

IMOBILIZOVANÉ BIOSYSTÉMY A ICH PIVOVARSKÉ VYUŽITIE

ZOLTÁN DÖMÉNY, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ,
ERNEST ŠTURDÍK a JAROSLAVA PÁTKOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Došlo dňa 27.II.1998

Kľúčové slová: pivo, imobilizácia, alginát, fermentácia

Obsah

1. Úvod
2. Imobilizované systémy a nosiče
3. Samovolná agregácia buniek
4. Viazanie buniek do nosiča
5. Adsorpcia buniek na povrch nosiča
6. Využitie membrán pri imobilizácii buniek
7. Fyziológia mobilizovaných kvasiniek
8. Etanoltolerancia imobilizovaných kvasiniek
9. Vplyv na senzorické vlastnosti piva
10. Záver

1. Úvod

Pri kontinuálnych fermentáciách sú značné problémy s vyplavovaním biomasy z fermentora. Predovšetkým pri anaeróbnom procese kvasenia nárast biomasy je veľmi pomalý, a preto môže dôjsť k vyplaveniu biomasy. Riešením tohto problému môže byť zabudovanie filtračného modulu do systému na zabránenie vyplavovania kvasiniek, alebo viazanie buniek. Technológia využívajúca imobilizované pivovarnícke kvasinky takúto možnosť poskytuje. Veľkou výhodou technik imobilizácie je možnosť vysokej koncentrácie katalyzujúcej biomasy v kontrolovateľnej forme, čo má za následok zrýchlenie procesu a spôsobilosť možnosť kontinuálne pracovať vysoko nad nominálnou zriedňovacou rýchlosťou¹. Avšak imobilizované systémy majú tiež svoje nevýhody, ako napríklad čiastočná limitácia difúzie²⁻⁷. Vnútorne gradienty pH, koncentrácií kyslíka, substrátu, a tiež produktu sú výsledkom mikroenvironmentálnych efektov⁸⁻⁹. Na prekonanie difúznej prekážky je snahou hľadať nosiče s vysokou pórovitosťou pri zachovaní malých rozmerov. V tomto zmysle sa limitácia prenosu substrátu a produktu v biomase týka všetkých reaktorov. Od roku 1987 bol smer využívajúci imobilizované kvasinky v pivovarníctve viac skúmaný v praktických súvislostiach a bol mu venovaný i väčší priestor na Európskych pivovarníckych kongresoch (E.B.C.)¹⁰.

2. Imobilizované systémy a nosiče

Imobilizácia voľných buniek môže byť definovaná ako technika limitujúca voľnú migráciu buniek. Ak si zvolíme imobilizované bunky ako tvorca produktu v prevádzkových rozmeroch, musíme zohľadniť tieto aspekty¹¹:

- 1) Nosný materiál musí byť cenovo dostupný.
- 2) Systém by mal byť ľahko ovládateľný a mal by poskytovať dobré výsledky.
- 3) Bunky by mali mať predĺženú životnosť v nosiči, ktorý by nemal byť toxický pre ne.
- 4) Bunkový nosič by mal mať dostatočnú kapacitu pre množenie buniek v tomto nosiči.
- 5) Kinetické správanie aplikovaného nosiča by malo byť logické, vysvetliteľné a nemalo by mať vedľajšie účinky na fermentáciu, hlavne čo sa týka difúznej limitácie, lokálneho pH a akumulácie inhibítorov.
- 6) Akékoľvek dôsledky metabolizmu na vlastnosti nosiča musia byť akceptovateľné.

Z praktického hľadiska základnou funkciou dobrého nosiča je pútať bunky v podmienkach prietokového systému.

Pohyblivosť buniek je možné obmedzovať tzv. pasívnymi, alebo aktívnymi metódami. Základné, v súčasnosti známe metódy imobilizácie buniek sú:

- 1) samovolná agregácia buniek flokuláciou;
- 2) viazanie buniek do predom pripraveného nosiča polymérneho typu;
- 3) adsorpcia buniek na povrch nosiča;
- 4) využitie membrán pri imobilizácii buniek.

3. Samovolná agregácia buniek

Pasívne techniky založené na možnostiach sedimentácie veľmi flokulujúcich kvasiniek¹² boli použité pre reaktory na rekultiváciu buniek pri kontinuálnej výrobe etanolu¹³ a piva¹⁴. Pre systém „APV veža“ bola táto technika úspešne aplikovaná v priemyselných rozmeroch pri výrobe etanolu. Reaktor pozostával z vertikálnej cylindrickej veže s kónickým dnom. Veža je ukončená zónou so zarážkami, pričom v tomto mieste má veža veľký priemer. Celkový pomer výšky a priemeru je v rozmedzí 7:1 až 10:1, s priemerom veže od 0,9 m až do 2 metrov. Dosahované výsledky s vysokou koncentráciou buniek od 50 do 80 gramov buniek na liter média sú v objemovej produkcii etanolu okolo 60 g.l⁻¹.h⁻¹. Zachovanie pôvodnej chuti vyrobených fermentovaných produktov, čo je nevyhnutnou podmienkou v pivovarníckom priemysle, bolo pri tomto spôsobe veľmi obmedzené. V skutočnosti uspokojivý kompromis nebol nikdy nájdený a produkcia piva so samovoľne agregujúcimi kvasinkami bola zastavená na začiatku 70 rokov¹⁵.

