювали анаеробні умови, використовуючи аргон, як газ для продувки. Вмістові склянок об'ємом 100мл давали врівноважитися протягом 45хв і потім їх герметично закривали з використанням алюмінієвих кришок і мембран з Teflon®. Відбір зразків з біореактора робили за допомогою шприца об'ємом 50мл, оснащеного голкою 16 розміру довжиною 3 дюйми, продезинфікованого за допомогою 70об.%-ного розчину етанолу, шляхом проколювання прокладки мембрани клапана для відбору зразків і ін'єктування зразка в попередньо продуті для забезпечення анаеробних умов склянки об'ємом 100мл. Було необхідно забезпечувати вентиляцію склянки, закупореної шляхом обтиску, за допомогою додаткової стерильної голки шприца для того, щоб знижувати тиск всередині склянки в процесі заповнення. Аеробні зразки піддавали атмосферному впливу, коли їх відбирали з біореактора при повністю відкритому мембранному клапані для відбору зразків і поміщали в незакриті склянки об'ємом 100мл без використання шприца і голки.

Зразку рідини давали відстоятися при кімнатній температурі протягом 2 годин для осадження дріжджів з розчину, після чого концентрація клітин, що залишилися, в основному розчині становила приблизно 106клітин/мл. Після осадження рідину з кожного склянки об'ємом 100мл зливали в три склянки об'ємом 25мл. Анаеробні зразки обробляли в анаеробному боксі для того, щоб мінімізувати поглинання кисню, у той час як аеробні зразки обробляли у витяжній шафі з ламінарним потоком. Кожен зразок з склянок об'ємом 100мл розподіляли в 3 склянки меншого об'єму (25мл), так що аналіз зразків можна було здійс-

нювати, не порушуючи процес бродіння в результаті відбору зразків. Після переносу аеробних зразків у склянки меншого об'єму їх інкубували, не закриваючи кришкою при 21°C. Анаеробні зразки переносили в три склянки меншого об'єму і герметично закривали за допомогою алюмінієвої кришки і мембрани з Teflon®. Для того, щоб уникнути підвищення тиску унаслідок виділення діоксиду вуглецю в склянках і при цьому запобігти впливу аеробного зовнішнього середовища на зразки, прокладку протикали голкою. Кінчик голки, що знаходиться в зовнішньому оточенні склянки, занурювали в етанол (при гідростатичному напорі менше 1см), що запобігало якому-небудь зворотному надходженню повітря в зразок. Зразки відбирали для аналізу через 2, 24 і 48 годин. Відбирали також зразок безпосередньо з біореактора і відразу ж піддавали аналізу для оцінки стану бродіння в біореакторі в момент, що відповідає протоколові. Зразки аналізували у відношенні загального вмісту вуглеводів, які зброджують (таких як глюкоза), етанолу, вмісту загального діацетилю і летучих речовин, що присутні у пиві (певних складних ефірів і спиртів).

7.1.3 Вплив часу перебування рідини в біореакторі на продукти метаболізму дріжджів при безперервному процесі основного бродіння пива

Для вивчення впливу часу утримання на метаболічну активність дріжджів був проведений експеримент, у якому східчастим образом змінювали об'ємну витрату сусла, що надходить у біореактор при безперервному процесі основного бродіння пива з використанням клітин дріжджів штаму LCC3021, іммобілізованих у гранулах з каппа-карагінанового гелю. У процесі дослідження температуру біореактора підтримували на постійному рівні 17°C. Об'ємна витрата газу, що надходила у біореактор, також була постійною і становила 472мл/хв при СТД. Газ являв собою суміш повітря (11мл/хв при СТД) і діоксиду вуглецю (461мл/хв при СТД). Початкова концентрація клітин дріжджів у каппа-карагінановому гелі становила $2,6 \times 10^7$ клітин/мл гелевих гранул, а вміст гранул у біореакторі становив 40об.%.

У досліді регулярно проводили наступні аналізи: визначали вміст вуглеводів, вільного азоту аміногруп (FAN), загальний вміст вуглеводів, які зброджуються (таких як глюкоза), етанолу, вміст загального діацетилю, летучих речовин, що присутні у пиві (певних складних ефірів і спиртів), і

концентрації і життєздатності клітин дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі. Як мінімум один раз на тиждень проводили також тестування біореактора у відношенні забруднення.

7.1.4 Застосування препарату, що надходить до продажу, альфа-ацетолактатдекарбоксилази для зменшення вмісту загального діацетилю при безперервному процесі основного бродіння пива

Більшість Північно-американських виробників пива вважає, що наявність високих концентрацій діацетилю впливає на смак їх пива. У дослідях із застосуванням безперервного процесу основного бродіння, проведених у даний час, концентрації загального діацетилю істотно перевершували граничні рівні, прийняті при виробництві Північно-американських сортів лагерного пива за допомогою періодичного процесу бродіння (70-150мкг/л). При періодичному процесі бродіння вміст діацетилю знижується на останніх стадіях бродіння, коли кисень уже відсутній і не відбувається додаткового підживлення цукрами. При використанні системи, яка базується на безперервному процесі бродіння, у біореактор за допомогою розпилювача постійно подається невелика кількість кисню й у біореактор безупинно подається свіже сусло. Тому було проведене вивчення нової стратегії, що базується на використанні препарату ферменту, що надходить до продажу, призначеної для контролю концентрації діацетилю в біореакторі безперервної дії.

Діацетил при бродінні сусла утворюється, коли поза клітинами відбувається окисне декарбоксилювання альфа-ацетолактата, що являє собою проміжний продукт при синтезі валіна. Потім клітина дріжджів повторно абсорбує діацетил і перетворює його в ацетоїн, що має менше смакових якостей. Ця стадія окисного декарбоксилювання альфа-ацетолактата з утворенням діацетилю обмежує швидкість періодичного процесу бродіння сусла. При безперервному процесі бродіння концентрації загального діацетилю на виході з біореактора є неприйнятно великими (300-400мкг/л). Фермент альфа-ацетолактатдекарбоксилаза (ALDC), який поступає до продажу від фірми Novo-Nordisk A/S, може перетворювати альфа-ацетолактат безпосередньо в ацетоїн без утворення небажаного проміжного продукту, діацетилю (Fig.7.1) [Jepsen, 1993].



Альфа-ацетолактатдекарбоксилазу додавали в сусло, що знаходиться в біореакторі для оцінки її безпосереднього впливу на концентрацію загального діацетилу. Вивчали також інші стратегії зменшення вмісту діацетилу, включаючи використання витримування партії в теплих умовах протягом 48 годин після закінчення бродіння і вторинних систем бродіння з використанням іммобілізації, технології, розробленої фірмою Alpha-Laval [Aron, 1997]. Було встановлено, що обидві ці стратегії мають ефективність у відношенні зниження рівнів діацетилу після бродіння, однак жодна з них не дозволяє впливати на рівень діацетилу в тому місці, де він утворюється (тобто на виході з біореактора). При використанні ALDC, внесеної в сусло для зменшення концентрації діацетилу, що виходить з біореактора, періоди обробки після бродіння можна мінімізувати або виключати.

Оптимальна активність ALDC у лагерному суслі при 10°C досягалася при pH 6,0. При значенні pH 5,0, що є типовим для вироблених у промисловому масштабі сортів пива, активність ALDC досягає максимуму при температурі 35°C [Aron, 1994]. Таким чином, у типових умовах бродіння, що характеризуються більш низькими температурою і значенням pH, активність ALDC є меншою, ніж оптимальна активність.

Міністерство охорони здоров'я Канади в 1997 внесло виправлення в Канадський закон про виробництво і продаж харчових продуктів і лікарських засобів (SOR/97-81), що дозволяє застосовувати ALDC у спиртних напоях, що дало можливість застосовувати її в канадській пивова-

рній промисловості. Фермент ALDC продукується штамом *Bacillus subtilis*, що несе кодуєчий ALDC (КФ 4.1.1.5) ген з *Bacillus brevis*. Оскільки ALDC являє собою фермент, який виробляється генетично модифікованим організмом (ГМО), необхідно звернутися до громадських організацій для одержання схвалення перш ніж такий фермент використовувати для одержання продукту, що надходить до продажу.

Для даних експериментів застосовували штам лагерних дріжджів LCC3021. Лагерне пивне сусло з великою питомою вагою, рівним 17,5°P, надходило з пивоварного заводу фірми Labatt, Лондон. Здійснювали моніторинг концентрації етанолу, загальних вуглеводів, які зброджують (таких як глюкоза), загального діацетилу і концентрації клітин, що знаходяться в рідкій фазі. Клітини іммобілізували в гранулах каппа-карагінанового гелю як описано в главі 4. Здійснювали три цикли циркуляції в біореакторі, що як передбачалося було потрібно для досягнення псевдостационарного стану. Як зазначалося вище, метод визначення вмісту діацетилу, використаний у даній роботі, названий як метод визначення вмісту "загального діацетилу", тому що в методі вимірюється кількість діацетилу і його попередника, альфа-ацетолактата. Таким чином, зменшення вмісту загального діацетилу, що спостерігається в даному експерименті, може бути обумовлено комбінацією двох факторів, а саме, дією ферменту, що перетворює альфа-ацетолактат безпосередньо в ацетоїн, і зменшенням концентрації його похідного, діацетилу, що відбувається внаслідок цього.

Альфа-ацетолактатдекарбоксилаза (ALDC) була люб'язно надана для цілей лабораторних досліджень фірмою Novo Nordisk A/S, Данія у вигляді продукту Maturex® L. Активність ферменту становила 1500ADU/г, де ADU являє собою кількість ферменту, що у стандартних умовах у результаті декарбоксилювання альфа-ацетолактата приводить до одержання 1мкмоль ацетоїну в хвилину, як це описано в методі фірми Novo Nordisk (Novo Nordisk Method AF27) [Anon, 1994].

Умови безперервного процесу бродіння:

Досліди з вивчення безперервного процесу бродіння проводили в газліфтному біореакторі об'ємом 8л з трубою для відсмоктування, заповненого на 40об.% гранулами з каппа-карагінанового гелю, що містять іммобілізовані клітини лагерних дріжджів. У біореакторі розпо-рошували суміш діоксиду вуглецю (438мл/хв при СТД) і повітря (34мл/хв при СТД). Температуру суміші, яку зброджують, в процесі досліду під-тримували на рівні 15°C, час перебування в біо-реакторі, R1, становив 1,5 дня. У цих умовах здійснювали моніторинг концентрації загального діацети-лу і забезпечували контроль псевдостаци-онарного стану середньої концентрації діацети-лу. Потім до сусла додавали ALDC у концентрації 72мкг/л (108ADU/л) здійснювали моніторинг кон-центрації загального діацети-лу в біореакторі для виявлення відповідної реакції.

Експеримент 1: Сусло, що надходило з пиво-варного заводу, збирали в резервуар з нержавію-чої сталі об'ємом 20л і витримували в автоклаві протягом 45хв при 100°C. При подачі в біореак-тор сусло витримували при 2°C у водяній бані з контрольованою температурою. Після досягнен-ня псевдостационарного стану концентрації загаль-ного діацети-лу в біореакторі до сусла, що зна-ходиться в резервуарі об'ємом 20л, додавали 72мкг/л (108ADU/л) ALDC. Початкове заванта-ження біомаси в гранули з каппа-карагінанового гелю становило 3×10^7 клітин/мл гелю.

Експеримент 2:

Для мінімізації ризику забруднення контур системи замикали на вихідному отворі і здійсню-вали також інші модернізації системи, описані в главі 4. Як і в експерименті 1 сусло, що надходи-ло з пивоварного заводу, збирали в резервуар з нержавіючої сталі об'ємом 20л і витримували в автоклаві протягом 45хв при 100°C. При подачі в біореактор сусло витримували при 2°C у водяній бані з контрольованою температурою. Початкове завантаження біомаси в гранули з каппа-карагінанового гелю становили 3×10^7 клітин/мл гелю. Після досягнення псевдостационарного стану концентрації загального діацети-лу в біоре-акторі до сусла, що знаходиться в резервуарі об'ємом 20л, додавали 72мкг/л (108ADU/л) ALDC.

Експеримент 3:

Неоксигеноване пивне сусло з питомою ва-

гою 17,5°P (14г/л) збирали у великий резервуар для зберігання сусла (Т-1), що знаходиться на пілотному заводі. Потім його піддавали миттєвої пастеризації і зберігали при розпиленні діоксиду вуглецю для підтримки постійної концентрації розчиненого кисню на рівні $<0,10$ мг/л як описано в главі 5. Сусло подавали в біореактор з резер-вуара доти, поки не досягали псевдостационарно-го стану концентрації загального діацети-лу. Потім до сусла, що залишилося в досліді, додавали в асептичних умовах ALDC (72мкг/л). Додавання ALDC здійснювали на основі вимірювання кілько-сті сусла, що залишилося в посудині для збері-гання, і обчислення кількості ALDC, необхідної для доведення концентрації ферменту до необ-хідної концентрації, що становить 72мкг/л (108ADU/л). Потім відповідну кількість ферменту розчиняли в 10л стерильного сусла. Цей розчин переносили в посудину високого тиску з нержаві-ючої сталі об'ємом 20л, що з'єднували за допомо-гою стерильного трубопроводу з портом для від-бору зразків, що знаходиться на резервуарі для зберігання сусла (Т-1). Потім розчин ALDC пода-вали в судину для зберігання сусла за допомогою тиску стерильного діоксиду вуглецю. Для того, щоб гарантувати адекватне змішування розчину ALDC із суслом у резервуарі для зберігання шви-дкість розпилення діоксиду вуглецю в резервуарі підвищували до 4720мл/хв при СТД протягом 1 години і потім знижували до нормальної швидко-сті потоку. У результаті цього резервуар для збе-рігання містив достатню для завершення досліду кількість сусла, у якому була присутня ALDC. По-чаткове завантаження біомаси в гранули з каппа-карагінанового гелю становили 10^8 клітин/мл гелю.

7.2 Результати й обговорення

7.2.1 Вплив відносного вмісту повітря в псев-дозріджуючому газі біореактора на продукти ме-таболізму дріжджів у безперервному процесі ос-новного бродіння

На Фіг.7.2-7.11 представлені залежності жит-тездатності дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, і концентрації клітин, вмісту вільного азоту в аміногрупах (FAN), загальних вуглеводів, які зброджуються (таких як глюкоза), етанолу, загаль-ного діацети-лу, ацетальдегіду, етилацетату, 1-пропанолу, ізобутанолу, ізоамілацетату, ізоамі-лового спирту, етилгексаноату й етилоктаноату від часу при безперервному процесі бродіння. Всі робочі параметри біореактора підтримувалися на постійному рівні протягом всього протоколу за винятком процентного вмісту повітря, яке розпи-люють в біореакторі, що зазначено безпосеред-ньо на кресленнях. У таблиці 7.2 узагальнені се-редні значення для кожного аналізованого продукту в псевдостационарному стані (після мі-німум трьох циклів циркуляції в реакторі).

Таблиця 7.2

Узагальнююча таблиця впливу об'ємної витрати повітря, яке розпилюють в біореакторі, на життєздатність дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, і концентрації основних продуктів метаболізму дріжджів у біореакторі протягом часу перебування в біореакторі, R1, що становить 1,18 днів, приведені середні значення для псевдостационарного стану

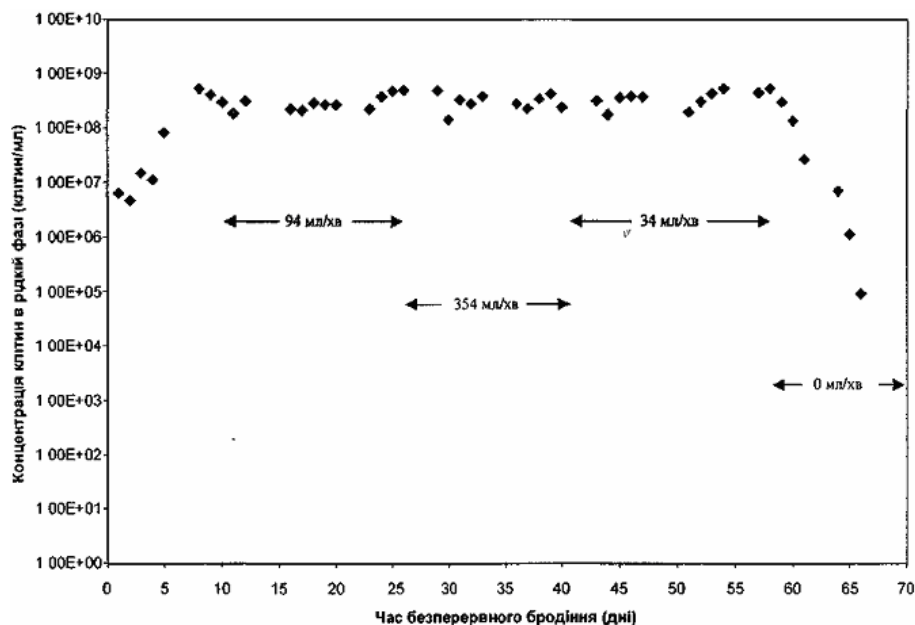
Середнє значення* для аналізованого компоненту	Об'ємна витрата повітря (мл/хв)		
	94	354	34
Концентрація клітин (клітин/мл)	3,87E+08	2,98E+08	4,73E+08
Загальна глюкоза, яку зброджують (г/100мл)	1,36	1,25	2,07
FAN (мг/л)	196,9	171,7	162,8
Етанол (г/100мл)	6,14	5,46	5,74
Загальний діацетил (мкг/л)	346	1417	389
Ацетальдегід (мг/л)	75,62	329,48	28,63
Етилацетат (мг/л)	22,38	21,13	18,01
1-пропанол (мг/л)	44,74	50,89	53,04
Ізобутанол (мг/л)	8,73	16,09	8,05
Ізоамілацетат (мг/л)	0,38	0,21	0,30
Ізоаміловий спирт (мг/л)	58,62	61,64	59,16
Етилгексаноат (мг/л)	0,060	0,030	0,053
Етилоктаноат (мг/л)	0,031	0,013	0,025

