

KONTINUÁLNE FERMENTAČNÉ PROCESY PRI VÝROBE PIVA POMOCOU IMOBILIZOVANÝCH KVASINIEK

ZOLTÁN DÖMÉNY, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ
a ERNEST ŠTURDÍK

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

Došlo dňa 5.XII. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Kontinualizácia kvasenia v pivovarníctve
3. Aplikácia imobilizovaných kvasiniek v pivovarníckom priemysle
4. Hlavné kvasenie mladiny s využitím imobilizovaných buniek
5. Kontinuálne dokvasovanie imobilizovanými bunkami
6. Záver

1. Úvod

Klasická výroba jedného z najznámejších alkoholických nápojov – piva – trvá 40 až 60 dní, v závislosti od typu piva. Výroba piva pozostáva z inžinierskych procesov, pri ktorých je potrebné dodať značné množstvo tepelnej a mechanickej energie, aby sa dostali extrahovateľné zložky sladu a chmelu do vodnej fázy a aby bolo dosiahnuté požadované skvarenie škrobu na skvasiteľné sacharidy. Pri kvasnom procese, ktorý v klasickej technológii môže trvať až 60 dní, ako už bolo spomínané, najprv prebieha hlavné kvasenie v kvasných kadiach a potom sa začína dokvášací proces pri 0 až 4 °C v dokvášacích tankoch za mierneho pretlaku. Proces dokvasovania slúži na dosycovanie mladého piva oxidom uhličitým a v priebehu tohto procesu sú odbúrané vicinálne diketóny a prebieha harmonizácia senzorycky aktívnych látok.

Po druhej svetovej vojne došlo k značnej modernizácii v pivovarskej technológii. Kvasná technológia prešla najprv na semikontinuálny spôsob a najväčšia zmena nastala

prechodom na jednofázové kvasenie v cylindrokónických tankoch, kde hlavné kvasenie a dokvasovanie prebieha v tom istom tanku, zmenené sú iba podmienky kvasenia, tlak a teplotný režim. Kvasný proces v cylindrokónickom tanku trvá 18 dní. Spomínané moderné technológie ešte ani neprerazili bariéry zo strany pivovarníkov a v laboratórnom meradle už boli vyvinuté prvé technológie na kontinuálny kvasný proces.

2. Kontinualizácia kvasenia v pivovarníctve

Kontinuálne kvasenie mladiny nemá dlhú tradíciu. Úplné začiatky sa datujú od roku 1954, keď Wellhover začal vyrábať pivo prietokovým spôsobom. Takýto kontinuálny systém bol aplikovaný na Novom Zélande¹. Pri kontinuálnej výrobe piva je snaha skrátiť kvasný proces, pritom dodržať analytické aj chuťové vlastnosti piva. Proces kvasenia možno urýchliť zvýšením teploty kvasenia, avšak vyššia teplota kvasenia znižuje penivosť piva². Pri práci s vyššími koncentráciami kvasiniek máme obmedzené možnosti regulácie prietoku substrátu cez reaktor, pretože by došlo k vyplaveniu biomasy.

Zo všetkých kontinuálnych spôsobov kvasenia sa zatiaľ najviac uplatnil Couttsov spôsob, ktorý bol tiež aplikovaný v pivovaroch na Novom Zélande. Tieto pivovary vyrábajú ročne 250 až 900 tisíc hektolitrov piva. Kvasenie prebieha v dvoch za sebou idúcich fermentoroch, ktoré sú miešané miešadlom. Kvasenie prebieha pri teplote od 7 do 27 °C podľa typu piva. Mladé pivo sa čerpá cez odstredivky, kde sa oddelujú kvasinky. V ďalšom tanku sa dosycuje oxidom uhličitým, pridávajú sa stabilizačné a chuťové prídavky (izoextrakt, karamel) a dochladzuje sa na 0 °C. Doba kvasenia sa pohybuje od 18 do 35 hodín a kvasný cyklus trvá bez prerušenia 3 mesiace. Potom sa uskutoční dokonalá sanitácia a sterilizácia a cyklus sa opakuje¹.