4. Viazanie buniek do nosiča

Najrozšírenejšou metódou imobilizácie je tzv. viazanie buniek do nosiča (matixu). Bunky sa viažu do gélu, ktorý je

netoxickým polymérom. Typickými predstaviteľmi polymérov používaných na viazanie buniek sú algináty, kappa-karagenany, chitosany, agar, polyakrylamid, pektín, želatína, a iné¹⁶⁻¹⁸. Polymérna zmes je upravená do želaného tvaru, ktorým sú zvyčajne gélové guľičky s priemerom 0,3-3,0 mm. Guľičky s menším priemerom sú preferované, kvôli lepším charakteristikám prestupu látok.

Táto technika dovoľuje pracovať s vyššími koncentraciami biomasy. Hlavnou výhodou tejto imobilizačnej metódy je, že nosič je dostatočne porézny kvôli prestupu substrátu a produktu. Nahromadenie buniek by malo byť čo najdokonalejšie, aby sa vyplnil nosič v čo najväčšej miere. V ionotropných géloch akými sú alginát a chitosan dosahuje veľkosť pórov maximálne 15 nm, čo je pod hranicu veľkosti akejkoľvek mikrobiálnej bunky, a preto bunky nie sú vyplavované z nosiča. Napriek tomu prerastanie buniek je jedným z hlavných problémov v mnohých systémoch, kde sa pracuje s bunkami uzavretými v géli. Z toho dôvodu viacerými odborníkmi¹⁹⁻²⁰ boli navrhnuté techniky, kde sú bunky obalené dvoma vrstvami polyméru.

Mechanická pevnosť gélu je dôležitá pre minimalizáciu rozpadania, opotrebovania, alebo vyplavovania buniek z nosiča. Operačná stabilita imobilizovaných buniek v algálnych polysacharidoch môže byť zlepšená tvrdiacimi činidlami, ako sú periodát, glutaraldehyd, alebo hexametylendiamín^{21,22}.

5. Adsorpcia buniek na povrch nosiča

Imobilizácia buniek na povrch popravených poréznych, alebo neporéznych nosičov je metóda, ktorou môžeme nahraďiť techniku viazania buniek do gélov. Táto technika je veľmi šetrná fixačná metóda, pretože nepotrebuje žiadne zmeny v kultivačných podmienkach na tvorbu imobilizovaných biokatalyzátorov. Typické nosiče pre tento spôsob imobilizácie kvasiniek *Saccharomyces species* sú piliny, keramické porézne tehly, sklo, DEAE celulóza, polyuretán, PVC, ai. Zmobilizované bunky na povrchu v priamom kontakte s kvapalným substrátom znižujú problémy s prestupom živín cez vrstvu nosiča. Vysoká prietoková rýchlosť cez takýto reaktor môže spôsobovať uvoľňovanie buniek z povrchu nosiča. Avšak interakcie medzi bunkami a povrchom nosiča nie sú až tak preskúmané. Van der Waalove sily, elektrostatické interakcie medzi opačne nabitými povrchmi, kovalentné i hydrofóbné väzby tiež participujú na adsorpcii.

Porovnanie medzi dvoma rozdielnymi imobilizačnými mechanizmami je komplikované, pretože v jednom nosiči sa ich uplatňuje niekoľko. Isté pripravované pórovité nosiče môžu reprezentovať kombinovanú formu imobilizovaných buniek zahrňujúcu adsorpciu, samovoľnú agregáciu bunkových populácií a nakoniec viazanie agregátov do pórovitých sietí nosičov. Za zmienku stojí počiatočná priľnavosť bunky na povrch nosiča, ktorá je často sprevádzaná bunkovou sekréciou polymérov zlepšujúcich adhéziu, a tým stabilizáciu spojenia bunky a nosiča²³.

Jestvuje niekoľko aplikácií imobilizovaných buniek s použitím skla ako adsorpcného materiálu. Raschigove krúžky z kremíkového skla sa môžu použiť na spontánnu adsorpciu. Dobré výsledky vykazujú kremíkové sklo so 60 % pórovitosťou, veľkosťou pórov 60-100 μm a špecifickým povrchom 0,4 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ nosiča. Zaujímavé modifikácie techniky sklenených

nosičov boli sledované Rouhetom²⁴. Zvýšená adsorpcná afinita kvasiniek na sklo bola dosiahnutá ich predchádzajúcim upravením v roztokoch hliníťmi iónmi.

Adhézia hydrofilných buniek ako *Saccharomyces cerevisiae* sa ukázala byť výrazne závislá na elektrostatických interakciách povrchu so záporne nabitými bunkami. Potrebný kladný náboj sa musí vytvoriť na povrchu nosiča v adekvátnom množstve na miestach spontánnej adhézie. To bolo dosiahnuté použitím granúl DEAE celulózy. Imobilizácia potom prebiehala v dôsledku iónových interakcií.

6. Využitie membrán pri imobilizácii buniek

Použitím membrán ako nosičov sa dosiahlo 10-násobné zvýšenie hustoty buniek oproti alginátu vápenatému. Membránami tak možno dosiahnuť zlepšenie objemovej produktivity. Difúzna limitácia zahŕňa aj tvorbu inhibičných produktov, čo je jedna z najdôležitejších limitácií membránových nosičov.

Membrány sú tvorené obyčajne z polymérov (PVC, polypropylén, alebo polysulfón). Je potrebné, aby membrány boli hydrofilné pre jednoduchú výmenu živín a produktov, a tiež mechanicky odolné voči rozdielnym tlakom. Používajú sa dve základné zostavy: fólie a kazety s dutými vláknami. Fóliový typ má obyčajne nízku odolnosť a vyžaduje prídavný nosič. Duté vlákna dávajú membráne vyššiu odolnosť a väčší povrch na jednotku objemu.