* середнє значення, отримане протягом останніх чотирьох днів для кожного з робочих параметрів

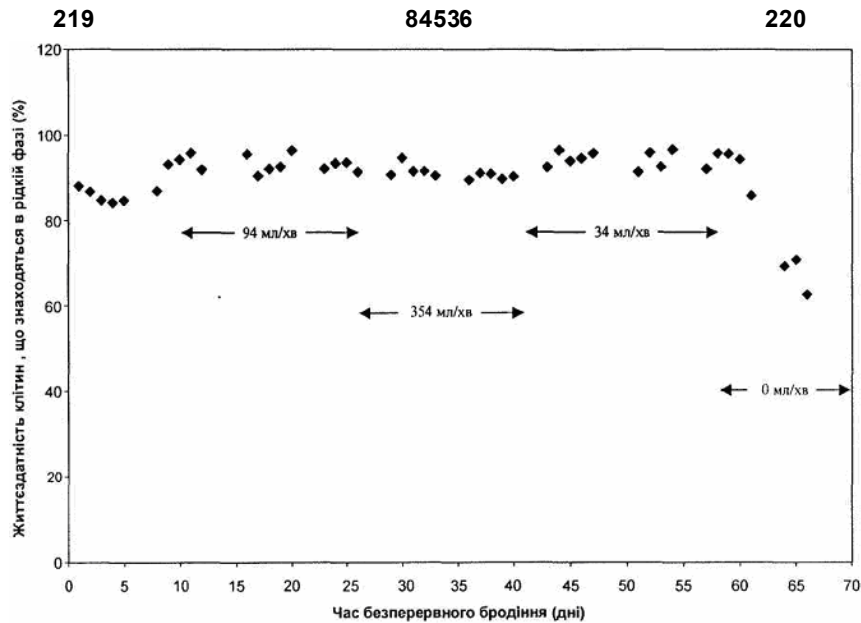
Дані, приведені на Фіг.7.2 і 7.3 свідчать про те, що популяція дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, не знижувалася до нуля протягом цього експерименту, компоненти, що додають смаку, які вивчали в даній роботі, продукувались як вільними, так і іммобілізованими клітинами дріжджів, але при цьому внесок від кожного з зазначених джерел не визначали.

У даному дослідженні було більше одного джерела вільно суспендованих клітин: ріст біома-

си і клітини, що вивільнялися з гелевих гранул в основне рідке середовище. У результаті досліджень, проведених з використанням змішаних моделей, що враховують вивільнення клітин і їх ріст, було встановлено, що якщо має місце вивільнення клітин з біоплівки, то навіть у тому випадку, якщо біореактор працює при високих коефіцієнтах розведення, у рідині, яка виходить усе ще присутня популяція клітин [Karamanev, 1991].



Фіг. 7.2. Залежність концентрації клітин дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі від відносного часу безперервного процесу бродіння. На графіку зазначена об'ємна витрата повітря при STD, який подається у біореактор через розпилювач. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при STD.

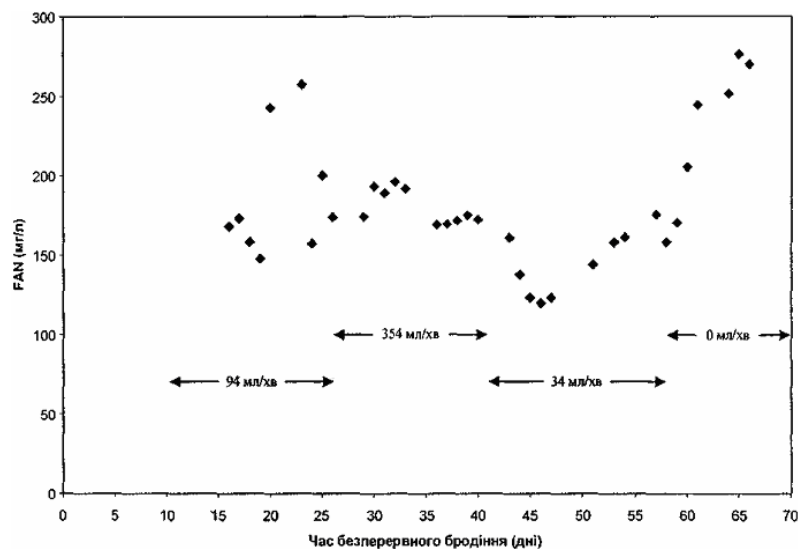


Фіг. 7.3. Залежність життєздатності дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подавали в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.

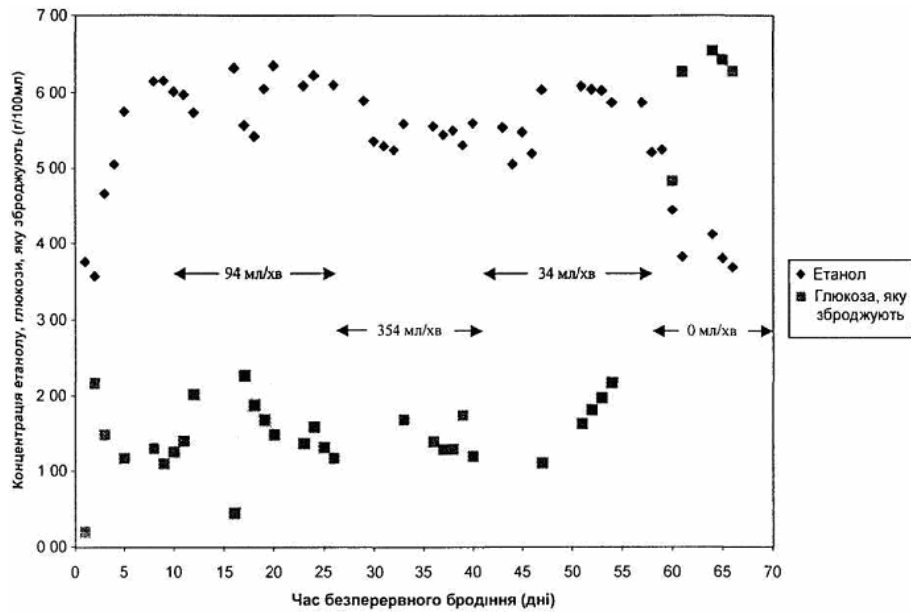
На Фіг.7.4 представлена залежність концентрації вільного азоту аміногруп (FAN) у рідкій фазі від часу. Цікаво відзначити, що мінімальні концентрації FAN досягалися при витраті повітря 34мл/хв при СТД. Це не збігається з часом досягнення максимальної концентрації етанолу або мінімальних концентрацій загальних вуглеводів, які зброджують (таких як глюкоза).

Концентрація етанолу в рідкій фазі біореактора зменшувалася, у той час як вміст загальних вуглеводів, які зброджують (таких як глюкоза), збільшувалася при підвищенні об'ємної витрати повітря в газі, який розпилюють від 94 до 354мл/хв, як це видно на Фіг.7.5. Це може свідчити про те, що внаслідок підвищення доступності кисню забезпечувалися кращі умови респірації, а не бродіння. Після того, як об'ємну витрату знову

знижували від 354мл/хв до 34мл/хв при СТД, концентрація етанолу знову зростала, однак вона не досягала концентрації, що була при витраті 94мл/хв при СТД. Важко точно зіставити концентрації етанолу при 34мл/хв із концентраціями при 94мл/хв при СТД внаслідок наявності інших факторів, що роблять вплив на систему, що обумовлені старінням клітин, впливом безперервного впливу порівняно великих кількостей кисню в період, коли витрата становила 354мл/хв при СТД, і змінами популяції іммобілізованих клітин. Дані, представлені на Фіг.2.4, що були одержані White і Portno (1978) з використанням їх колонного ферментера, свідчать про зміни концентрацій продуктів метаболізму, що додають смак, дріжджів у залежності від часу безперервного бродіння.



Фіг. 7.4. Залежність концентрації збереженого в суслі вільного азоту аміногруп від часу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подавали в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.

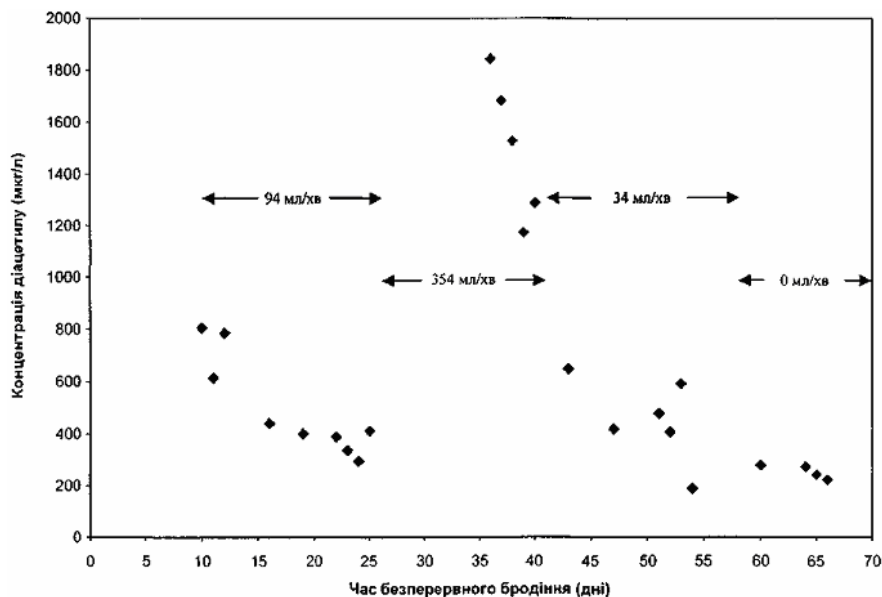


Фіг. 7.5. Залежність концентрації етанолу і загальних вуглеводів, які зброджують (таких як глюкоза), що знаходяться в рідкій фазі від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подається в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.

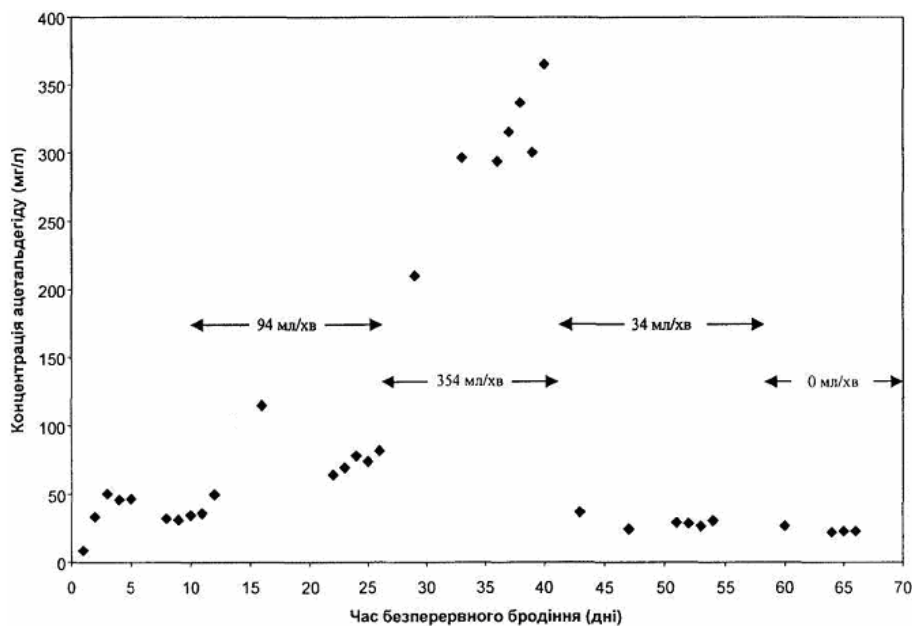
Дані, приведені на Фіг.7.6, свідчать про виражений вплив вмісту кисню на виробництво загального діацетилю. Оскільки діацетил, як правило, вважається небажаним смаковим компонентом у пиві, то однією з основних причин для оптимізації кількості кисню в біореакторі є контроль рівнів цієї смакової сполуки. Після фази, протягом якої витрата повітря становила 354мл/хв, витрату повітря зменшували до 34мл/хв при СТД і вміст загального діацетилю зменшувався. Відомо, що при періодичному процесі бродіння підвищення концентрації кисню приводить до збільшення

вмісту альфа-ацетолактата, що є попередником діацетилю [Kunze, 1996].

Дані, приведені на Фіг.7.7, переконливо свідчать про наявність зв'язку між вмістом повітря в газі, який розпилюють і концентрацією ацетальдегіду, що утворюється. При збільшенні процентного вмісту повітря в газі, який розпилюють, відбувається також збільшення вмісту ацетальдегіду. Ацетальдегід додає пиву незрілий смак (смак зеленого яблука) і, як правило, є присутнім у пиві, що поставляється до продажу, у концентраціях менше 20мг/л.



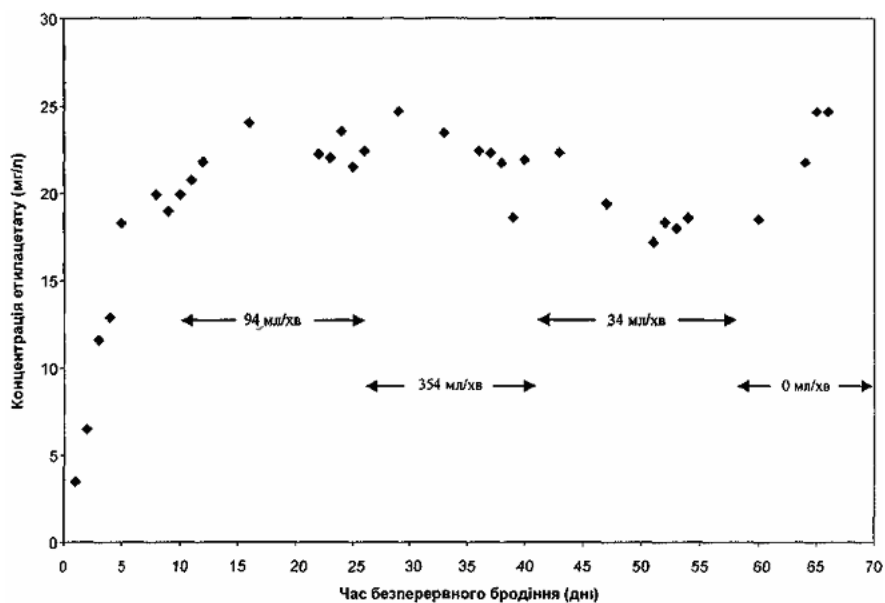
Фіг. 7.6. Залежність концентрації загального діацетилю, що знаходиться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подається в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.



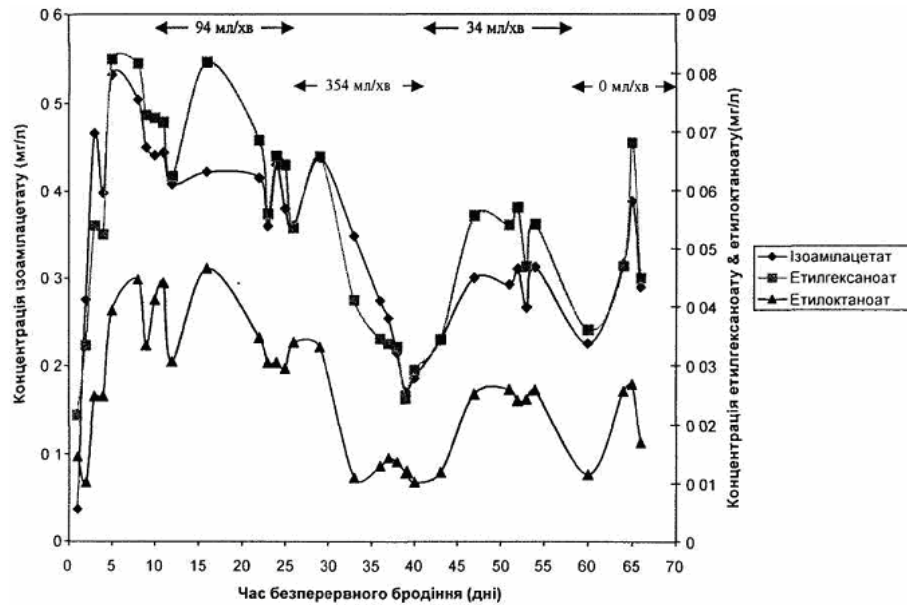
Фіг. 7.7. Залежність концентрації ацетальдегіду, що знаходиться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подається в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.

У таблиці 7.2 і на Фіг.7.8-7.9 представлені залежності концентрацій етилацетату, ізоамілацетату, етилгексаноату й етилоктаноату в псевдостационарному стані від часу безперервного процесу бродіння. Для всіх аналізованих складних ефірів східчаста зміна швидкості аерації від 94 до 354мл/хв при СТД приводило до зменшення концентрації. При зменшенні швидкості аерації від 354мл/хв до 34мл/хв при СТД концентрації ізоамілацетату, етилгексаноату й етилоктаноату зростали. Однак вони не досягали величин, що одержували при швидкості аерації 94мл/хв. Схеми відповідної реакції для цих сполук були дуже

близькими, при цьому для етилгексаноату й етилоктаноату відносні флуктуації були більше, ніж для ізоамілацетату. Концентрація етилацетату в дійсності ще більше знижувалася, коли об'ємну витрату повітря зменшували до 34мл/хв при СТД. Було встановлено, що концентрація всіх складних ефірів, що аналізували в цьому досліді, підвищувалася, якщо з псевдозріджуючого газу повністю видаляли повітря. Концентрація кожного із складних ефірів зростала, потім виходила на постійний рівень, коли відбувалося швидке зменшення концентрації клітин, що знаходяться в рідкій фазі в біореакторі.