ABM - systém bol zavedený v Kanade a pracuje na podobnom princípe. Kvasenie prebieha v dvoch za sebou idúcich tankoch. Tanky sú miešané a chladené, na spodku majú veniec na rozptýlenie oxidu uhličitého. Zakvasí sa až desaťnásobne vyššou koncentráciou kvasníc ako pri klasických spôsoboch. Kvasenie trvá pri 16 °C 36 hodín. Za túto

dobu sa prekvasí mladina z 12 % pôvodného extraktu na 2,5 % zdanlivého extraktu. Zdokonalený postup sa používa v jednom z kanadských pivovarov. Fermentácia prebieha pri 16 až 24 °C, používa sa 6 až 10 kg lisovaných kvasníc na hektoliter mladiny a doba hlavného kvasenia sa skraca tak na 7 až 12 hodín¹.

Kaskádový systém kontinuálneho kvasenia zavedený v Anglicku má tri kvasné tanky, z nich posledný má kónické dno a chladiaci had, prvé dva majú miešadlá. Sterilná a chladená mladina nasýtená kyslíkom je privádzaná na spodok prvého tanku. Po čiastočnom prekvasení odchádza mladé pivo z povrchu hladiny na spodok druhého fermentora, kde prebieha najintenzívnejšie kvasenie a nakoniec odchádza do tretieho fermentora. Teplota kvasenia postupne klesá z 15 °C na 7,5 °C. Z tretieho tanku odchádza prekvasené pivo na filtráciu a pasterizáciu a na nasycovanie oxidom uhličitým. Zo spodku kolony odchádzajú husté kvasnice. Tento systém bol odskúšaný v štyroch pivovarochoch a má zdržnú dobu 16 hodín².

Vežový systém kontinuálneho kvasenia vypracovala firma APV v šesťdesiatych rokoch v pivovare vo Valencii v Taliansku. Princípom je kvasná veža z nerezovej ocele, výška veže je 7,6 m a priemer 0,9 m s rozšírenou hornou časťou. Veža je vybavená chladiacim plášťom a má v pravidelných vzdialenostiach horizontálne perforované dosky, ktoré slúžia na zabránenie prúdenia a miešania mladiny. V hornej časti je dekantér na zbieranie kvasníc. Pasterizovaná mladina prichádza na dno veže, kde je udržiavaná vysoká koncentrácia kvasníc (200 až 300 g.l⁻¹) a postupuje smerom nahor. Pri teplote 16 °C vykvasí za 8 hodín. Na hlave sa zbierajú kvasinky v dekantéri, ktoré sa vracajú na spodok kolony. Systém môže pracovať za aseptických podmienok 6 mesiacov³.

Kontinuálny systém vyvinutý vo VÚPS Praha bol odskúšaný vo štvrtprevádzkovom a overený v poloprevádzkovom meradle s výkonom 5 hl.h⁻¹. V linke sú zapojené dva homokontinuálne miešané tanky s heterokontinuálnym tankom s kónickým dnom s možnosťou tlakového zapojenia. Na kvasné tanky sú napojené ležiacke tanky, ktoré slúžia na dvojfázové dokvasovanie, alebo pri tlakovom zapojení v nich prebieha čírenie piva pri nízkej teplote. Sterilná mladina sa zmieša v prvom tanku s kvasinkami, prevzdušní sa a kvasí pri teplote 12 až 14 °C. Ďalej prechádza druhým a tretím tankom, kde sa zvyšuje tlak na 0,1 MPa. Po dokvasení sa čerpá mladé pivo do ležiackych tankov, kde sa číri pri teplote 0 °C a pretlaku 0,08 až 0,09 MPa. Po troch, resp. piatich dňoch sa stáča. Dvojfázové dokvasovanie prebieha v tzv. „teplej fáze“ pri 10 až 12 °C štyri dni pri

výrobe konzumných pív a 7 dní pri výrobe ležiakov. Nasleduje 3-dňová studená fáza pri 1 °C pre obidva typy pív. Výčapné pív sa vyrábajú za 10 až 11 dní, ležiaky za 14 až 15 dní. Priemerná doba jedného cyklu je 42 dní².