Problémy však vznikajú aj s nosičmi typu dutých vlákien. Problematické je využitie a cirkulácia plynov, napríklad bublinky CO_2 môžu blokovať plynulý prietok v trubiciach. Neusmerňovaný rast buniek môže obmedziť plynulý prietok živín a nekontrolovaná adhézia môže zapríčiniť znečistenie membrány.

Zaujímavá zmena v štandardnej metodológii viazania buniek na membrány sa nazýva enkapsulácia. Bunky sú najprv opracované ako pri metóde uzavretia do gélu, ale následne sú získané guľičky vystužené polymermi, ako napríklad polyetylénimínom. Gél je po tejto operácii rozpustený, ale bunky zostávajú viazané v sieti polyméru, ktorý potom prepúšťa iba molekuly s relatívnou molekulovou hmotnosťou menšou ako 100 000. Poréznosť tohto polyméru je možné modifikovať zmenou jeho zloženia²⁵.

Jedna z prvých aplikácií bola opísaná Narzissom a Hellichom²⁶ v roku 1970. Systém využíval kvasinky a „diamacetálnu“ zemínu ponechanú vo filtračnom elemente. Pivo bolo produkované rýchlo a s dobrým výťažkom, ale finálny produkt obsahoval vysokú koncentráciu diacetylu a voľných aminokyselín, a naopak nízku koncentráciu vyšších alkoholov a esterov. Metabolizmus aminokyselín je samozrejme kritický pri kvalite produkovaného piva, pretože príslušné metabolické dráhy sú prepojené s produkciou takých chuťových zlúčenín ako sú vicinálne diketóny, vyššie alkoholy, organické kyseliny, a tiež sŕne zlúčeniny²⁷. Kontinuálna fermentácia s využitím buniek imobilizovaných v algináte bola po prvýkrát vysvetlená Whiteom a Portnom v roku 1978 (cit.²⁸). Koncentrácie diacetylu, ktorý veľmi zhoršuje chuťový profil, boli nad povolenou hranicou. Curin²⁹ nameral vysoké koncentrácie voľných aminokyselín v pivách produkovaných imobilizovanými bunkami v algináte. Tieto viazané bunky vykazovali nižšiu rýchlosť odbúravania aminokyselín ako voľné.

Okrem fermentácie s náplňovou vrstvou kvasiniek *Saccharomyces carlsbergensis* imobilizovaných v algináte sa ukázali vážne limitácie špecifickej rastovej rýchlosti³⁰, spotreby kyslíka, syntézy membránových lipidov⁷, tvorby vyšších alkoholov a estrov³¹. Ukazuje sa, že pri heterogénnej fermentácii viazaných buniek v géli bunky lepšie rastú na povrchu guľičiek²⁷. Zaujímavé bolo zistenie Rydera a Masscheleina³¹ o zvýšenej syntéze a uvoľnení určitých aminokyselín, špeciálne kyseliny glutámovej z imobilizovaných buniek.

7. Fyziológia imobilizovaných pivovarských kvasiniek

V prípade produkcie piva bola sledovaná fyziológia kvasiniek bez väčších detailov. Väčšina fyziologických návrhov bola získaná použitím prístupu tzv. čierna skrinka, v ktorom produkty skúmané v metabolizme pri kvasení mladiny majú napomôcť pri identifikácii fyziológie imobilizovaných buniek. Prvá produkcia piva bola charakteristická nerovnováhou chuti, nízkym prírastkom voľných aminokyselín, zvýšeným obsahom vicinálnych diketónov a sírnych zlúčenín¹.

Fyziológia imobilizovaných kvasiniek, používaných pri výrobe piva, v značnej miere ovplyvňuje charakter produktu. Preto pri procesoch okrem inžinierskych aspektov, ako je typ fermentora a fermentačný režim, musíme optimalizovať aj podmienky ovplyvňujúce fyziologický stav kvasiniek. Avšak táto problematika je ešte plná nevyriešených otázok.

Väčšina fyziologických štúdií o imobilizovaných kvasinách pracuje s viazanými bunkami v Ca-alginátovom nosiči. Tieto nosiče sú Tahko rozpustiteľné a dovoľujú robiť priame analýzy viazanej biomasy.

Prvá správa venovaná fyziológii uzavretých pivovarnických kvasiniek bola prezentovaná v roku 1985 Masscheleinom a kol.⁷ Táto štúdia pojednávala o bunkách imobilizovaných do alginátu vápenatého a osvetlila niektoré z vyššie spomínaných bodov.

Počiatočné informácie o fyziológii kvasiniek imobilizovaných na povrchu nosiča boli publikované Navarom a Durandom³², ktorí študovali správanie sa kvasiniek imobilizovaných na guľičkách silanizovaného skla. Zistili zvýšenie metabolickej aktivity v bunkách (spotreba glukózy a produkcia etanolu). V roku 1980 zistili tiež zvýšenie v rýchlosti delenia buniek³³. Podobné výsledky boli opísané Doranom a Baileym³⁴ v ich štúdiu fyziológie kovalentne viazaných biofilmov na želatíne ako nosiči. Stanovili odlišné zloženie buniek (sacharidy, proteíny, DNA, RNA), z ktorého vyplýva veľmi špecifická morfológia porovnateľná s bunkami rastúcimi voľne; vyšší obsah sacharidov, DNA a rýchlejšie množenie buniek.

Mikroprostredie buniek v biofilme sa javí ako najdôležitejší faktor ovplyvňujúci fyziológiu mikroorganizmov. Mozes a Rouxhet^{35,36} ukázali, že interakcie buniek s nosičom tak isto ako fyzikálnochemické vlastnosti nosiča môžu meniť aktivitu imobilizovaných buniek na úrovni lokálnej koncentrácie chemikálií.