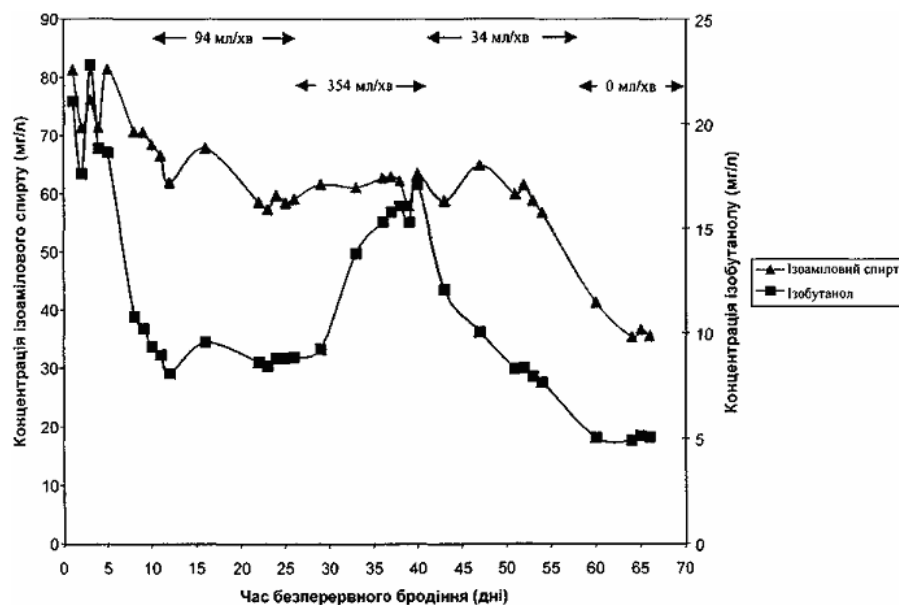
Фіг. 7.8. Залежність концентрації етилацетату від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подається в біореактор через розпилювач, зазначений на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.



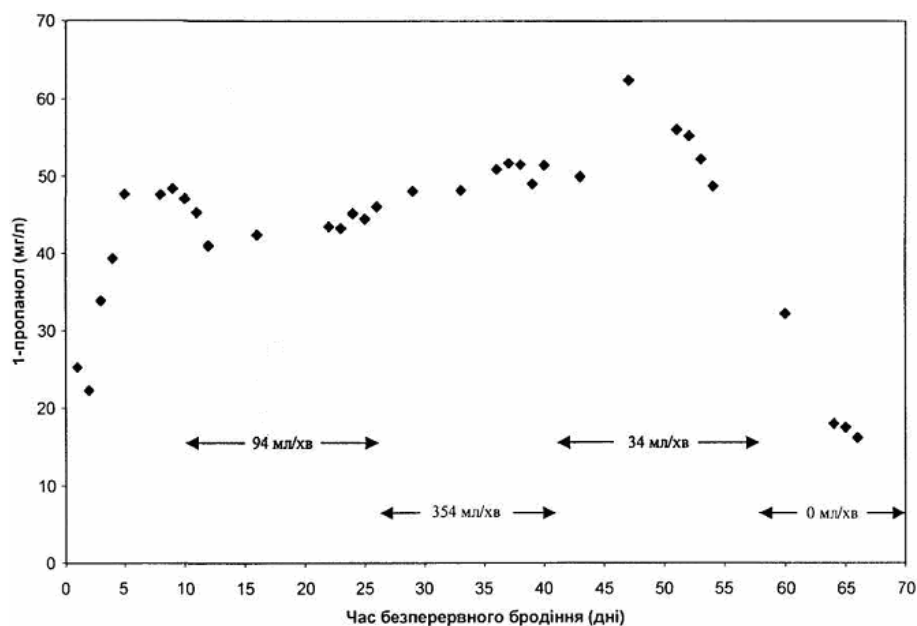
Фіг. 7.9. Залежність концентрації ізоамілацетату, етилгексаноату й етилоктаноату, що знаходяться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, що подається в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.

На Фіг.7.10 і 7.11 представлені залежності концентрацій вищих спиртів, а саме ізоамілового спирту, ізобутанолу і 1-пропанолу від часу безперервного процесу бродіння. Концентрації аналізованих спиртів зростали при східчистій зміні аерації від 94 до 354мл/хв при СТД. Для ізобутанолу були виявлені найбільші флуктуації при зміні швидкості аерації. Концентрації 1-пропанолу були менше граничних значень з погляду смаку, що становлять 600-800мг/л, однак в експерименті з використанням безперервного процесу бродіння концентрації істотно перевищували величини, характерні для звичайних вироблених у промисловому масштабі сортів пива, що, як правило,

нижче 16мг/л. Це не відноситься до ізоамілового спирту або ізобутанолу, вміст яких знаходилося в звичайних межах. Передбачається, що 1-пропанол утворюється в результаті відновлення кислого ефіру пропіонової кислоти [Gee і Ramirez, 1994]. Інші фахівці [Hough та ін., 1982; Yamauchi та ін., 1995] зв'язують утворення 1-пропанолу з метаболізмом амінокислот, α -аміномасляної кислоти і треоніну, при взаємодії з відповідними оксокислотою і альдегідом, що представляють собою α -оксомасляну кислоту і пропіональдегід відповідно.



Фіг. 7.10. Залежність концентрації ізоамілового спирту й ізобутанолу, які знаходяться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, яке подають в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.



Фіг. 7.11. Залежність концентрації 1-пропанолу, який знаходиться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння. Об'ємна витрата повітря при СТД, яке подають в біореактор через розпилювач, зазначена на графіку. Інша частина газу являла собою діоксид вуглецю, а загальну об'ємну витрату газу в процесі експерименту підтримували на постійному рівні, рівному 472мл/хв при СТД.

Оскільки надлишок діацетилю, ацетальдегіду і спиртів сивушних масел є небажаним для пива, то важливо контролювати вміст кисню для обмеження їх продукування. Як обговорювалося в огляді літератури, при збільшенні надходження кисню до клітин відбувається посилене анаболічне утворення попередників амінокислот і внаслідок цього надлишкове утворення вищих спиртів, оксокислот і діацетилю. Відомо, що концентрація складних ефірів зменшується при збільшенні приступності кисню, оскільки утворення складних ефірів каталізується ацетилтрансферазою. Ацетилтрансфераза інгібується ненасиченими жирними кислотами і ергостеролом, вміст яких у свою чергу зростає в присутності кисню [Norton і D'amore, 1994].

Для умов у біореакторі, які використовували в даному експерименті, концентрації розчиненого кисню в псевдостационарному стані (після як мінімум трьох циклів циркуляції в біореакторі), визначені в рідкій фазі біореактора, були близькі до нуля (менше 0,03мг/л).

Для даного експерименту не вдалося провести безпосереднє порівняння даних, одержаних при витратах повітря в псевдозріджуючому газі 94 і 34мл/хв при СТД, оскільки в проміжку між цими стадіями дослідів проводили дослідження при найбільш високій витраті повітря (354мл/хв). Це обумовлено тим, що фізіологічний стан дріжджів, що залежить від їх перебування в попередніх умовах роботи біореактора, іммобілізуюча матриця і час безперервного процесу бродіння можуть викликати також інші зміни смаку продукту, який виробляють.

У процесі даного експерименту в біореакторі жодного разу не було виявлено забруднення.

Для забезпечення балансу між вимогою забезпечення дріжджів визначеною кількістю кисню для підтримання життєздатності дріжджів і необ-

хідністю мінімізувати вміст кисню для одержання пива з необхідним букетом смаку, варто вивчити інші стратегії, такі як додавання живильних речовин, наприклад, цинку, магнію, або подача інших екзогенних сполук, необхідних для зберігання життєздатності дріжджів, додавання таких речовин може допомогти ще більше зменшити потребу дріжджів у кисні. Інша можливість може полягати в тому, щоб протягом більшої частини процесу використовувати дуже низькі концентрації кисню, періодично здійснюючи імпульсну подачу кисню дріжджам для підтримання життєздатності клітин.

7.2.2 Період витримування партій після зброджування: вплив обробки киснем на продукти метаболізму дріжджів

Оскільки вміст загального діацетилю наприкінці періоду основного бродіння виходив за рамки нормального діапазону, прийнятого для пива, що поставляється до продажу, то були вивчені декілька підходів для зменшення концентрації цієї сполуки до прийнятних рівнів. Один з цих підходів полягав у використанні періоду витримування в теплих умовах безпосередньо після завершення безперервного процесу основного бродіння.

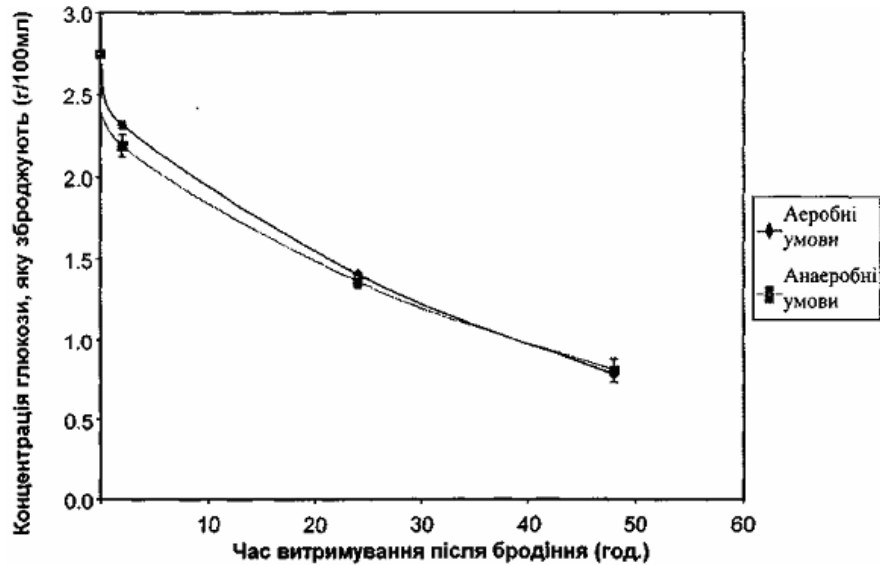
На Фіг.7.12-7.21 представлені залежності вмісту загальних вуглеводів (таких як глюкоза), які зброджують, етанолу, загального діацетилю, ацетальдегіду, етилацетату, 1-пропанолу, ізобутанолу, ізоамілацетату, ізоамілового спирту і етилгексаноату, що знаходяться в рідкій фазі, в залежності від часу витримування після бродіння. Як зазначено в написах для кожного креслення, зразки, відібрані в псевдостационарному стані з ферментера, у якому здійснювали безперервний процес бродіння, витримували в аеробних або анаеробних умовах.

З даних, наведених на Фіг.7.12 випливає, що концентрація загальних вуглеводів (таких як глю-

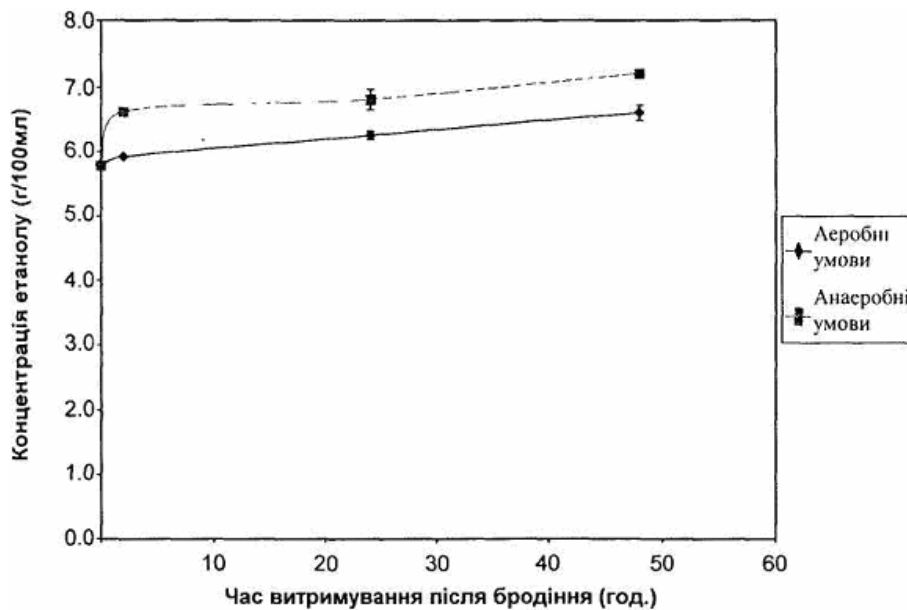
коза), які зброджували, як в аеробних, так і в анаеробних умовах, швидко зменшувалася протягом перших двох годин, а потім протягом іншої частини періоду витримування знижувалася з меншою швидкістю. Можливою причиною цих результатів може бути те, що протягом перших двох годин, які були до декантації, присутня більша кількість дріжджів, і концентрація цукрів була більш високою на початку періоду витримування. Не було виявлено істотних розходжень поглинання глюкози, яку зброджували, в аеробних і анаеробних зразках, хоча спочатку була відзначена наявність

деяких розходжень.

Як впливає з результатів, наведених на Фіг.7.13, концентрація етанолу швидко зростала на початку періоду витримування, а потім для анаеробних і аеробних зразків концентрація етанолу зростала з часом майже однаково. Початкове зростання вмісту етанолу для анаеробного зразка співпадало з періодом, коли відбувалося максимальне поглинання цукру. Наприкінці періоду витримування концентрація етанолу в зразках, що знаходилися в анаеробних умовах, була більш високою.



Фіг. 7.12 Залежність середньої концентрації глюкози, яку зброджують, від часу витримування після бродіння в зразках, оброблених в аеробних і анаеробних умовах, які одержували за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних ($n=2$).

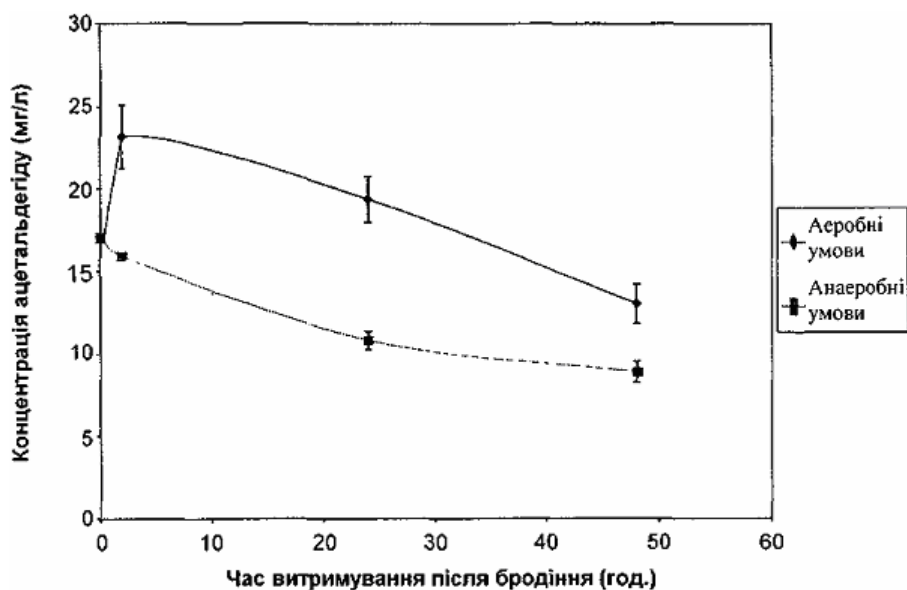


Фіг. 7.13. Залежність середньої концентрації етанолу від часу витримування після бродіння в зразках, оброблених в аеробних і анаеробних умовах, які одержували за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних ($n=2$).

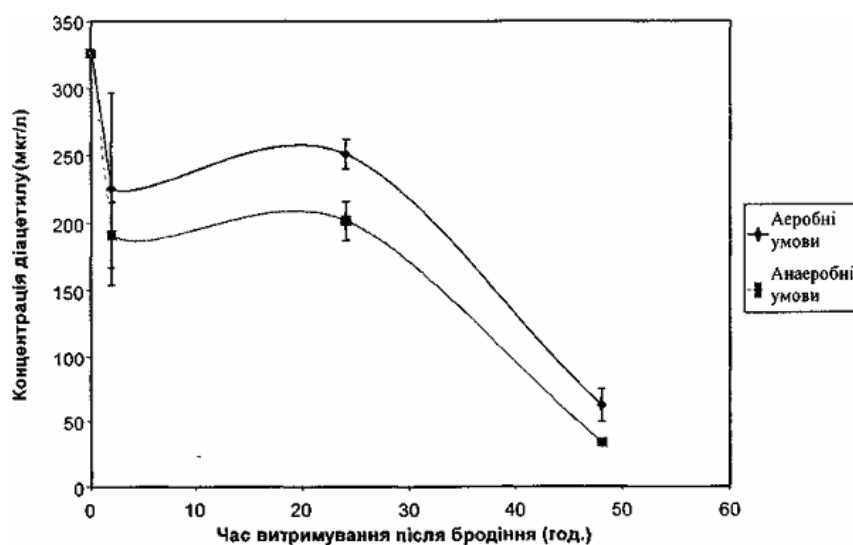
З даних, наведених на Фіг.7.14, видно, що в аеробних зразках відбувається більш швидке підвищення вмісту ацетальдегіду при витримуванні в аеробних умовах поза біореактором. Цей результат може бути пояснений спільним впливом аеробних умов, поглинанням цукру і виробництвом етанолу. Наприкінці 48-годинного періоду витримування концентрація ацетальдегіду в анаеробному зразку знижувалася від 17 до 9мг/л, у результаті чого концентрація зазначеного продукту в рідині відповідала нормам якості, які прийняті для Північно-американських сортів лагерного пива (менше 10мг/л).