3. Aplikácia imobilizovaných kvasiniek v pivovarníckom priemysle

Imobilizácia buniek kvasiniek pre úspešné využitie v pivovarníctve implikuje zadržanie všetkých katalyzujúcich buniek vo vnútri reaktora.

V snahe využiť výhody alternatívnych procesov voči tradičným fermentáciám s voľnými bunkami a následným dokvášaním, musia imobilizované bunky vykazovať schopnosť dlhých pracovných časov s nezmenenou vitalitou počas niekoľkých týždňov alebo mesiacov. Hlavným záujmom skúmania sú limitácie prestupu substrátu do biomasy a vylučovanie produktu z imobilizovaných buniek.

V problematike imobilizácie nastáva proces intenzifikácie primárnych požiadaviek na imobilizované systémy, ako je Madamie vhodného nosného materiálu, ktorý by zabezpečoval vysokú objemovú koncentráciu biomasy. Výskum zameraný na adsorpciu buniek na pevné povrchy ako pórovité sklo a keramika alebo na modifikované materiály ako DEAE celulóza, sa snaží nájsť najvhodnejší nosič pre použitie imobilizovaných kvasiniek v priemyselnej praxi vo veľkých rozmeroch⁴. Pri produkcii piva je zvýšená potreba nájsť riešenie, ktoré vyhovuje jednak požiadavkám na produktivitu ako aj na kvalitu výsledného produktu. Pri komerčnom využití systémov imobilizovaných pivovarníckych kvasiniek záleží na optimalizácii faktorov ovplyvňujúcich fyziológiu buniek, prestup biomasy, imobilizačné procedúry a tvar reaktorov zaručujúcich vysoké špecifické rýchlosti fermentácie nezávislé na raste kvasiniek a produkciu piva so želaným senzorickým a analytickým profilom. V posledných rokoch sa dosiahol veľký pokrok a existuje veľa možností ako zlepšiť dnes existujúce konvenčné technológie. Niektoré z týchto špecifických imobilizovaných systémov pre dokvášanie a výrobu špeciálnych nápojov zo sladu našlo aj svoje komerčné využitie.

4. Hlavné kvasenie mladiny s využitím imobilizovaných buniek

S bunkami imobilizovanými na DEAE celulóze boli dosiahnuté úspechy najmä pri rýchlom a kvalitnom procese

dokvášania, ale ukazuje sa možnosť úspešného využitia tohto nosiča aj pri hlavnej fermentácii. Ako ukázali pozorovania Linka a Kronlöfa⁵, tvorba organoleptických vlastností bola lepšia a stabilnejšia pri použití pórovitého skla v porovnaní s nosičom na báze DEAE celulózy. Navyše je významné, že na imobilizáciu boli použité kvasinky geneticky modifikované kódovaním α -acetolaktát dekarboxylázy. Gén α -acetolaktát dekarboxylázy bol izolovaný z *Klebsiella terrigena* a zavedený do kmeňov pivovarnických kvasiniek⁶. Tieto kvasinky potom produkovali pivo s výrazne nižším obsahom diacetylú ako normálne kmene pivovarnických kvasiniek imobilizované vhodným spôsobom. Transformované kvasinky nevykazovali žiadne rozdiely v utilizácii voľného amino-dusíka alebo v tvorbe vyšších alkoholov.

Problémy týkajúce sa fyzikálno-chemických charakteristík nosičov pre imobilizáciu a ich obmedzujúce aspekty pri výbere konfigurácie reaktora dovolaujúceho optimálny transport materiálu sa vzhľadom na dosiahnuté zlepšenie zdajú byť vyriešené.

V nedávnych rokoch technológia imobilizovaných buniek zaznamenala rýchly rozvoj. Dva základné spôsoby imobilizácie s možnou aplikáciou v pivárenskom priemysle sú zabudovanie buniek do vnútra gélu ako nosiča a adsorpcia buniek na povrch nosiča.