Zdá sa, že výroba tradičného piva s dôrazom na chuť a organoleptické vlastnosti môže byť úspešná len v prípade, ak imobilizované bunky rastú podľa nasledovných predpokladov. Hlavný čas zdvojenia kvasiniek viazaných v géli alginátu vápenatého je okolo 2 000 hodín. To nie je fáza odpočinku buniek, ale klesajúca tendencia rastovej krivky koreluje s mi-

kroprostredím v nosiči, celkovo modifikuje sekundárny metabolizmus buniek, ktorý charakterizuje organoleptické vlastnosti finálneho produktu. V súčasnosti výroba piva prebieha technológiou povrchovej adsorpcie, alebo kolonizáciou tabletovaného nosiča, čo dovoľuje isté násobenie buniek.

Je potrebné, aby bola fyziológia imobilizovaných materských buniek v budúcnosti študovaná, no predpokladá sa, že je zhodná s fyziológiou dcérskych buniek uvoľňovaných do média.

Aplikácia imobilizovaných buniek na produkciu palivových alkoholov^{37,38} bola oblasťou intenzívneho skúmania v posledných dvadsiatich rokoch. Na priemyselné využitie takýchto bioreaktorov je potrebné vyriešiť množstvo problémov v oblasti fyziológie buniek, tvaru reaktorov a inžinierskych procesov.

V roku 1987 Simon so svojimi spolupracovníkmi³⁹ predstavil koncept časopriestorového vývinu fyziológie viazanej biomasy na príklade kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* Σ-1278-b uzavretých v Ca-alginátovom géli, ktorá rástla na definovanom médiu a vykazovala charakteristickú rastovú krivku pozostávajúcu zo štyroch nadväzujúcich fáz. Prvá exponenciálna fáza vykazovala zhodné rastové parametre ako boli namerané v homogénnej exponenciálnej raste pri použití rovnakého média s koncentráciou biomasy 4-6 g sušiny.l⁻¹. Počas tejto fázy je špecifická rastová rýchlosť zhodná s rýchlosťou rastu voľných buniek^{40,41}. Štúdie s použitím ³¹P pomocou NMR (cit.⁴²) alebo enzýmovou analýzou⁴³ zdôraznili genotropnú reguláciu glykolytických enzýmov s nadprodukciou hexokinázy a fosfofruktokinázy, čo môže vysvetliť zvýšený tok v smere glukóza-etanol. Na druhej strane, pozorovania Taipa⁴² ukázali, že intracelulárne pH viazaných buniek je veľmi stabilné v porovnaní s vývinom počas fermentácie voľných buniek. Výskumy Galazza a Baileya⁴¹ udávajú, že intracelulárne pH imobilizovaných buniek sa ukazuje nižšie ako pri bunkách voľných, čo dovoľuje vyšší glykolytický tok. Biosyntéza zásobných sacharidov (trehalóza a glykogén) sa pri týchto rastových podmienkach zvyšuje. Tieto poznatky môžu vysvetliť makromolekulárne zloženie biofilmov kvasiniek rastúcich na želatínovom nosiči namerané Doranom a Baileym³⁴. Objasnením týchto modifikácií na enzýmovej úrovni ako aj na úrovni glykolytickej dráhy viazaných kvasiniek vo vnútri nosiča môže byť modifikácia mikroprostredia buniek. S obsahom biomasy v intervale 5-7 g sušiny.l⁻¹ sa difúzne parametre glukózy a etanolu až tak nemenia a sú blízke hodnotám nameraným vo vodnom roztoku⁴⁵. Difúzia kyslíka v alginátovom nosiči^{3,46} je modifikovaná a môže ovplyvniť metabolickú dráhu cez enzýmotropnú reguláciu fosfofruktokinázy.

Druhá fáza rastu je lineárna, ovplyvnená rýchlosťou difúzie živín z média do nosiča. Vypracované štúdie difúzných koeficientov kyslíka⁴⁷, glukózy, laktózy, galaktózy a etanolu⁴⁸ jasne ukazujú výrazný pokles v efektívnych difúzných koeficientoch so zvyšovaním homogénnej distribúcie koncentrácie buniek kvasiniek. Počas tejto lineárnej fázy obsah intracelulárnych voľných aminokyselín je veľmi nízky a celková regulácia dusíka rastúcich kvasiniek indukujú syntézu kontrolovaných biosyntetických dráh^{39,49}. V tom istom čase špecifická kapacita fermentácie viazaných buniek v nosiči meraná v suspenziách po rozpustení nosiča klesá. Majoritné množstvo glykolytických enzýmov sa zvyšuje počas tejto fázy a sleduje sa paralelná exkrécia glycerolu, pyruvátu, sukcinátu, oxalacetátu a α-ketoglutarátu. Významný je fakt, že sa nenašiel žiadny