На Фіг.7.15 представлено залежності концентрації загального діацетилю від часу витримування. Ці дані свідчать про те, що вилучення кисню із

системи протягом зазначеного періоду витримування забезпечує більш сприятливі умови для зниження вмісту діацетилю. Характер залежності загального вмісту діацетилю може бути пояснений виснаженням вільного азоту аміногруп і наступним внутрішньоклітинним виробництвом валіну, побічним продуктом якого є діацетил [Nakatani та ін., 1984a; Nakatani та ін., 1984b]. Концентрація загального діацетилю наприкінці безперервного процесу основного бродіння становила 326мкг/л, а наприкінці періоду витримування в анаеробних умовах концентрація становила 33мкг/л, що істотно нижче порога смакового відчуття, припустимого для сортів пива, які пропонуються до продажу.



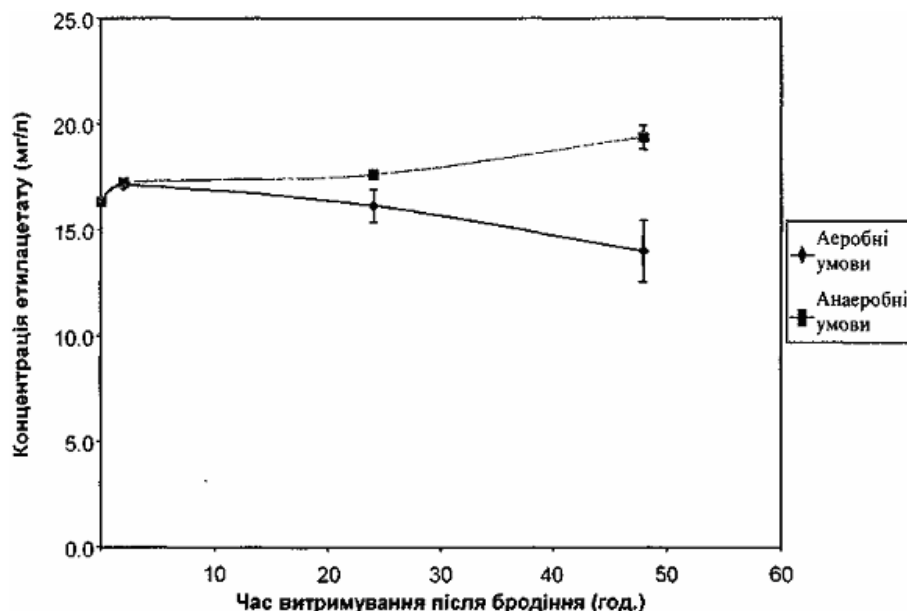
Фіг. 7.14. Залежність середньої концентрації ацетальдегіду від часу витримування для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків після безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних (n=2).



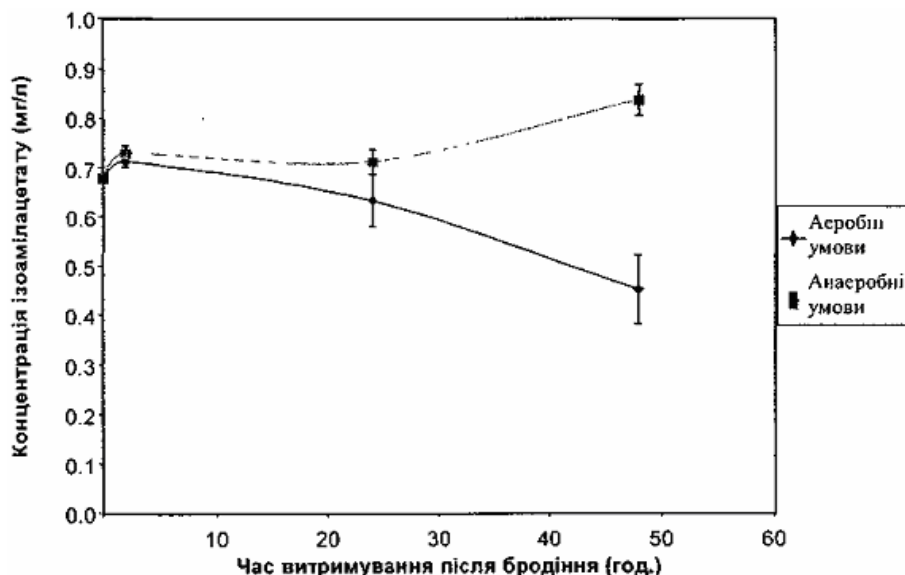
Фіг. 7.15. Залежність середньої загальної концентрації діацетилю для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків від часу витримування після безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних (n=2).

На Фіг.7.16-7.18 представлені залежності вмісту складних ефірів етилацетату, ізоамілацетату і етилгексаноату від часу витримування після бродіння. Встановлено, що зазначені залежності для аеробних і анаеробних зразків мають однаковий характер для всіх складних ефірів. Концентрації складних ефірів для анаеробних і аеробних зразків близькі одна до одної аж до останньої стадії періоду витримування, коли концентрації склад-

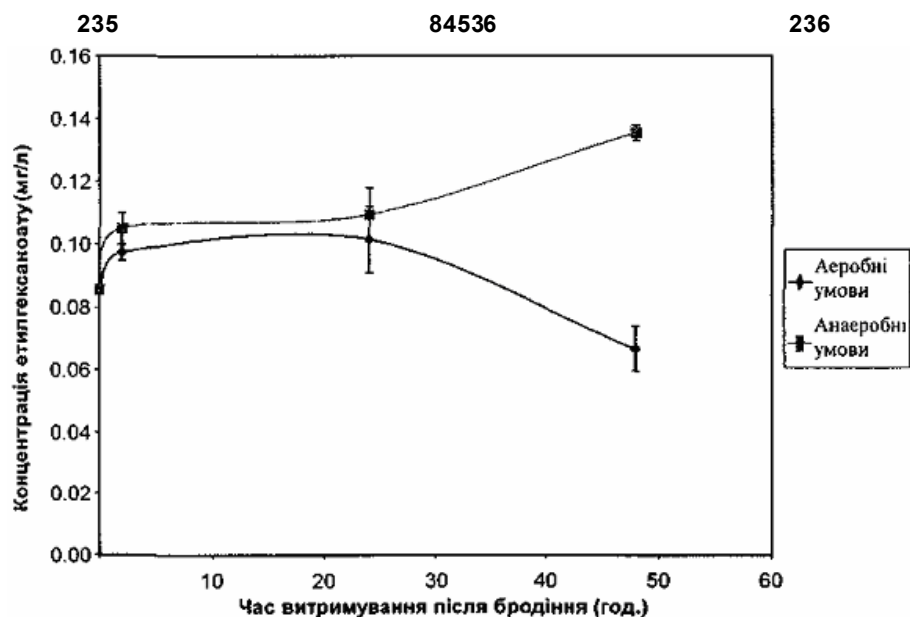
них ефірів в аеробних зразках зменшувалися, а концентрації в анаеробних зразках збільшувалися. Оскільки концентрація складних ефірів при використанні безперервного процесу бродіння трохи менше, ніж концентрації складних ефірів, характерні для пива, що надходить до продажу, доцільно вибирати умови, сприятливі для виробництва складних ефірів.



Фіг. 7.16. Залежність середньої концентрації етилацетату від часу витримування після бродіння для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків, одержаних за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних (n=2).



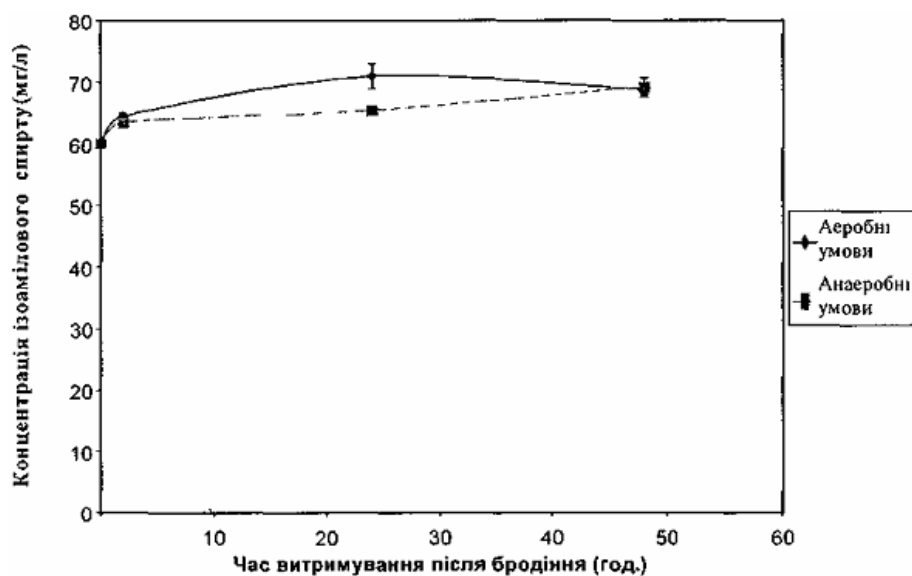
Фіг. 7.17. Залежність середньої концентрації ізоамілацетату від часу витримування після бродіння для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків, одержаних за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних (n=2).



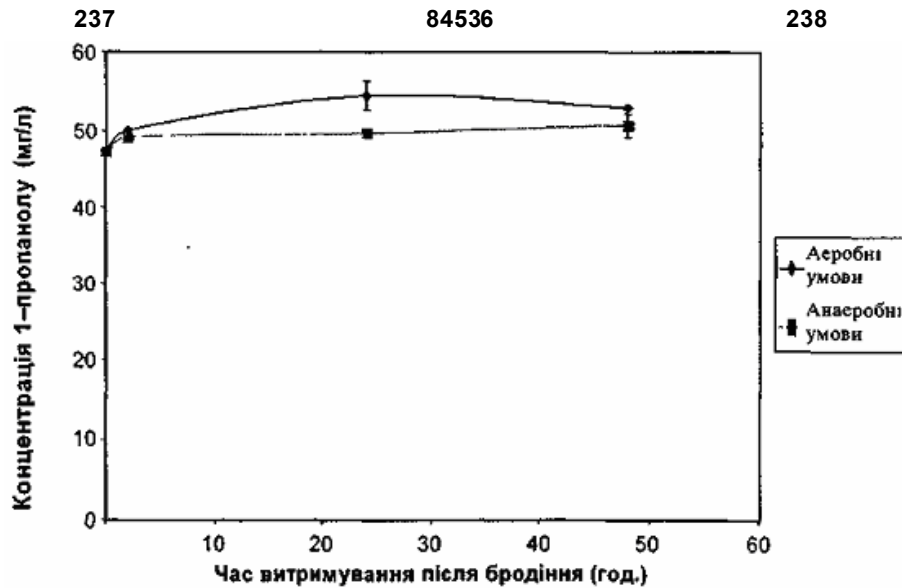
Фіг. 7.18. Залежність середньої концентрації етилгексаноату від часу витримування після бродіння для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків, одержаних за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних (n=2).

На Фіг.7.19-7.21 представлені залежності концентрації ізоамілового спирту, 1-пропанолу і ізобутанолу від часу витримування після бродіння. Після закінчення 48-годинного періоду витримування не виявлено істотних розходжень у вміс-

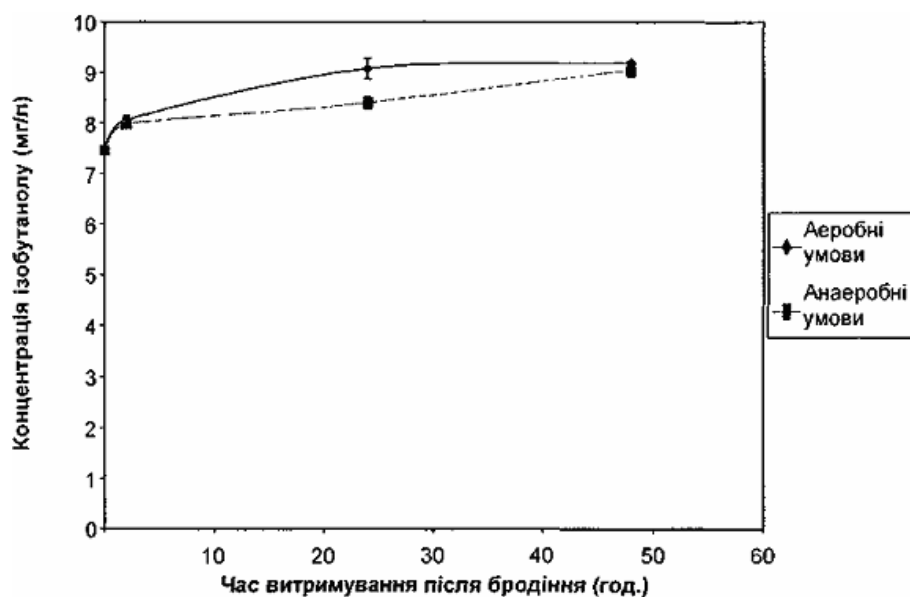
ті зазначених спиртів при обробці зразків в аеробних і анаеробних умовах. Однак у всіх випадках для зразків, які обробляли протягом 24 годин в аеробних умовах, була виявлена більш висока концентрація.



Фіг. 7.19. Залежність середньої концентрації ізоамілового спирту від часу витримування після бродіння для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків, одержаних за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних (n=2).



Фіг. 7.20. Залежність середньої концентрації 1-пропанолу від часу витримування після бродіння для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків, одержаних за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних ($n=2$).



Фіг. 7.21. Залежність середньої концентрації ізобутанолу від часу витримування після бродіння для оброблених в аеробних і анаеробних умовах зразків, одержаних за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. «Вуса» позначають верхню і нижню межі експериментальних даних ($n=2$).

На Фіг.7.22 представлено кругову діаграму, що дозволяє порівнювати концентрації багатьох компонентів, що додають смак, після витримування протягом 48 годин в аеробних і анаеробних умовах із профілем пива, що постачається до продажу. Кругові діаграми широко використовуються в пивоварній промисловості для вивчення і порівняння один з одним на одному графіку декількох різних характеристик пива [Sharpe, 1988]. Дані, представлені на цьому кресленні, свідчать про те, що пиво, одержане за допомогою безперервного процесу бродіння і витримане в анаеробних умовах, за своїми характеристиками найбільш близьке до звичайного пива, що постачається до продажу. З даних, наведених у

додатку 6, можна побачити, що характеристики рідини, що зберігалася в анаеробних умовах, знаходилися в звичайних межах, прийнятих для пива, що постачається до продажу, за винятком вмісту 1-пропанолу, яке було істотно більшим, ніж для одержаних за допомогою періодичного процесу бродіння сортів пива. Такий перевищуючий нормальний рівень вміст 1-пропанолу був виявлений у всіх продуктах, одержаних за допомогою безперервного процесу бродіння при проведенні даного дослідження.

Утворення 1-пропанолу відбувалося на стадії безперервного процесу основного бродіння і протягом періоду витримування не відбувалося істотного зменшення його вмісту незалежно від того,

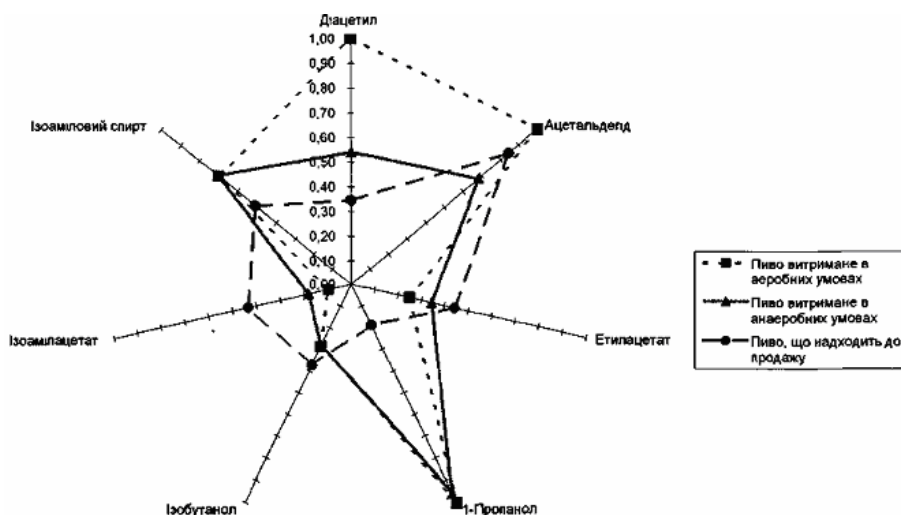
були умови аеробними чи анаеробними. Kunze (1996) встановив, що в процесі періодичного бродіння вміст вищих спиртів, таких як 1-пропанол, підвищують наступні фактори: змішування, інтенсивна аерація сусла і повторне додавання свіжого сусла до наявних дріжджів.

В остаточному підсумку в ідеальному варіанті повинний бути повністю виключений вторинний період витримування в результаті оптимізації умов процесу основного бродіння в біореакторі. Однак при використанні періоду витримування можуть бути одержані додаткові переваги за допомогою оптимізації температури витримування (вилучення діацетилю дріжджами дуже сильно залежить від температури), кількості цукрів, які зброджують, що залишаються в рідині на початку періоду витримування, оптимізації концентрації присутніх дріжджів, гідродинамічних характеристик резервуара для витримування (вилучення діацетилю можна збільшувати покращенням контакту між дріжджами і пивом), а також за допомогою інших засобів, що дозволяють вилучати кисень на цій стадії.

У додатку 3 наведені розрахунки об'ємної продуктивності при виробництві пива. Продуктивність процесу, описаного в даному розділі, що включає роботу біореактора в безперервному режимі, який характеризується часом перебування в біореакторі 24 год., і наступне витримування партії протягом 48 год., у 1,8 рази перевищує продуктивність періодичного процесу, який застосовують в даний час у промисловому масштабі. Порівняно швидкий промисловий періодичний процес з циклом 7,5 днів, характеризується об'ємною продуктивністю при виготовленні пива, що становить $0,093 \text{ м}^3$ виробленого пива/(м^3 об'єму резервуара \times день), у той час як описаний безперервний процес має продуктивність $0,165 \text{ м}^3$ виробленого пива/(м^3 об'єму резервуара \times день). Якщо подальші дослідження дозволять скоротити

період витримування партій до 24 год., то продуктивність при виготовленні пива стане в 2,3 рази більшою за продуктивність при стандартному періодичному процесі. Якщо буде реалізований ідеальний варіант, який полягає в здійсненні 24-годинного безперервного процесу без витримування партій, об'ємна продуктивність при виготовленні пива буде в 7,5 рази вище продуктивності, що досягається при використанні стандартного періодичного процесу. Крім підвищеної об'ємної продуктивності при ретельному збалансованому аналізі відносних витрат на виробництво необхідно враховувати додаткові переваги, які одержують при переході від періодичного до безперервного процесу, такі як більш короткий час до постачання до продажу, зменшення розміру пивоварного заводу і менш часте використання розмноження дріжджів.

Інші дослідники [Kronlof і Virkajarvi, 1996; Nakanishi та ін., 1993; Yamauchi та ін., 1995] зосередили свої зусилля на розробці багатостадійного безперервного процесу бродіння, при якому протягом першої стадії безперервного процесу бродіння (аеробного) відбувається лише часткове поглинання цукрів, які зброджують, що присутні у суслі. Хоча ця стратегія дозволяє досягнути певного успіху з погляду забезпечення смаку, такі системи складні. При використанні такої системи на першій аеробній стадії зростає ризик забруднення мікроорганізмами (внаслідок великої концентрації цукру, високої температури і вмісту кисню, а також внаслідок низьких концентрацій етанолу). У системі на основі газліфтного біореактора, який застосовують в даному дослідженні біореактор відрізняється низькою концентрацією цукру, який зброджують, низьким значенням рН, високою концентрацією етанолу і низькими концентраціями кисню, що створює несприятливі умови для потенційних забруднювачів.



Фіг. 7.22. Кругова діаграма, на якій представлені дані про стандартизовану концентрацію після витримування протягом 48 годин в аеробних або анаеробних умовах партії, одержаної за допомогою безперервного процесу основного бродіння в газліфтному біореакторі. Стандартизовані дані базуються на середніх значеннях, одержаних на зразках у двох повторностях, а дані, що стосуються пива, яке надходить до продажу, являють собою середні значення даних, наведених у додатку 6.

7.2.3 Вплив часу перебування рідини в біореакторі на вміст основних продуктів метаболізму дріжджів при безперервному процесі основного бродіння пива

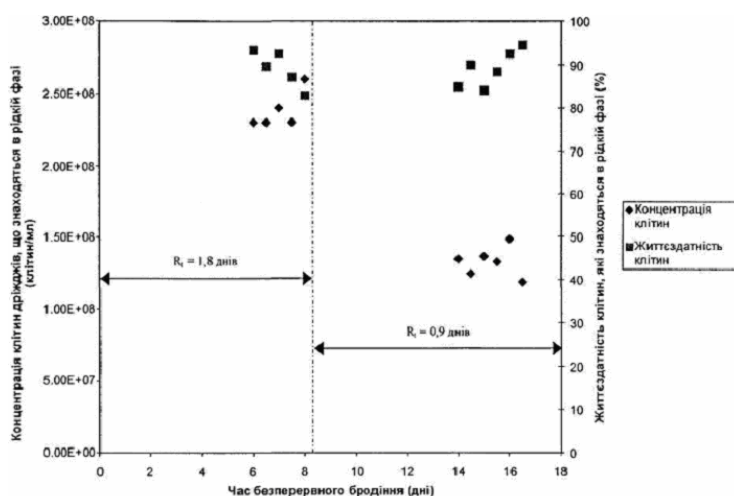
На Фіг.7.23-7.28 представлені результати аналізу зразків, відібраних з рідкої фази біореактора. У таблиці 7.3 наведені середні концентрації і витрати компонентів, які аналізують, у псевдостационарному стані (після здійснення як мінімум

трьох циркуляцій у біореакторі) для двох значень часу перебування рідини в біореакторі в цьому експерименті. Хоча життєздатність дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, істотно не зменшувалася при збільшенні швидкості подачі сусла в біореактор, було встановлено, що концентрація клітин дріжджів змінювалася, як це проілюстровано на Фіг.7.23.

Таблиця 7.3

(а) Узагальнення даних про вплив часу перебування в біореакторі на концентрації дріжджів, які знаходяться в рідкій фазі, в біореакторі і продуктів метаболізму дріжджів, що мають важливе значення, наведені середні значення для псевдостационарного стану; (б) Узагальнення даних про вплив часу перебування в біореакторі на швидкості виходу дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, в біореакторі і продуктів метаболізму дріжджів, що мають важливе значення, наведені середні значення для псевдостационарного стану

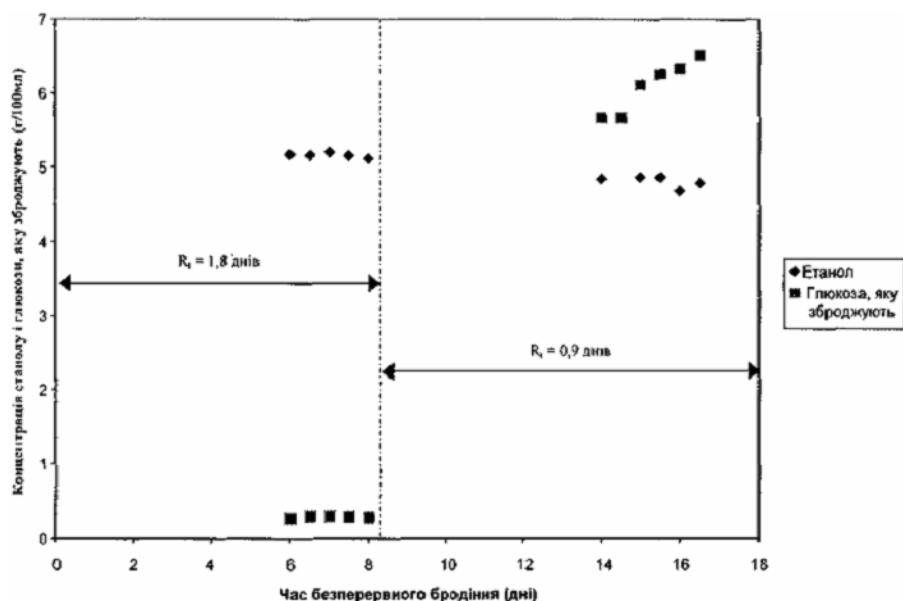
(а) Середнє значення компонента, який аналізували	Час перебування в біореакторі	
Концентрація	1,8 днів	0,9 днів
Концентрація клітин (клітин/мл)	2,38E+08	1,32E+08
Загальна кількість глюкози, яку зброджують (г/100мл)	0,29	6,09
FAN (мг/л)	106,3	246,4
Етанол (г/100мл)	5,16	4,80
Загальна кількість діацетилю (мкг/л)	292	460
Ацетальдегід (мг/л)	19,47	37,07
Етилацетат (мг/л)	41,00	38,29
1-Пропанол (мг/л)	44,95	13,53
Ізобутанол (мг/л)	22,78	9,13
Ізоамілацетат (мг/л)	0,90	1,28
Ізоаміловий спирт (мг/л)	76,67	51,39
(б) Середнє значення компонента, який аналізували	Час перебування в біореакторі	
Швидкість потоку	1,8 днів	0,9 днів
Швидкість потоку клітин (клітин/хв)	7,38E+08	8,22E+08
Загальна кількість глюкози, яку зброджують (г/хв)	8,93E-03	3,72E-01
FAN (г/хв)	3,65E-04	1,50E-03
Етанол (г/хв)	1,60E-01	2,93E-01
Загальна кількість діацетилю (г/хв)	9,06E-07	2,81E-06
Ацетальдегід (г/хв)	6,04E-05	2,26E-04
Етилацетат (г/хв)	1,27E-04	2,34E-04
1-Пропанол (г/хв)	1,39E-04	8,25E-05
Ізобутанол (г/хв)	7,06E-05	5,57E-05
Ізоамілацетат (г/хв)	2,80E-06	7,30E-06
Ізоаміловий спирт (г/хв)	2,38E-04	3,13E-04



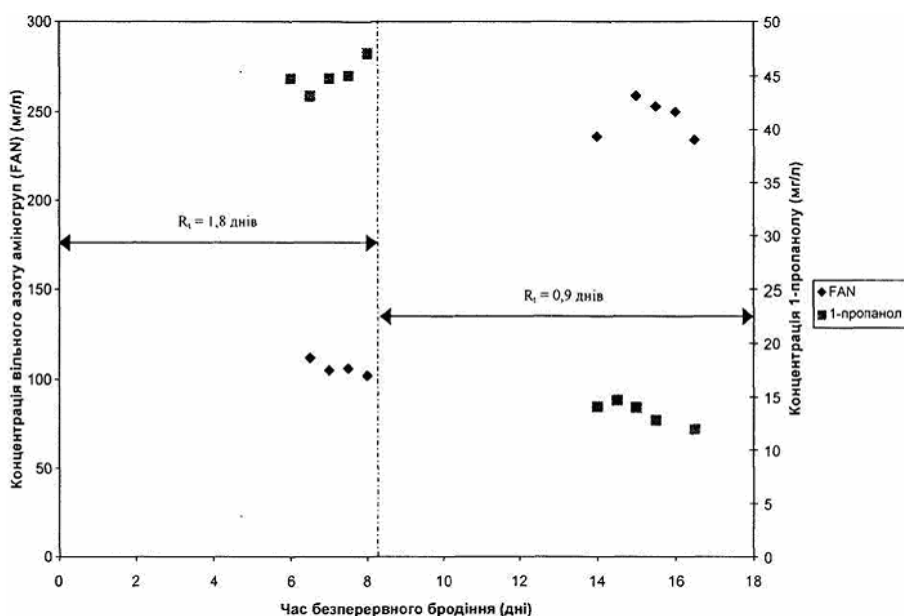
Фіг. 7.23. Залежність концентрації клітин дріжджів, що знаходяться в рідкій фазі, від часу безперервного процесу бродіння, вплив часу перебування рідини в біореакторі. R_t являє собою час перебування рідини в біореакторі в днях.

Дані, представлені на Фіг.7.24 і 7.25, свідчать про те, що концентрації вільного азоту аміногруп (FAN) в суслі, яке застосовують як субстрат і загальна кількість вуглеводів (таких як глюкоза), які зброджують, підвищуються при зменшенні часу перебування в біореакторі від 1,8 до 0,9 днів. З даних про баланс маси, представлених у таблиці 7.4, випливає, що швидкість поглинання загальної кількості вуглеводів (таких як глюкоза), які зброджують, збільшується при зменшенні швидкості поглинання вільного азоту аміногруп, при зменшенні часу перебування в біореакторі. Коефіцієнт виходу, $Y_{P/S}$, етанолу, що є продуктом бродіння субстрату, який зброджують, який являє собою глюкозу, зростає від 0,3 до 0,5 при змен-

шенні часу перебування в рідині. Оскільки в системі розпорошували повітря і діоксид вуглецю, то, очевидно, це супроводжувалося незначними втратами етанолу, який вилучався разом з газовою фазою, що впливало на коефіцієнт виходу, $Y_{P/S}$, внаслідок впливу на баланс етанолу. Результати дослідження, проведеного в співробітництві з Budac і Margaritis (1999) з використанням методу газової хроматографії з мас-спектроскопією (ГХ-МС) якісно підтвердили наявність летучих речовин, що додають пиву смак, які включають етанол, ацетальдегід, етилацетат і ізоамілацетат у просторі над рідиною в біореакторі при безперервному процесі бродіння.



Фіг. 7.24. Залежність концентрації етанолу і глюкози, яку зброджують, що знаходяться в рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив часу перебування в біореакторі. R_t являє собою час перебування рідини в біореакторі в днях.



Фіг. 7.25. Залежність вмісту вільного азоту аміногруп у рідкій фазі і концентрації 1-пропанолу від часу безперервного бродіння, вплив часу перебування рідини в біореакторі. R_t являє собою час перебування рідини в біореакторі в днях.

Таблиця 7.4

Баланси маси вільного азоту аміногруп і вмісту загального вуглеводу (такого як глюкоза), який зброджують, одержані на основі середніх значень, наведених у таблиці 7.3, вплив часу знаходження в реакторі

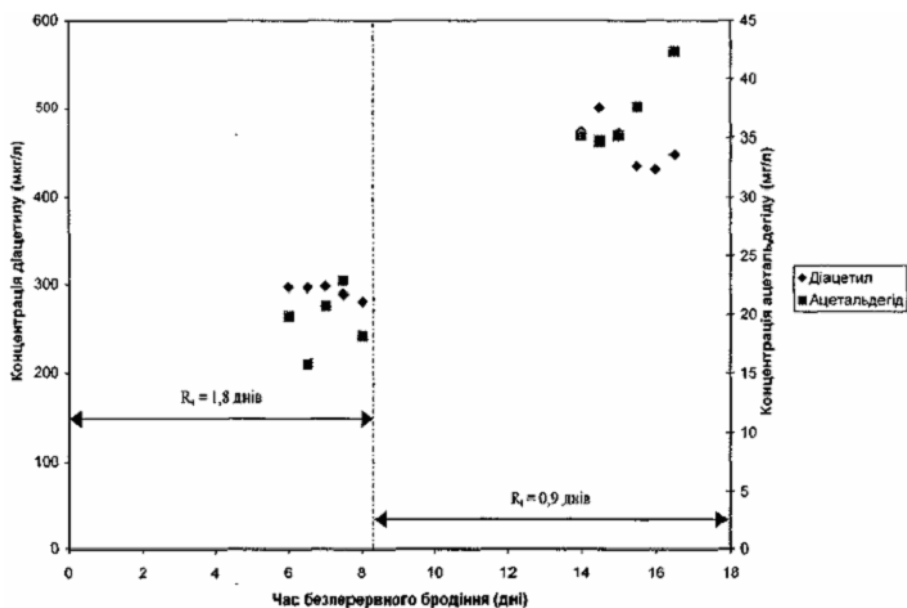
Час знаходження в реакторі	1,8 дня	0,9 дня	1,8 дня	0,9 дня
	Вільний азот аміногруп (г/хв)		Загальний вміст глюкози, яку зброджують (г/хв)	
На вході*	8,84E-04	1,74E-03	4,71E-01	9,26E-01
На виході	3,65E-04	1,50E-03	8,93E-03	3,72E-01
Поглинання (ΔS)	5,18E-04	2,35E-04	4,62E-01	5,54E-01
Коефіцієнт виходу ($Y_{P/S}$)			0,3	0,5

* Концентрації на вході відповідають даним, які наведено у додатку 1

Концентрація продукту бродіння, етанолу, у рідкій фазі зменшувалася при східчастій зміні часу перебування рідини в реакторі. Однак з урахуванням швидкості витрати система в цілому виробляла більшу кількість етанолу при більш короткому часі перебування рідини в реакторі. Оскільки ціль даної роботи полягала не тільки у виробництві одного етанолу, а в одержанні пива, що має склад, у якому збалансовано багато компонентів, то збільшення виробництва етанолу необхідно збалансувати з урахуванням других факторів. Наприкінці промислового процесу основного бродіння пива повинна бути поглинена

більша частина субстрату, який являє собою глюкозу, яку зброджують.