acetát⁵⁰. Počas tejto fázy na úrovni morfológie kvasiniek⁵⁰ makromolekulárne zloženie buniek ukázalo zvýšenie obsahu zásobných sacharidov (trehalóza a glykogén), alebo štruktúrnych sacharidov (mannán a β -glukán), čo je blízke k odhadom Dorana a Baileyho³⁴. Po prvej a druhej lineárnej fáze rastu môže byť meraná elasticita gélu použitého na imobilizáciu. Počas tejto fázy nastáva malé zvýšenie obsahu intracelulárnych voľných aminokyselín, dôsledku malých požiadaviek pre rast buniek (druhá lineárna fáza je pomalšia) a vysokej úrovne obsahu enzýmov v bunkách⁵⁰. Tieto dve lineárne fázy môžu byť ľahko skrátené, ak je zvýšená koncentrácia živín v médiu a objem inokula. Štvrtá rastová fáza, tiež pseudostacionárna fáza, je špecifická pre bunky viazané na nosič. Konečná koncentrácia biomasy v nosiči závisí iba na mechanických vlastnostiach použitého gélu^{51,52}. Koncentrácia viazanej biomasy môže byť v intervale 30-75 g sušiny.l⁻¹ nosiča. Táto pseudostacionárna fáza bola dosiahnutá po 100 až 200 hodinách rastu, závisí však na objeme inokula a zložení média. Približné charakteristiky namerané pre priemyselné využitie spomínaného reaktora Masschelein a kol.⁷, pričom čas zdvojenia buniek bol 2 000 hodín. Fyziológia viazaných buniek v nosiči sa mení počas rastovej fázy v snahe dosiahnuť ustálený stav, čo je veľmi rozdielne vzhľadom na fyziológiu voľných buniek rastúcich na rovnakom médiu. Objem počiatočného inokula sa zdá veľmi dôležitý vzhľadom na definovanie tejto fyziológie. V prípade glykolytickej dráhy na minimálnom médiu špecifická kapacita fermentácie viazaných buniek na nosiči dosiahla optimum⁵³. Tento fenomén je v korelácii s vnútorným presupom biomasy v nosiči, distribúciou kolónií a geometrickými parametrami nosiča.

Hlavnú úlohu vo vnútornom prestupe biomasy zohráva, ako poukázali Hilge-Rotmann a Rehm⁴³ pri svojich experimentoch, porovnateľné správanie sa imobilizovaných mikrokolónií a samostatných imobilizovaných buniek, a tiež Simon³⁹ pri skúmaní metabolizmu distribúcie arginínu vo viazanej biomase s ohľadom na jeho lokalizáciu v guľôčkach.

Kontakt bunka-bunka môže zmeniť jej správanie priamym pdsobením na bunkovú stenu⁵⁴. Zmeny a fyzikálochemické modifikácie bunkovej steny počas rastu buniek viazaných v nosiči sú podobné. Pri anaeróbných rastových podmienkach spôsobuje nedostatok kyslíka dôležité zmeny na úrovni ergosterolu a nenasýtených mastných kyselín v membránach kvasiniek⁷⁵⁵.

Makromolekulárne zloženie buniek viazaných na nosič v tejto fáze a analýzy elektrónovou mikroskopiou ukázali prítomnosť dôležitého periplazmatického priestoru spojeného s veľkým množstvom peptidománanov (5-násobné zvýšenie) a menším obsahom β -glukánu⁵⁶ v týchto bunkách. Množstvá glykolytických enzýmov sú modifikované nasledovne: fosfofruktokináza a aldoláza ostávajú nezmenené; hexokináza a alkoholdehydrogenáza sú v nadbytku (2 až 3-násobnom) a pyruvátdekarboxyláza klesá.

Vysoký intracelulárny obsah glutamínu a asparagínu indikuje nadbytok uhlíkového prúdu v cykle trikarboxylových kyselín a nízke požiadavky aminokyselín pre potrebu biomasy oprávajú vylučovanie trikarboxylových kyselín³⁴.

Na druhej strane molárny pomer etanol/glycerol meraný trikrát počas pseudostacionárnej fázy fermentácie³⁶ je vyšší ako ten, ktorý bol nameraný pri fermentácii voľnými bunkami a počas iniciačnej logaritmickkej fázy buniek viazaných v nosiči bol rast charakterizovaný pomerom 15 a 14 (cit.⁵⁷).

8. Etanoltolerancia imobilizovaných kvasiniek

Miestom účinku etanolu sú v prvom rade membrány bunky, a to najmä cytoplazmatická membrána a membrány rôznych intracelulárnych organel. V membránach spôsobuje zmenu fluidity, rekonštitúciu zloženia lipidov, zasahuje rôzne membránové transportné systémy, čím ovplyvňuje prestup glukózy, živín, či iných zložiek z média do bunky, urýchľuje pasívny prestup protónov^{58,59}. Strata membránovej integrity znižuje schopnosť bunky udržať koncentračný gradient cez membránu. Navyše etanol spôsobuje inhibíciu a denaturáciu vnútrobunkových proteínov a niektorých glykolytických enzýmov a zasahuje nešpecificky do respiračného reťazca bunky⁶⁰. Etanol znižuje optimálnu a maximálnu teplotu rastu, čím zapríčiňuje termálnu smrť kvasiniek. Inhibícia rastu a viability sa prejavujú už pri nízkych koncentráciách etanolu, zatiaľ čo fermentačná rýchlosť je ovplyvnená až vyššími koncentraciami⁶¹.

Čo sa týka vplyvu etanolu na respiráciu kvasiniek, glykolytická produkcia CO₂ je viac senzitívna k inhibícii etanolom ako aeróbná respirácia⁶². Mobilizované bunky ukazujú rôzne modifikácie vo fyziologickom stave a biochemickom zložení v porovnaní s rozsuspendovanými bunkami. Niektorí autori publikovali zdokonalenia v alkoholovom kvasení pri použití imobilizovaných kvasiniek, buď uzavretých v géli, alebo použitím adsorpčných technik. Uzavretie biokatalyzátore v polymérnej matrixi (alginát vápenatý alebo karagenan) je preferované mnohými výskumníkmi, pretože imobilizačné podmienky sú nenáročné. Napríklad Holeberg a Margalith⁶³ zistili, že bunky *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 uzatvorené v karagenane pri vsádzkovej fermentácii 300 g.l⁻¹ skvasiteľnej glukózy produkujú maximálnu koncentráciu etanolu 121 g.l⁻¹ v porovnaní s 96 g.l⁻¹ pomocou neimobilizovaných kvasiniek. Ďalší autori uvádzajú podobné výsledky v produkcii etanolu a tolerancii voči nemu pri použití alginátu sodného alebo arabskej gummy ako imobilizačného média⁶³. Podobné zistenia v etanoltolerancii pri imobilizácii boli popísané aj pri iných kmeňoch: *Saccharomyces carlsbergensis*⁶⁴, *S. cerevisiae* NRRL Y-132 (cit.⁶⁵), *S. diastaticus*⁶⁶ a *S. bayanus*⁶⁷.

Alginát vápenatý bol najširšie používanou gélovou matricou v laboratóriách, pri riadenom rozmnožovaní rastlín i v priemyselných fermentáciách. Problémy spojené s výrobou inokulovaných gélových guľôčok, ako aj mechanická nestabilita, boli zapríčinené tvorbou chelátov s vápenatými iónmi⁶⁸. Calginát vykazuje nestabilitu proti fosfátom a CO₂ uvoľnenému počas kvasenia. Ako dobrá metóda na zvýšenie mechanických vlastností guľôčok je považované tvrdenie alginátových biočastíc pôsobením iónov Al³⁺ (cit.⁶⁹). Predupravené celulózoové guľôčky⁷⁰ alebo gélové guľôčky z pektátu vápenatého⁷¹ získali pozoruhodné mechanické vlastnosti a operačnú stabilitu. Gélové guľôčky pektátu vápenatého majú nízku citlivosť na ióny a chemické činidlá, ktoré poškodzovali tieto guľôčky⁷². Karagenan je termoreverzibilný gél a mohol by byť výhodný pre využitie v priemyselnej produkcii malých inokulovaných gélových guľôčiek⁶⁸.

9. Vplyv na senzorické vlastnosti piva

Diacetyl je senzoricky aktívna látka mladého a hotového piva. Koncentrácia diacetylu značne ovplyvňuje chuť a vôňu

nápoja. Norma dovoľuje maximálnu koncentráciu tejto zložky na 0,2 mg.l⁻¹. Konverzia diacetylú na senzorycky neaktívny acetoín prebieha v procese dokvasovania. α -Acetolaktát je prekurzorom pri tvorbe diacetylú, a na začiatku dokvasovania je konvertovaný v pive na diacetyl. Odbúraním diacetylú vzniká acetoín a nakoniec butándiol. Existujú postupy na konverziu diacetylú pomocou mobilizovaných buniek alebo enzýmov⁷³, ale v praxi sú tieto metódy málokedy aplikované. Skôr našiel uplatnenie spôsob, keď α -acetolaktát je teplom konvertovaný na diacetyl⁷⁴ a potom za anaeróbných podmienok prebieha konverzia diacetylú na acetoín pomocou imobilizovaných kvasiniek. Zriedkavo sú aplikované rekombinantné kmene kvasiniek so zmenenou aktivitou acetolaktát-dekarboxylázy⁷⁵. Po technickej stránke anaeróbný proces s imobilizovanými kvasinkami môže byť aplikovaný s periodickou aeráciou, ktorá slúži na udržanie vitality kvasiniek. V pivovarníctve, hlavne pri kontinuálnych procesoch, kde produkt priamo ide na konzumáciu, prevzdušenie piva ovplyvňuje aj senzorycké parametre tohto nápoja⁷⁶. Pri pomaly sa množiacich kvasinkách vyprodukované pivo má vyšší obsah a-aminodusíka, a tým nevyváženú chuť a porušenie koloidnú stabilitu. Tento problém bol riešený v pivovare Kirin (Japonsko), zavedením aeróbnej fermentácie voľnými bunkami, ktorá je zaradená pred fermentorom s imobilizovanými bunkami. Produktivita celého procesu vzrástla iba na dvojnásobok, čo indukuje pokles efektívnosti tohto postupu. Pri porovnávaní piva vyrobeného klasickou technológiou a imobilizovanými bunkami je koncentrácia aromatických látok v prípade imobilizovaných kvasiniek nižšia. Dávkovanie kyslíka v priebehu fermentácie síce znižuje koncentráciu celkových dusíkatých látok, ale vedie k nižšej produkcii esterov a vyššej produkcii acetaldehydu a vyšších alkoholov. Bolo dokázané, že rýchle množenie sa kvasiniek vedie ku vzniku zvýšenej tvorby prekurzorov aminokyselín a môže dôjsť k prekročeniu optimálnej hranice vyšších alkoholov a oxo-kyselín. Na druhej strane tvorba esterov z etanolu a vyšších alkoholov je katalyzovaná cytosolickou alkohol-acetyl-transferázou, ktorá môže byť inhibovaná nenasýtenými masnými kyselinami a ergosterolom. Dala by sa očakávať vyššia produkcia esterov pri aplikácii imobilizovaných buniek spôsobená nízkym obsahom nenasýtených masných kyselín v plazmatickej membráne. Tento jav môže byť odôvodnený aj prestupom kyslíka do membrány. Bolo dokázané, že bunky získané z vrstiev z blízkosti povrchu nosiča⁷⁷ obsahujú nenasýtené masné kyseliny v značne vyššej koncentrácii ako bunky vo vnútri nosiča. Pre malé alginátové guľičky (priemer 2 mm) bol gradient koncentrácie masných kyselín omnoho menší ako pri väčších peletkách. Bol potvrdený aj fakt, že produkcia chuťovo aktívnych zlúčenín je pri kvasení pomocou imobilizovaných buniek nižšia, čo je spôsobené nižšou metabolickou aktivitou buniek. Dostupnosť kyslíka sa z tohto dôvodu javí byť kritická pre kontrolu tvorby chuťovo aktívnych zlúčenín v imobilizovaných systémoch.