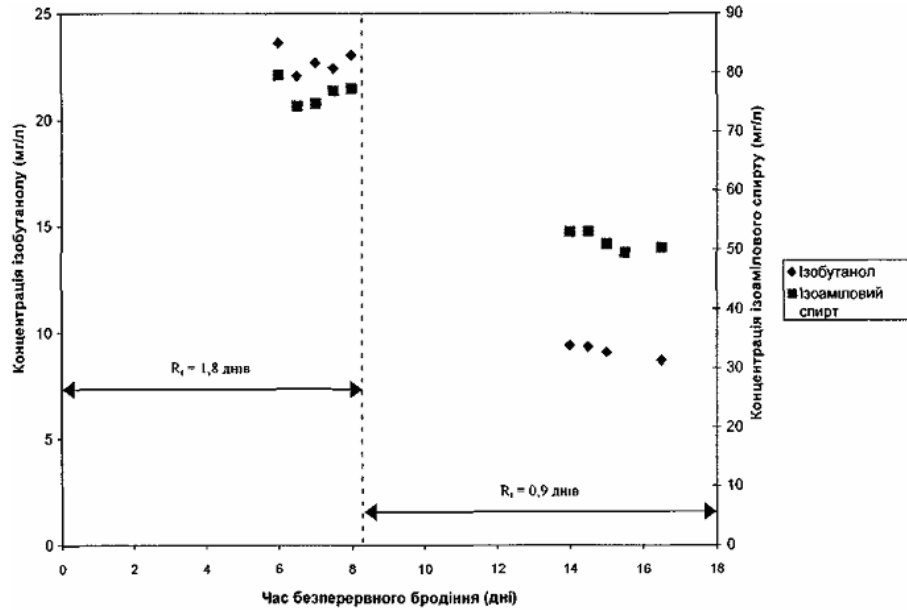
На Фіг.7.26, представлені дані про вплив східчастої зміни швидкості потоку суслу на концентрацію ацетальдегіду і загальну концентрацію діацетилю. Концентрація і швидкість утворення обох аналізованих компонентів зростали при зменшенні часу перебування рідини в реакторі. При періодичному процесі бродіння пива екскреція ацетальдегіду дріжджами відбувалася протягом перших декількох днів бродіння [Kunze, 1996].



Фіг. 7.26. Залежність загальної концентрації діацетилю й ацетальдегіду в рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив часу перебування рідини в біореакторі. R_t являє собою час перебування рідини в біореакторі (у днях).

На Фіг.7.25 і 7.27 проілюстрований вплив зменшення часу перебування в біореакторі на концентрації вищих спиртів 1-пропанолу, ізобута-

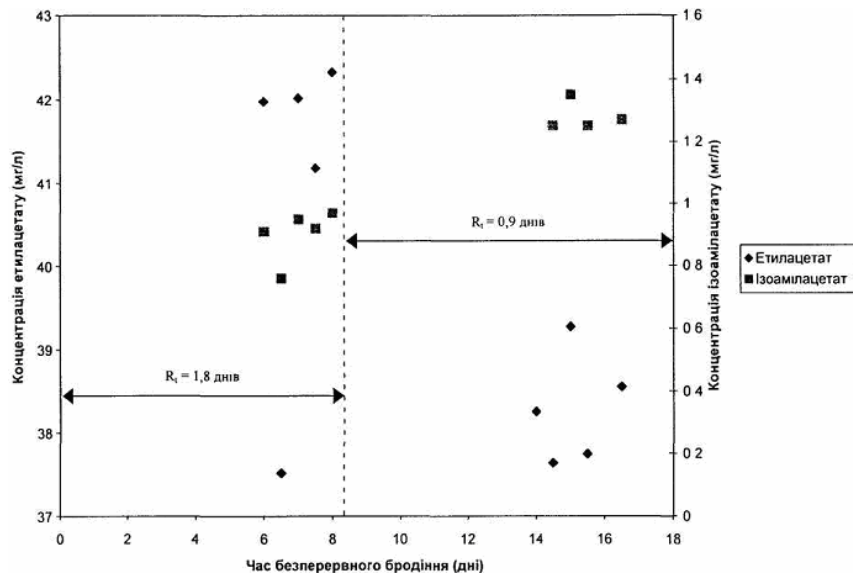
нолу, ізоамілового спирту в рідкій фазі. Концентрації всіх трьох вищих спиртів зменшувалися при зменшенні часу перебування в біореакторі.



Фіг. 7.27. Залежність концентрації ізобутанолу та ізоамілового спирту в рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив часу перебування рідини в біореакторі. R_t являє собою час перебування рідини в біореакторі (у днях).

Швидкості витрати етилацетату та ізоамілацетату, представлені в таблиці 7.3 (б), збільшувалися при зменшенні часу перебування в рідині. Дані, наведені на Фіг.7.28, свідчать про те, що концентрація етилацетату в рідкій фазі знижувалася, а концентрація ізоамілацетату підвищувалася. Оскільки умови в даному експерименті до-

зволяли збільшувати ріст клітин, які знаходяться в рідкій фазі, без підвищення подачі кисню в систему, то такі умови в біореакторі стимулювали утворення складних ефірів. Hough і ін. (1982) встановили, що збільшений ріст клітин і умови із зниженим вмістом кисню стимулюють утворення складних ефірів.



Фіг. 7.28. Залежність концентрації етилацетату та ізоамілацетату в рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив часу перебування рідини в біореакторі. R_t являє собою час перебування рідини в біореакторі (у днях).

7.2.4 Застосування препарату, який знаходиться в продажу, альфа-ацетолатдекарбоксилази для зменшення вмісту загального діацетилю в процесі безперервного основного бродіння пива

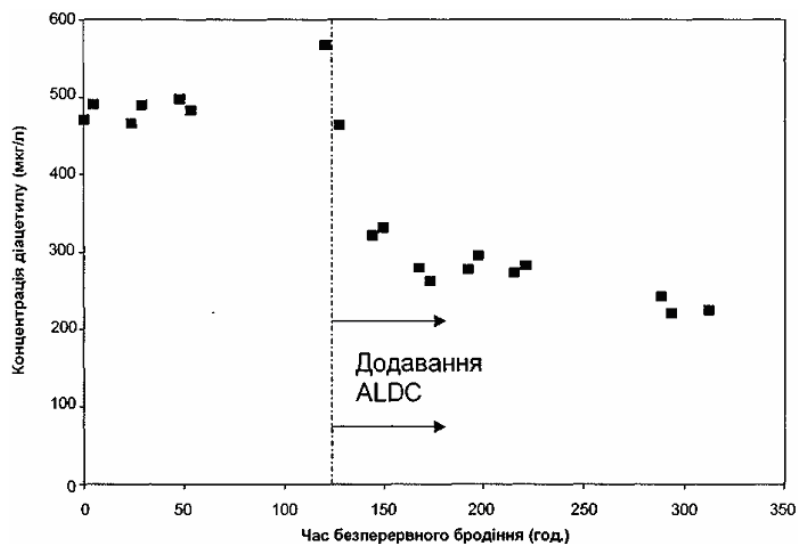
Експеримент 1: Біореактор виявився забрудненим зростаючими в аеробних умовах грампозитивними коками до того, як експеримент був закінчений. Було встановлено, що був забрудне-

ний саме біореактор, оскільки мікробіологічний аналіз сусла, що надходить, не виявив забруднення. Це свідчить про необхідність модернізації біореактора з метою забезпечення більш надійного захисту від забруднення. Однак перед відключенням системи було встановлено, що після додавання ALDC у сусло, що надходить, відбувалося зменшення вмісту загального діацетилю. На жаль, не виявилось можливим зробити які-небудь

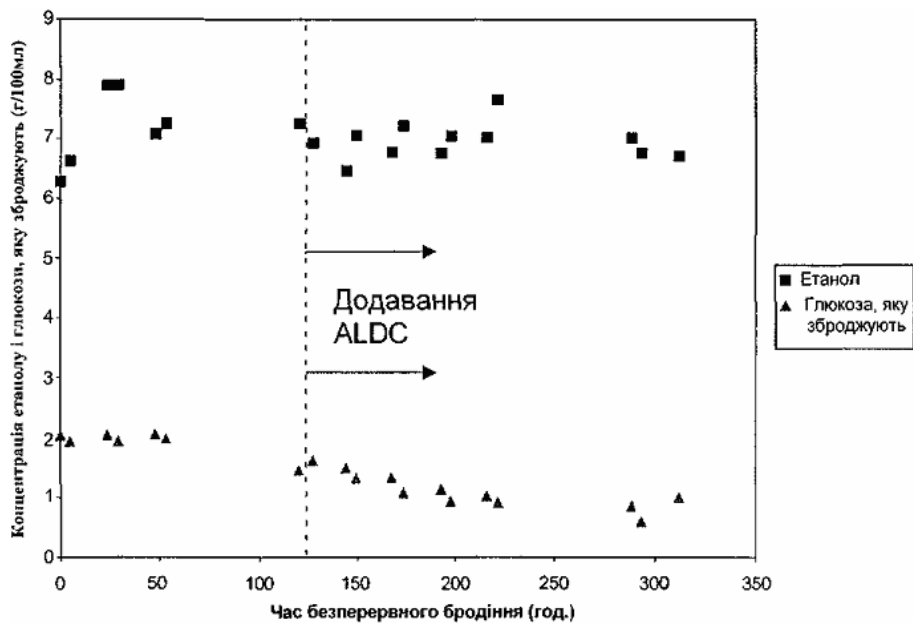
висновки з цих даних внаслідок плутанини, викликані забрудненням біореактора.

Експеримент 2: Після численних модернізацій біореактора система працювала без забруднення протягом експерименту 2. Результати цього експерименту приведені на Фіг.7.29-7.31. У таблиці 7.5 узагальнені дані про середні псевдостационарні загальні концентрації діацетилю до і після додавання ALDC у сусло. Після додавання ALDC у сусло загальна концентрація діацетилю знижувалася на 47%, що свідчить про перспекти-

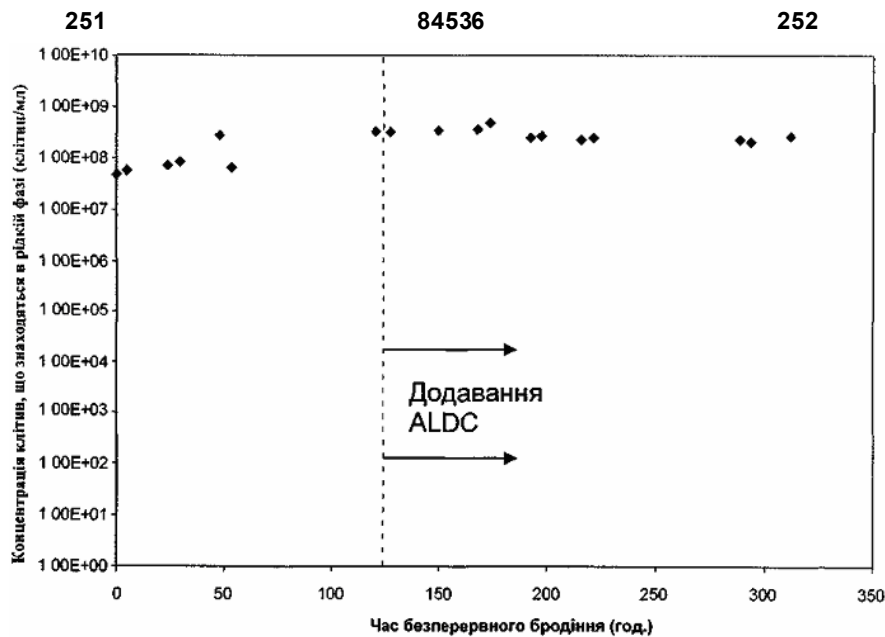
вність застосування цього ферменту в майбутньому (приведені середні значення одержані після трьох циклів циркуляції в біореакторі). Як впливає з даних, наведених на Фіг.7.30 і Фіг.7.31, у ході дослідів відбувалася деяка зміна загального вмісту вуглеводів (таких як глюкоза), які зброджують, і концентрації клітин, що могло бути викликане невеликими розходженнями в складі сусла, яке подавали в біореактор до і після додавання ALDC.



Фіг. 7.29. Залежність загальної концентрації діацетилю в рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив додавання ALDC до сусла, яке зброджують, експеримент 2.



Фіг. 7.30. Залежність концентрації вуглеводу (такого як глюкоза), який зброджують, у рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив додавання ALDC до сусла, яке зброджують, експеримент 2.

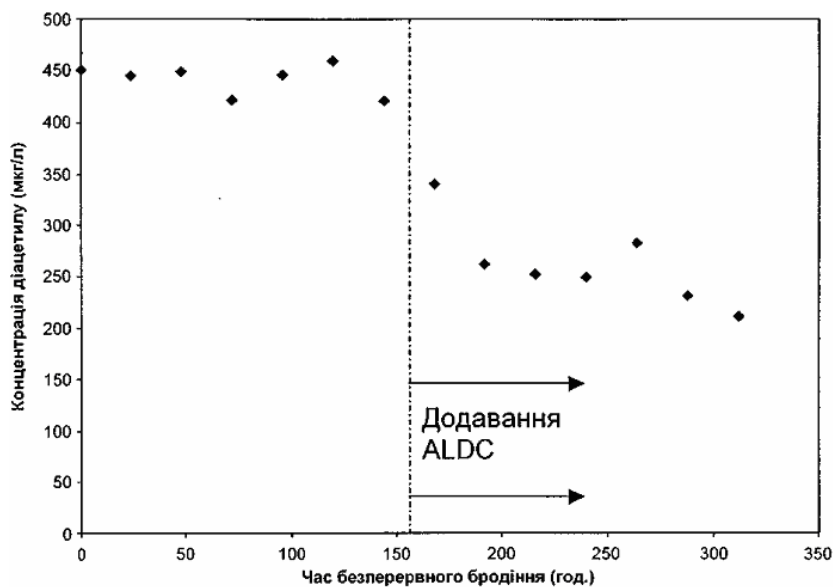


Фіг. 7.31. Залежність концентрації клітин, що знаходяться в рідкій фазі, від часу безперервного бродиння, вплив додавання ALDC до сусла, яке зброджують, експеримент 2.

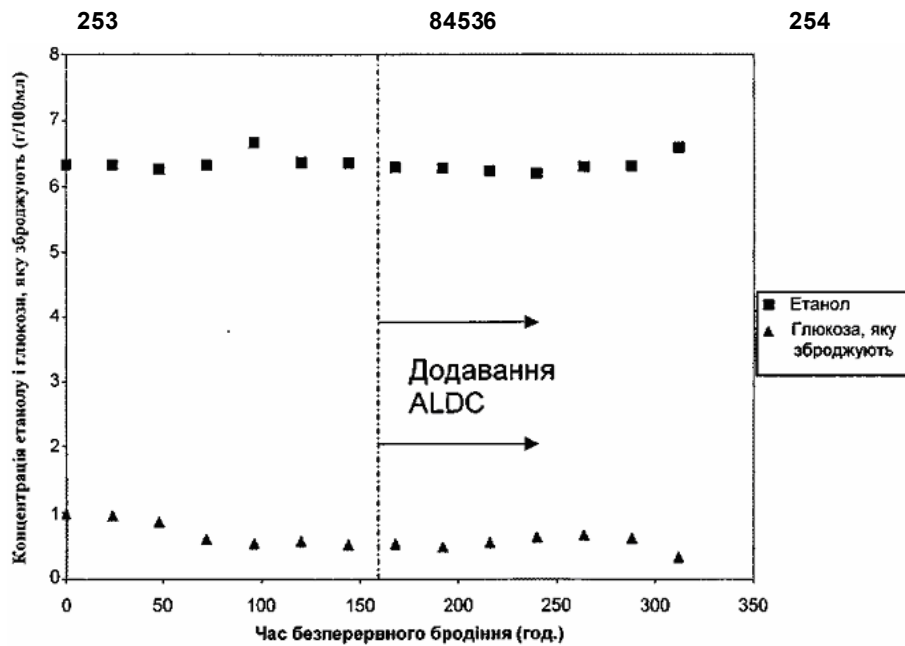
Для того, щоб усунути можливий вплив, що приводить до погіршень, варіабельності складу сусла, у ході експерименту 3 була зібрана велика кількість сусла, що поставляється пивоварним заводом (14гп) і ALDC додавали безпосередньо в цей резервуар для витримування після досягнення основного псевдостационарного стану. Це виключало в подальшому всі потенційні розходження в складі сусла, що могли впливати на продуктивність процесу бродиння в експерименті 2. Цей резервуар для зберігання сусла був оснащений також пристроєм для розпилення діоксиду вуглецю, так що рівні розчиненого кисню в суслі, яке подавали, підтримували на достатньо низькому рівні.

Експеримент 3: На Фіг.7.32-7.34 проілюстровано вплив додавання ALDC до сусла, яке подають, на вміст загальної кількості діацетику, загальної

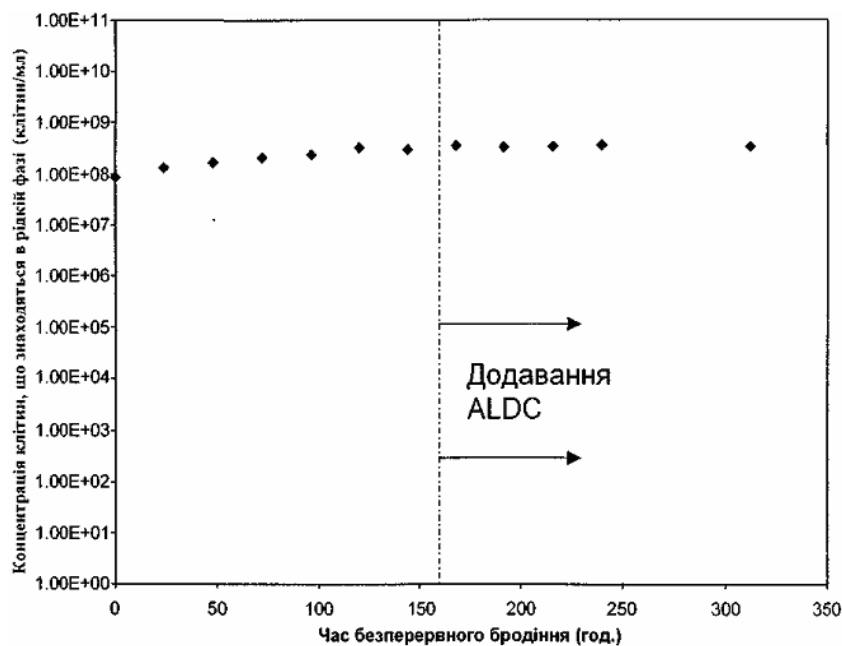
кількості вуглеводів (таких як глюкоза), які зброджують, етанолу і концентрацію вільно суспендованих клітин у процесі безперервного бродиння пива. У таблиці 7.6 наведені також середні концентрації діацетику в псевдостационарному стані до і після додавання ALDC у сусло, яке подають (середні значення одержані після трьох циклів циркуляції в біореакторі). У ході цього експерименту жодного разу не було виявлено забруднення. Після додавання ALDC концентрація загальної кількості діацетику зменшувалася на 45%. Не було виявлено істотних розходжень у вмісті етанолу, загальної кількості вуглеводів (таких як глюкоза), які зброджують або концентрації вільно суспендованих клітин, що погоджується з даними, отриманими Aschengreen і Jepsen (1992) при періодичному процесі бродиння.