10. Záver

Využitie imobilizovaných systémov je v biotechnológii už samozrejmosťou. Táto technológia preniká už aj do takých klasických technológií, ako výroba piva. Pri fermentácii mladiny pomocou imobilizovaných kvasiniek kvalitu finálneho produktu v značnej miere ovplyvňuje typ chemického nosiča

a spôsob imobilizácie. Zmeny medzi voľnými a viazanými bunkami vyvolané imobilizáciou ovplyvňujú chuť, charakter, vôňu a analytické parametre piva. Pri viazaných bunkách sa zvyšuje rýchlosť tvorby a odbúravania vicinálnych diketónov. Zmení sa teplotné optimum kvasného procesu, čo vyvoláva zmeny v prchavom profile piva. Imobilizácia zvyšuje etanol-toleranciu kvasiniek, čo je výhodou pri kvasení vysokokoncentrovaných mladín. Štúdium imobilizácie a jeho vplyv na fyziológiu kvasiniek je dôležité z toho dôvodu, že zmeny v technologickom procese môžu pozitívne ovplyvňovať ekonomiku výroby piva.

LITERATÚRA

1. Ryder D. S., Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 23rd Congress*, Lisabon 1991.
2. Cheetham P. S. J., Blunt K. W., Bucke C: *Biotechnol. Bioeng.* 21, 2155 (1979)
3. Hiemstra H., Dijkhuizen L., Harder W.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 189 (1983).
4. Nilson K., Ohlson S., Häggstril L., Molin N., Mosbach K.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10, 261 (1980).
5. Ohlson S., Larson P. O., Mosbach K.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10, 261 (1980).
6. Tramper J., Luyben K. C. A. M., Van Den Tweel W. J. J.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 13 (1983).
7. Masschelein C. A., Carlier A., Ramos-Jeunehomme C, Abe I.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 20th Congress*, str. 339. Helsinki 1985.
8. Klein J., v knihe: *Fundamentals and Applications* (Moo-Young M., ed.), 12. Elsevier Applied Science, Amsterdam 1989.
9. Nam C. H., Moo-Young M., v knihe: *Fundamentals and Applications* (Moo-Young M., ed.), 33. Elsevier Applied Science, Amsterdam 1988.
10. Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 22nd Congress*, str. 785. Zürich 1989.
11. Hayes S. A., Power J., Ryder D. S.: *Brewers Dig.* 66, 14 (1991)
12. Unz R. S., v knihe: *Process Technology Proceedings* (Attia J., ed.), str. 351. Elsevier, Amsterdam 1987.
13. Grennhields R., Smith E.: *Chem. Eng.* 7977, 249.
14. Klover W. J., Roberts R. H., Royston M. G., Ault R. G.: *Proc. Eur. Brew. Conf. 10th Congress*, str. 238. Stockholm 1965.
15. Portno A. D.: *Eur. Brew. Conv. Symposium on Fermentation and Storage*, sv. V, str. 145. 1978.
16. Cheetham P. S. J.: *Topics in Enzyme Fermentation Biotechnology* (Wisemann, ed.), str. 189. Horwood, Chichester 1980.
17. Bucke C.: *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B* 1983, 369.
18. Durand G., Navarro J. M.: *Process Biochem.* 9, 14 (1978)
19. Kondo A. I., v knihe: *Processing and Technology* (Wade van Valkenburg, ed.), kap. 7, str. 59. Elsevier, Amsterdam 1979.
20. Wang H. Y., Lee S. S., Tabach Y., Cawthon L.: *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, str. 139. Wiley, New York 1982.
21. Chibata I. T., Tosa T., Sato T., Takata L: *Methods Enzymol.* 135, 189 (1988).
22. Birnbaum S., Pendleton R., Larson P. O., Mosbach K.: *Biotechnol. Lett.* 3, 393 (1981).

23. Lewin R.: *Science* 224, 275 (1984).
24. Champulvier B., Marchal F., Rouxhet P. G.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 11, 422 (1989).
25. Guisely K. B.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 11, 706 (1989).
26. Narciss L., Hellich P.: *Brew. Dig.* 47, 106 (1972).
27. Masschelein C. A.: *Eur. Conv. Symposium on Brewer's Yeast*, sv. XII, str. 2. Helsinki 1986.
28. White F. H., Portno A. D.: *J. Inst. Brew.* 84, 228 (1978).
29. Curin J., Pardonova B., Palenikova M., Sedova H., Kahler M.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 21st Congress*, str. 433. Madrid 1987.
30. Masschelein C. A.: *Biotechnology Applications in Beverage Production* (Cantarelli C., Lazarini G., ed.), kap. 7, str. 77. Elsevier Applied Science, Amsterdam 1989.
31. Ryder D. S., Masschelein C. A.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 43, 66 (1985).
32. Navaro J. M., Durand G.: *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4, 243 (1977).
33. Navaro J. M., Durand G.: *C. R. Acad. Sc. Paris* 290, 453 (1980).
34. Doran P. M., Bailey J. E.: *Biotechnol. Bioeng.* 27, 73 (1985).
35. Mozes N., Rouxhet P. G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 92 (1985).
36. Rouxhet P. G., Mozes N.: *Physiology of Immobilized Cells*, str. 343. Elsevier, Amsterdam 1990.
37. Van de Winkel L., Van Beveren P., Borremans E., GooSENS E., Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 24th Congress*, str. 307. Oslo 1993.
38. Nagashima M., Azuma M., Nogushi S., Inusuka K., Samejima H.: *Biotech. Bioeng.* 26, 992 (1984).
39. Simon J. P., Brunin D., Pattoux A. Y., Dubois E., Messenguy F.: *Proc. 11e Colloque Soc. Fr. Microbiol.*, str. 257. Toulouse 1986.
40. Willaert R., Baron G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 341 (1993).
41. Vives C., Casas C., Godia F., Sola C.: *Appl. Microb. Biotechnol.* 38, 467 (1993).
42. Galazzo J. L., Bailey J. E.: *Biotechnol. Bioeng.* 36, 417 (1990).
43. Hilge-Rotmann B., Rehm H. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 54 (1990).
44. Taipa M. A., Cabral J. M. S., Santos H.: *Biotechnol. Bioeng.* 41, 647 (1993).
45. Hanoun B. J. M., Stephanopolus G.: *Biotechnol. Bioeng.* 27, 829 (1985).
46. Alderclutz P.: *Biotechnol. Bioeng.* 28, 223 (1986).
47. Sun Y., Furusaki S., Yamauchi A., Ichimura K.: *Biotechnol. Bioeng.* 34, 55 (1988).
48. Axelson A., Persson B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 18, 231 (1987).
49. Simon J. P., Dubois E., Messenguy F.: *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 94, 45 (1986).
50. Simon J. P.: *Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gen.* 54, 1225 (1989).
51. Simon J. P.: *Belg. J. Food Chem. Biotechnol.* 44, 6 (1989).
52. Godia F., Casas C., Castellano B., Sola C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 342 (1987).
53. Simon J. P.: *Belg. J. Food Chem. Biotechnol.* 44, 183 (1989).
54. Ellwood D. C., Keevil C. W., Brown C. M., Wardell J. N.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 297, 517 (1982).
55. Simon J. P., Benoot T., Defroyennes J. P., Deckers B., Dekegel D., Vandegans J.: *Physiology of Immobilized Cells*, str. 583. Elsevier, Amsterdam 1990.
56. Simon J. P., Kaub R., Lebecque S., Defroyennes J. P., Plaisant A. M.: *Proc. XII Int. Special Symp. on Yeast*, str. 184. Leuven, Belgium 1989.
57. Galazzo J., Bailey J. E.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 12, 162 (1990).
58. Leao van Uden N.: *Biochim. Biophys. Acta* 43, 774 (1984).
59. Kilian S. G., du Preez C., Gericke H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 90 (1989).
60. Luong J. H. T.: *Biotechnol. Bioeng.* 27, 280 (1985).
61. Brown S. W., Oliver S. G., Harrison D. E. F., Righelato R. C.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 151 (1981).
62. Lloyd D., Morrel S., Carlsen H. N., Degn H., James P. E., Rowlands C. C.: *Yeast* 9, 825 (1993).
63. Holcberg I. B., Margalith P.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13, 133 (1991).
64. Navarro J. M., Durand G.: *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4, 243 (1977).
65. Lamprey J., Robinson C. W., Moo-Young M.: *Can. Inst. Chem. Eng.* 7, 630 (1981).
66. Panchal C. J., Harisson A., Russell I., Stewart G. G.: *Biotechnol. Lett.* 4, 33 (1982).
67. Vieira A. M., Sa-Correia L., Novais J. M., Cabral J. M. S.: *Biotech. Lett.* 11, 137 (1989).
68. Norton S., D'Amore T.: *Enz. Microb. Technol.* 16, 365 (1994).
69. Roca E., Cameselle C., Núñez M. J., Lema J. M.: *Biotechnol. Techn.* 9, 815 (1995).
70. Szajáni B., Buzás Z., Dallmann K., Gimesi I., Krisch J., Tóth M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 122 (1996).
71. Gemeiner P., Kurillová L., Markovič O., Maloviková A., Uhrín D., Ilavský M., Štefuca V., Polakovič M., Bálaš V.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13, 335 (1991).
72. Tomáška M., Gemeiner P., Materlín I., Šturdík E., Handriková G.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21, 347 (1995).
73. Willets A.: *Biotechnol. Lett.* 9, 291 (1987).
74. Gronqvist A., Pajunen E., Ranta B.: *Proc. Eur. Brew. 19th Conf*, str. 161. London 1983.
75. Ryan E. D., Kohlhaw G. B.: *J. Bacteriol.* 12, 631 (1974).
76. Nakanishi K., Onaka T., Inoue T., Kubo S.: *Proc. Eur. Brew. 20th Conf*, str. 331. Helsinki 1985.
77. Masschelein C. A.: *Biotechnology Application in Beverage Production* (Cantarelli G., Lanzarini G., ed.), str. 77. Elsevier, Amsterdam 1989.

Z. Dömény, D. Šmogrovičová, E. Šturdík, and J. Pátková (*Department of Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Immobilized Biosystems and Their Brewery Applications**

This article summarizes the up-to-date information on the yeast physiology under the continuous beer fermentation conditions. Because of technological adaptation and progress, it is important to understand the physiological influence of immobilization. The yeast immobilization stimulated the ethanol tolerance. The beer quality is significantly influenced by the chemical composition of the yeast carrier and by the immobilization technique.