Фіг. 7.32. Залежність концентрації загальної кількості діацетику в рідкій фазі від часу безперервного бродиння, вплив додавання ALDC до сусла, яке зброджують, експеримент 3.



Фіг. 7.33. Залежність концентрації етанолу і загальної кількості цукрів (таких як глюкоза), які зброджують у рідкій фазі від часу безперервного бродіння, вплив додавання ALDC до сусла, яке зброджують, експеримент 3.



Фіг. 7.34. Залежність концентрації клітин, що знаходяться в рідкій фазі, від часу безперервного бродіння, вплив додавання ALDC до сусла, яке зброджують, експеримент 3.

Результати експериментів 2 і 3 свідчать про те, що ALDC впливає на загальну концентрацію діацетилу в процесі безперервного бродіння в газліфтних біореакторах, приводячи до зменшення загальної концентрації діацетилу в середньому на 46%. Це дає можливість зменшувати або усувати вторинний процесинг для відновлення діацетилу в безперервних газліфтних системах. У зазначених перших експериментах застосовували відносно високі дози ALDC, і може виникнути необхідність в оптимізації кількості, методу і часу введення доз ALDC у сусло, якби цей фермент був вибраний для застосування в такому процесі. Можна було б одержувати додаткові переваги в тому випадку, якби для умов бродіння

в пивоварстві був би доступний фермент із більш високою активністю або якби сам фермент був іммобілізований, що дозволяло б повторно його використовувати (Dulieu та ін., 1996). Іншим аспектом є схвалення суспільством застосування ферментних добавок, одержаних з використанням генетично модифікованих організмів.

При дозі, яку рекомендує постачальник, 2кг/1000гл і вартості препаратів ферменту, що надходить до продажу, яка становить \$131,05/кг, до матеріальних витрат на бродіння потрібно додати \$0,26/гл. У наведених експериментах доза ферменту становила 72мкг/л (108ADU/л) або 7,2кг/1000гл ALDC, що приводило до додаткових матеріальних витрат \$0,94/гл. Економічний ефект

від використання ALDC для відновлення діацети-лу при безперервних процесах бродіння в газліф-терних системах повинен залежати від оптима-

льної дози ферменту, яку застосовують в біореакторі і від часу, зекономленого за рахунок цього.

Таблиця 7.5

Узагальнення даних про вплив додавання ALDC до середовища, яке зброджують, що містить сусло на кон-центрацію загального діацети-лу в псевдостационарному стані при безперервному бродінні пива в газліфте-рному біореакторі

Експеримент	Середній загальний вміст діацети-лу		Відсоток
	Концентрація (мкг/л)		Діацетил
	(при відсутності ALDC)	(ALDC, 60мкл/л)	Відновлення
Експеримент II	495	260	47
Експеримент III	445	245	45

* середні значення, одержані на основі величин у псевдостационарному стані після трьох циклів цирку-ляції

Вищевикладені дані підтверджують припу-щення про те, що безперервне бродіння з вико-ристанням іммобілізованих дріжджів і асоційова-них вільних клітин у системі газліфтерного біореактора з трубою для відсмоктування є ре-альною альтернативою методу періодичного бро-діння при виробництві пива, який виражається в наступному:

- Відповідність смаку необхідним нормам.
- Більш висока об'ємна продуктивність біоре-актора.
- Мінімальна складність.
- Продемонстровано можливість безперерв-ної роботи протягом тривалого часу.
- Можливість контролю смаку шляхом кон-тролю вмісту повітря (кисню) у газі, що псевдозрі-джує.
- Можливість додавання ферменту α -ацетолататдекарбоксилази для контролю необ-хідного вмісту діацети-лу.
- Відсутність бактеріального забруднення.
- Фінансові переваги.

Дотепер існує багато проблем, що вимагають подальшого вивчення, однак технологія придатна для того, щоб її можна було тестувати при більш великомасштабному виробництві. Газліфтерні біореактори уже використовують у промисловому масштабі для обробки стічних вод, це дозволяє вважати, що перспективи застосування системи безперервного бродіння пива в більш великих масштабах є технічно реалізованими. Пивоварна фірма Grolsch у Нідерландах опублікувала дані про застосування газліфтерного біореактора об'-ємом 230м³ для обробки стічних вод, що утво-рюються на їхньому заводі [Driessen та ін., 1997]. Одним з найбільших перешкод при переході до використання безперервного бродіння в промис-ловому масштабі в пивоварній промисловості може бути одержання схвалення броварниками нового процесу, оскільки дана галузь промисло-вості має дуже древні традиції.

Дані, одержані при вивченні вторинних про-дуктів метаболізму дріжджів, які утворюються при безперервному бродінні пива, яке здійснювали в даному дослідженні, свідчать про важливість кон-тролю вмісту кисню в газі, що псевдозріджує для формування смаку пива. Результати свідчать про

те, що в конкретних робочих умовах підвищення вмісту повітря в поступаючому у біореактор газі, що псевдозріджує приводили до підвищення кон-центрацій ацетальдегіду, діацети-лу і вищих спир-тів (ізоамілового спирту і ізобутанолу), тоді як концентрації складних ефірів (ізоамілацетату, етилгексаноату, етилоктаноату) і етанолу знижу-валися. Ці дані дозволяють припустити, що існує можливість контролю смаку пива за допомогою складу газу, що псевдозріджує, який подається в біореактор, що дозволяє робити унікальні проду-кти.

За винятком варіанта, коли повітря не входи-ло до складу газу, який псевдозріджує, у рідкій фазі біореактора концентрація вільно суспендо-ваних клітин зберігалася на рівні, що перевищує 10⁸клітин/мл. Таким чином, у біореакторі одноча-сно співіснувало більш однієї популяції клітин дріжджів, тобто іммобілізовані дріжджі і дріжджі, суспендовані в рідкій фазі. Завдяки великим кіль-костям життєздатних дріжджів, що ростуть у рід-кій фазі біореактора, є можливість використання біореактора безперервної дії як апарата для рос-ту дріжджів.

Коли після безперервного основного бродін-ня додатково використовували 48-годинний пері-од витримання партії, то одержували букет смаку, який відповідає нормам, що існують для сортів пива, які надходять до продажу. Темпера-тура протягом цього періоду витримання ста-новила 21°C, і при цьому експериментально була продемонстрована важливість мінімізації ступеня впливу кисню на рідину протягом періоду збері-гання з погляду досягнення необхідного смаку. Введення додаткового періоду витримання подовжувало на два дні тривалість процесу і до-датково ускладнювало його, однак його трива-лість все ще була істотно меншою, ніж при про-мислових періодичних процесах бродіння, які вимагають від 7 до 14 днів.

В кінцевому підсумку в ідеальному варіанті вторинний період витримання повинний бути повністю усунутий за рахунок оптимізації умов головного безперервного бродіння в біореакторі.

Однак уже найближчим часом можна досягти додаткового зменшення часу вторинного витри-мування шляхом оптимізації температури витри-

мування (вилучення діацетику дріжджами дуже сильно залежить від температури), кількості цукрів, які зброджують, що залишаються в рідині на початку періоду витримання, оптимізації концентрації присутніх дріжджів, гідродинамічних характеристик резервуару для витримання (вилучення діацетику можна збільшувати покращенням контакту між дріжджами і пивом), а також за допомогою інших засобів, що дозволяють усувати кисень на цій стадії.

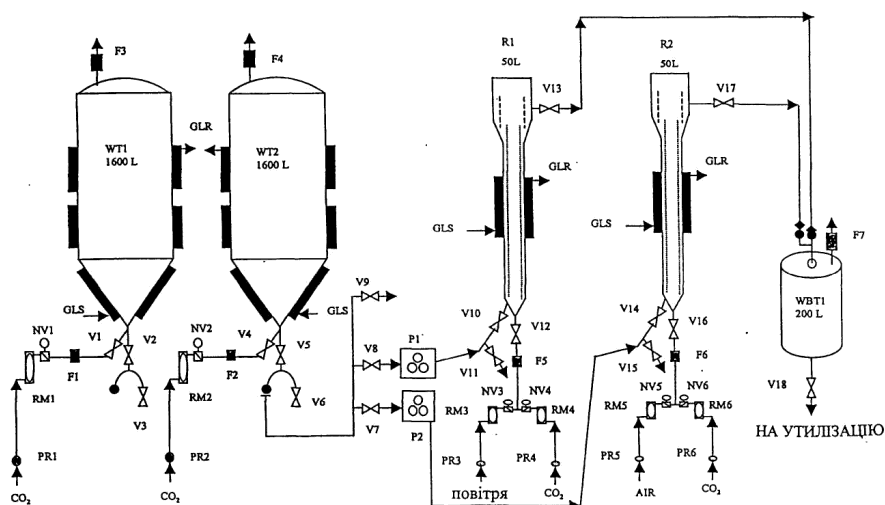
Інші дослідники [Kronlöf і Virkajärvi, 1996; Nakanishi та ін., 1993; Yamauchi та ін., 1995] зосередили свої зусилля на розробці багатостадійних безперервних процесів бродіння, при яких протягом першої стадії безперервного процесу бродіння (аеробного) відбувається лише часткове поглинання цукрів, які зброджують, що присутні у суслі. Хоча ця стратегія дозволяє досягнути певного успіху з погляду забезпечення смаку, такі системи є складними. Крім того, на першій аеробній стадії такої системи створюється навколишнє середовище, яке більш чуттєве до забруднення мікроорганізмами (внаслідок високої концентрації цукру, температури і вмісту кисню, а також унаслідок низьких концентрацій етанолу). Бродіння в газліфтному біореакторі, представленому в даному описі, відрізняється низькою концентрацією цукру, низьким значенням рН, високою концентрацією етанолу і низькими концентраціями кисню, що створює несприятливі умови для потенційних забруднювачів.

Для недостатньо досконалих пивоварних заводів зменшення складності виробництва і розробка працездатного, стійкого відносно забруднення процесу є важливим фактором успіху.

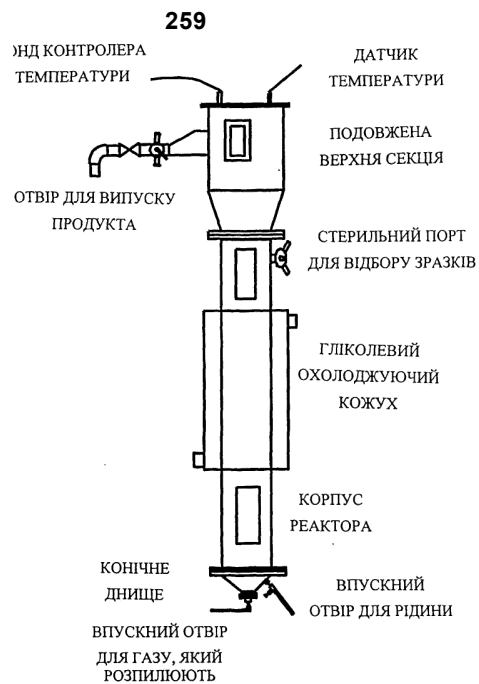
Додавання препарату, що є у продажу, альфа-ацетолактатдекарбоксилази (ALDC) до сусла, що подають у біореактор при безперервному бродінні, приводить до зменшення середнього вмісту діацетику на 46%. Однак, оскільки ALDC являє собою фермент, що продукується генетично модифікованим організмом (ГМО), потрібно

звертатися до громадських організацій для одержання дозволу перед застосуванням такого ферменту як продукту, що надходить до продажу. Крім того, ферменти, що є в продажу, які можна застосовувати для контролю вмісту діацетику, не мають оптимальної активності в умовах бродіння.

Після 6 місяців безперервного бродіння з використанням іммобілізації за допомогою каппа-карагінанового гелю життєздатність вільно суспендованих клітин залишалася вище 90%, у той час як життєздатність іммобілізованих клітин зменшувалася до менше ніж 60%. За допомогою растрової електронної мікрофотографії встановлено, що клітини, які знаходяться в периферичній області гелевої гранули, мали численні брунькові перегородки і правильну морфологію, у той час як клітини, які знаходяться поблизу ядра гранули, мали неправильну форму і меншу кількість брунькових перегородок, що, імовірно, погіршувало їх ріст. На основі мікрофотографій можна припустити також, що клітини дріжджів, які знаходяться поблизу ядра гранули, мали ознаки старіння. Як відзначалося в розділі 5, каппа-карагінановий гель має багато характеристик, що роблять його привабливим з погляду застосування як іммобілізуючої матриці для дріжджів. Однак у даний час не існує промислового методу, придатного для виготовлення гранул і внаслідок того, що захоплення клітин дріжджів матрицею є частиною процесу виготовлення гранул, використання гранул на заводі, що робить промислову продукцію, приводить до підвищення складності виробництва і збільшенню вартості. У майбутньому варто дослідити інші методи іммобілізації, такі як самоагрегація або флокуляція. Застосування таких методів дозволило б уникнути збільшення складності маніпуляцій із гранулами при використанні заводського обладнання і, якщо флокуляти регулярно руйнувати, то можна гарантувати, що старі клітини будуть регулярно вилучатися з біореактора.

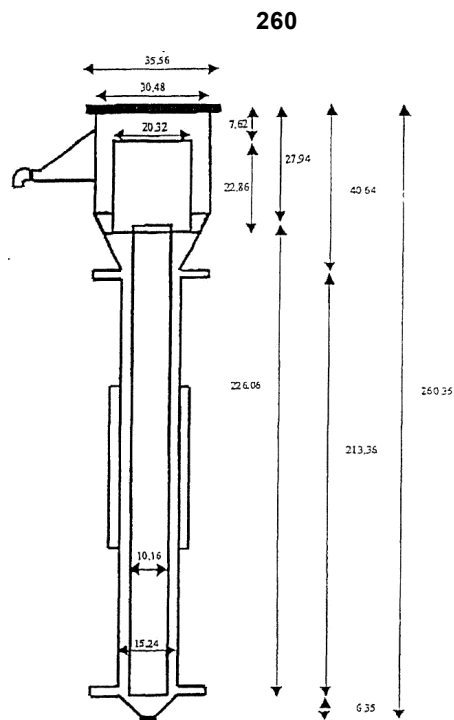


ФІГ. 1

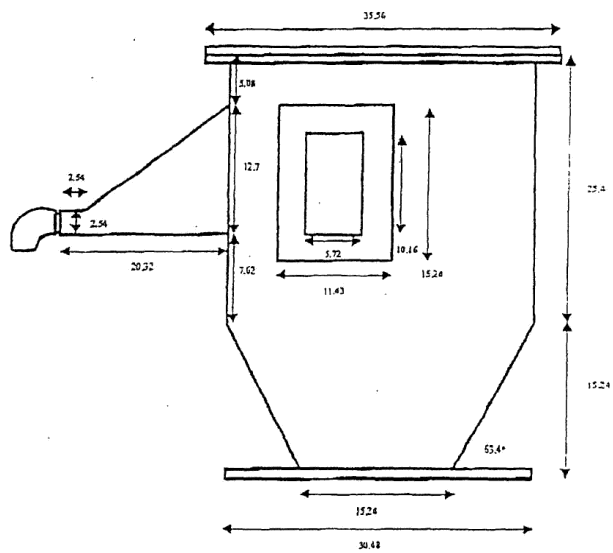


ФІГ. 2

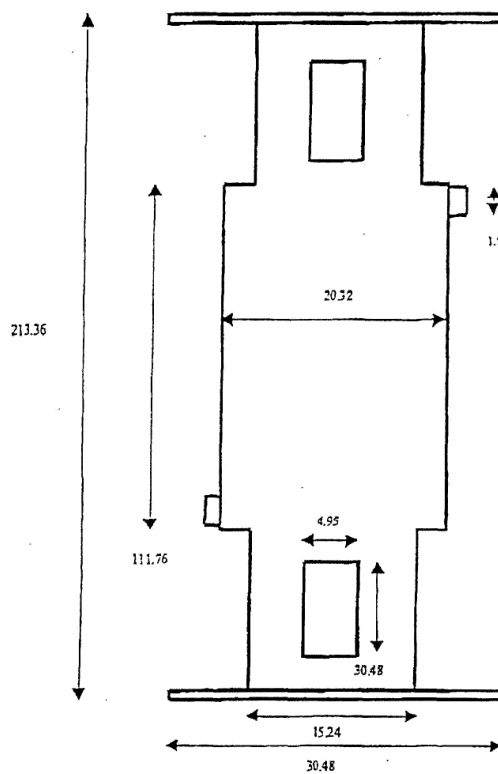
84536



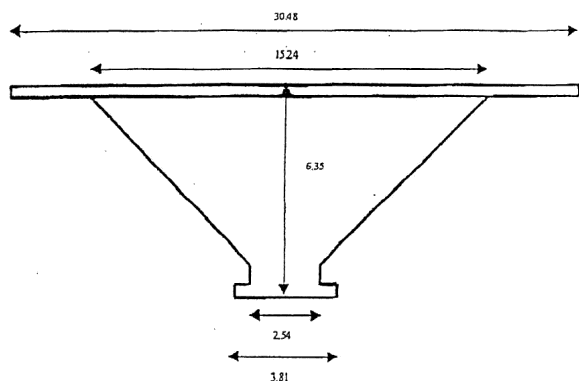
ФІГ. 3



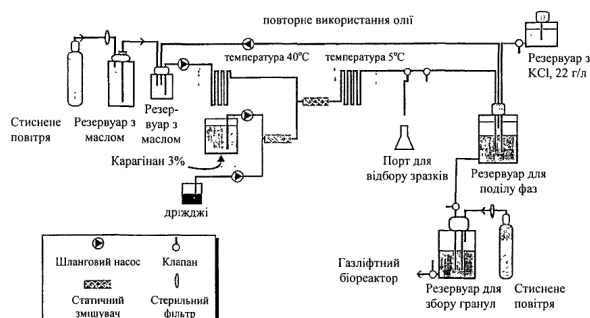
ФІГ. 4



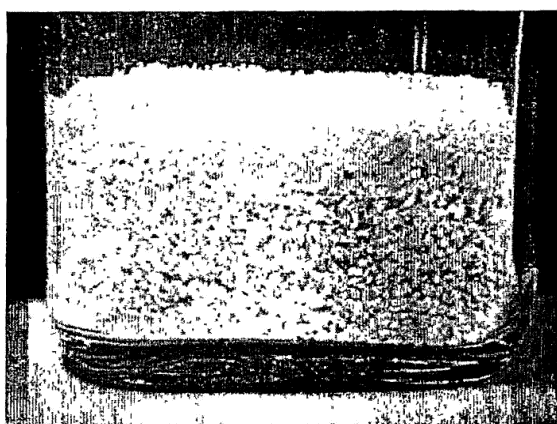
ФІГ. 5



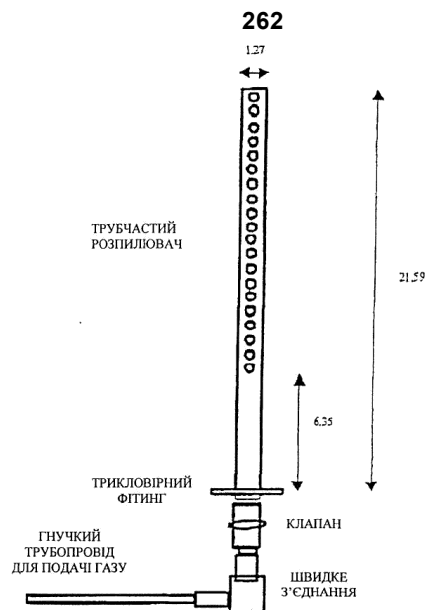
ФІГ. 6



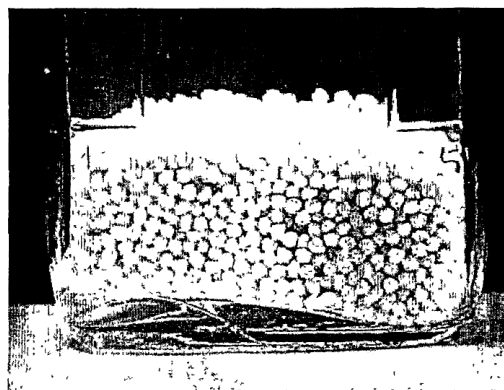
ФІГ. 8



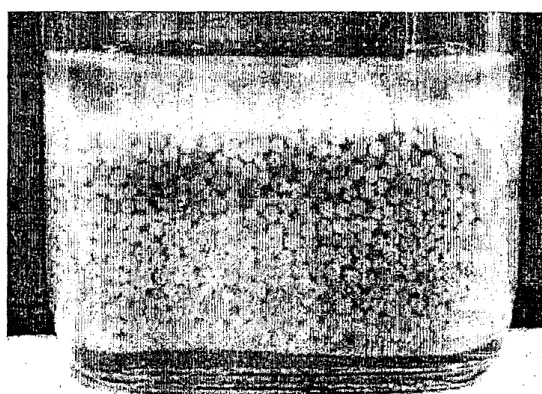
ФІГ. 10



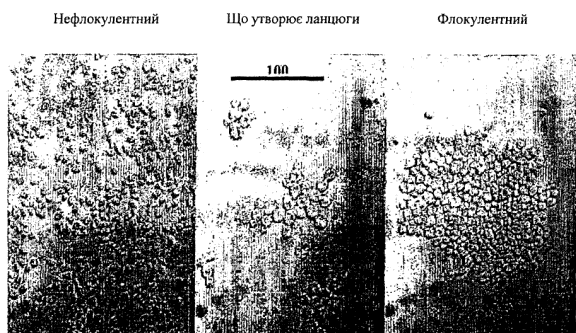
ФІГ. 7



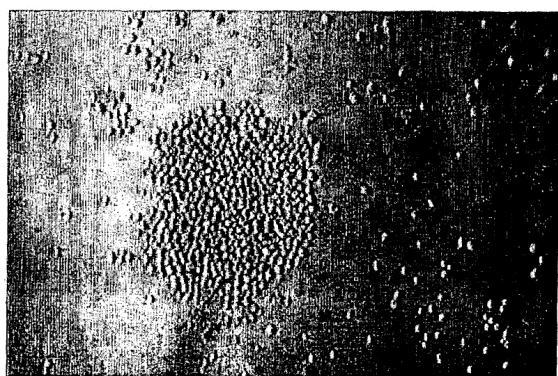
ФІГ. 9



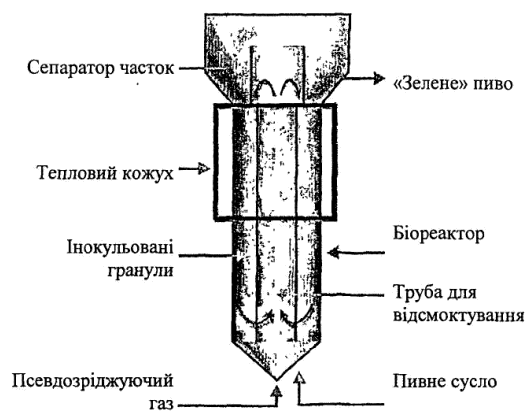
ФІГ. 11



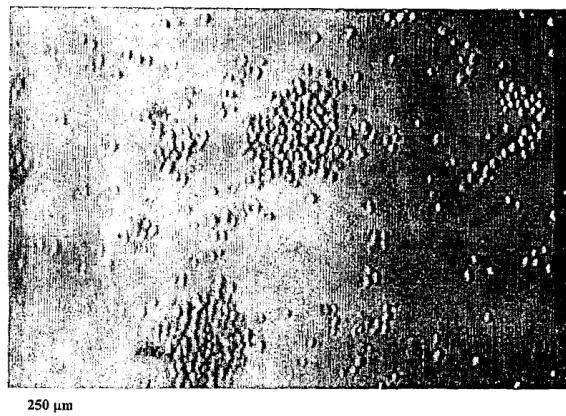
ФІГ. 12



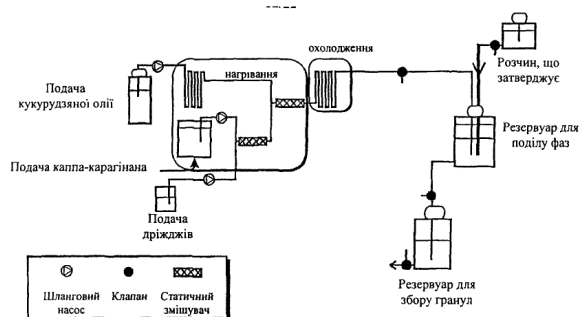
ФІГ. 14



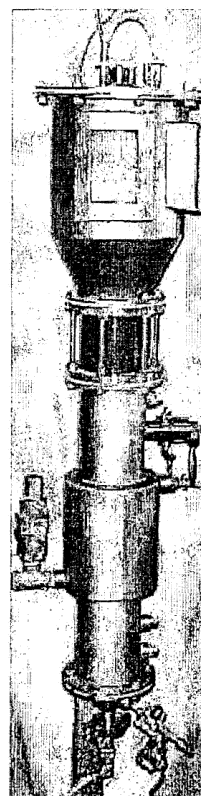
ФІГ. 16



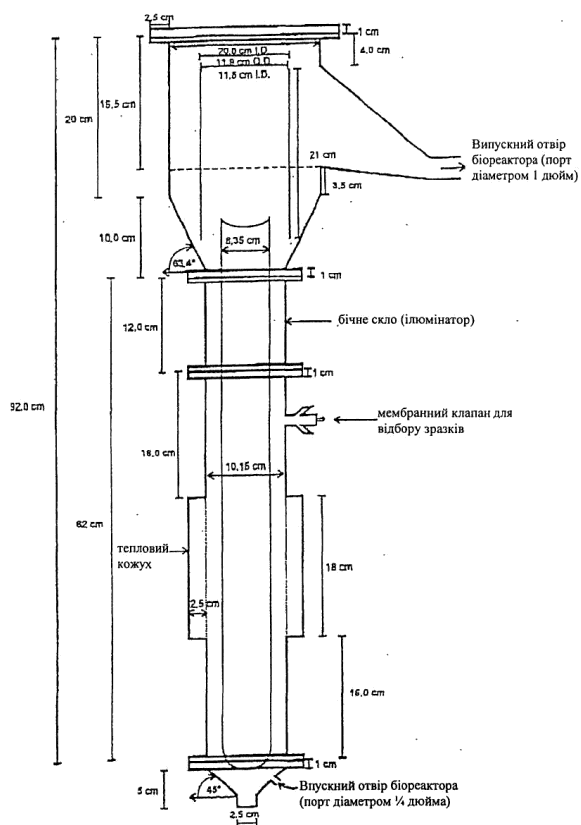
ФІГ. 13



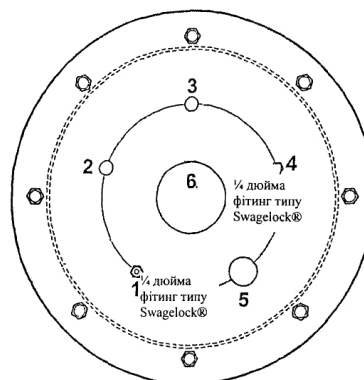
ФІГ. 15



ФІГ. 17



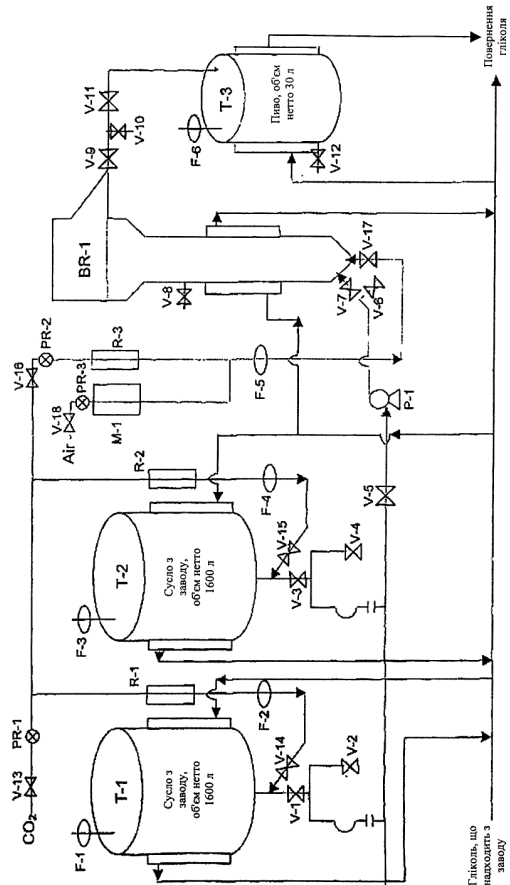
ФІГ. 18



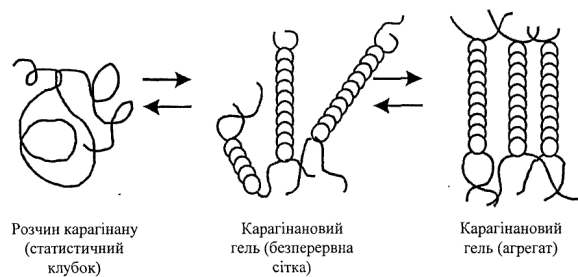
ФІГ. 19



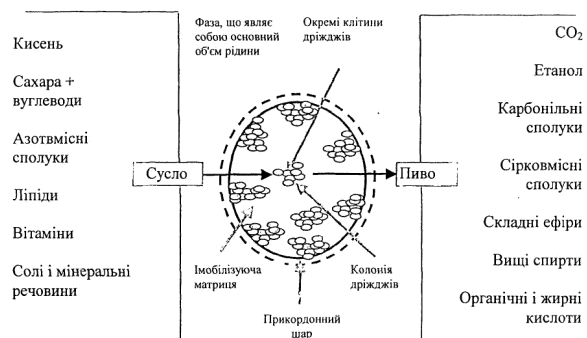
ФІГ. 20



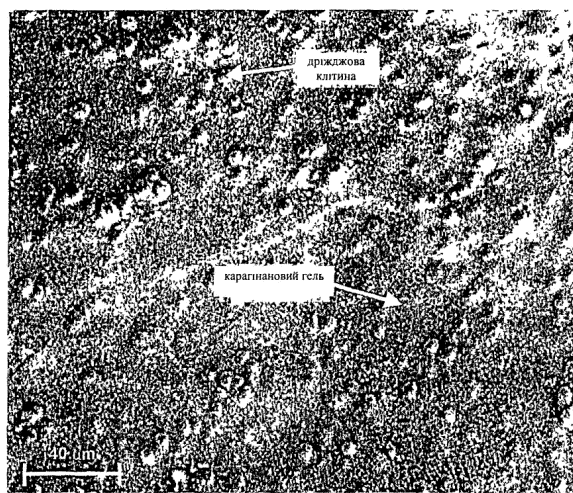
ФІГ. 21



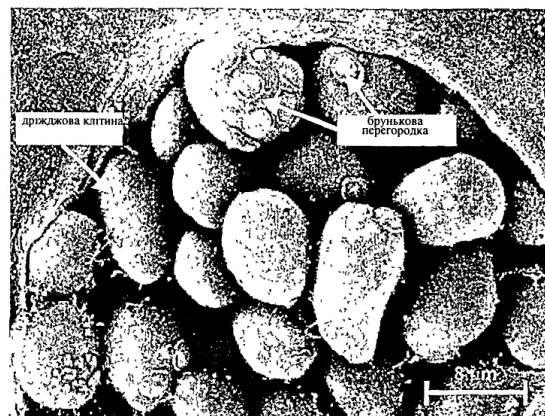
ФІГ. 22



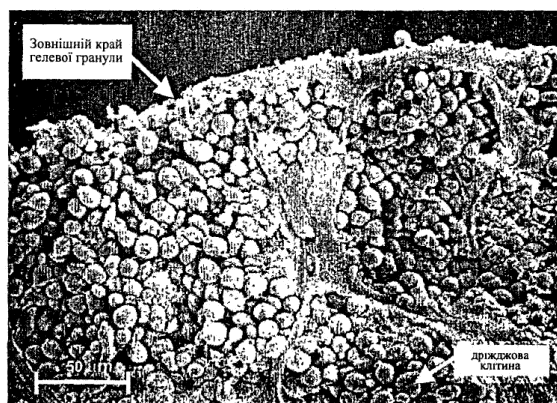
ФІГ. 23



ФІГ. 24



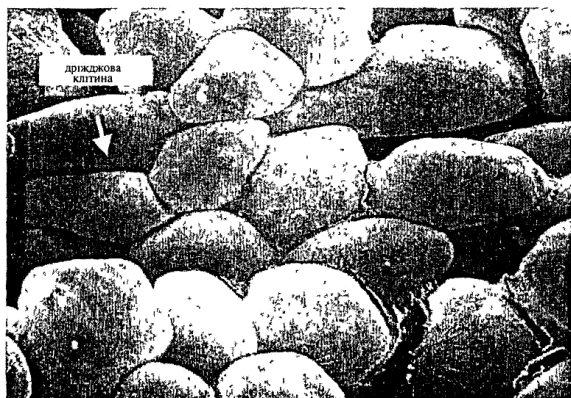
ФІГ. 25



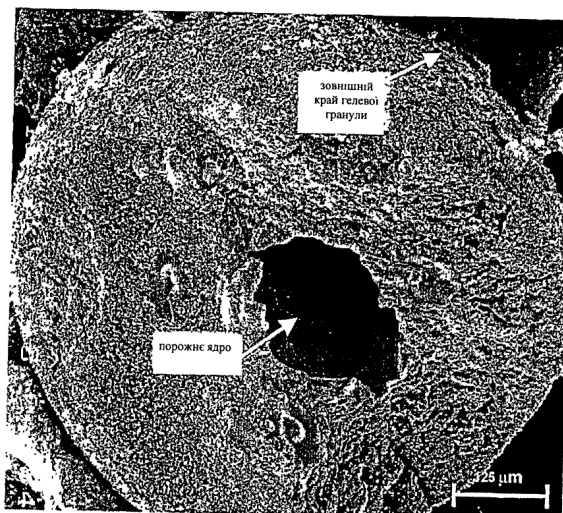
ФІГ. 26



ФІГ. 27



ФІГ. 28



ФІГ. 29