Výhody zabudovania kvasiniek na nosič typu polymérneho gélu spočívajú vo vysokej koncentrácii biomasy umožňujúcej optimalizáciu objemovej produktivity. Hlavné nevýhody tohto spôsobu sú nekontrolovateľný bunkový rast, praskanie guľčiek gélu pri normálnej tvorbe CO_2 a difúzne limitácie. Schodnejšia cesta sa ukázala pri použití spôsobu imobilizácie adsorpciou buniek do alebo na povrch nosiča, či už pórovitého alebo nepórovitého, čo našlo svoje využitie aj v priemyselnej praxi. Z hľadiska mikroorganizmov je to veľmi šetrná fixačná metóda, ktorá nevyžaduje žiadne zmeny v kultivácii na produkciu imobilizovaných biokatalyzátorov.

Pri imobilizovaných systémoch buniek je veľmi dôležitý tvar reaktora, ktorý je daný spôsobom aplikácie systému, zvoleným nosičom a požiadavkami pre želaný prestup látok.

Reaktory s náplňovou vrstvou využívajúce imobilizované kvasinky na DEAE celulóze sa používajú pri kontinuálnom dokvášaní a pri výrobe bezalkoholického piva. Tieto systémy je možné použiť aj pre primárnu fermentáciu v miešanom reaktore s fluidizovanou vrstvou alebo vo fermentore s cirkuláciou plynnej a kvapalnej fázy. Pri laboratórnych experimentoch zatiaľ zisťujeme problémy s nad-

mernou tvorbou CO_2 , čo je limitujúci faktor pri optimálnom prestupe látok a výkone reaktora, ale viac výhod očakávame pri aplikácii v pivárenskom priemysle, kde je potrebné naplno využiť potenciál technológie imobilizovaných buniek.

Van de Winkel a kol.⁷ dokázal, že s použitím silikón-karbidového nosiča v dvojstupňovom viacanálovom type reaktora so slučkou je možné dosiahnuť úplné prekvasenie mladiny. Úplne tlmenie bolo dosiahnuté v kolónach zapojených v sérii. Systém bol stabilný, mal variabilné zriedňovacie rýchlosti a chuťový profil produktu bol zhodný ako pri použití tradičných technológií. Celkový zdržný čas aj s časom v kolónach bol dva a pol dňa.

Primárna fermentácia piva pomocou imobilizovaných kvasiniek je veľmi náročný problém. Oxid uhličitý vznikajúci v kvasnom procese môže vytvárať mftve objemy vo fermentore, čím dôjde ku kavitácii v procese a klesne efektívnosť kvasenia. Takéto problémy vznikli pri fermentáciách v náplňových kolónach a vo fermentore s fluidizovanou vrstvou. Tento problém vyriešili Van de Winkel a kol.⁷ aplikáciou silikón-karbidového nosiča v náplňovej kolóne s vnútorným recyklom substrátu, kedy je kontakt kvapalnej fázy s kvasinkami maximálny. Úplné prekvasenie mladiny dosiahli v dvoch sériovo zapojených fermentoroch. Fermentácia prebiehala pri 15 °C a pri pH mladiny 5,2 s poklesom na 4,5. Reaktor s nosičom bol inokulovaný suspenziou buniek tak, aby výsledná koncentrácia kvasiniek bola 10^8 buniek na ml fermentora. Imobilizácia buniek do fermentora bola prevedená recykláciou suspenzie buniek. Celý imobilizačný proces prebiehal pri aerácii s koncentráciou kyslíka 2 mg.l⁻¹. Fermentačný proces bol rozdelený na dve časti. V prvej fáze sa pracovalo za koncentrácie kyslíka 1 mg.l⁻¹ a potom sa prechádzalo na anaeróbny režim. Výsledný produkt - pivo - malo koncentráciu etanolu 4,5 % obj. na výstupe z fermentora.

Vo svojej práci Inoue⁸ poukazuje na vplyv fyziologického stavu kvasiniek na kvalitu piva v priebehu kontinuálnej fermentácie mladiny. Lag-fáza, ktorá pri klasických technológiách trvá okolo 10 hodín, je pre ekonomické využitie fermentorov veľmi nevýhodná, preto je snahou túto fázu z prevádzky eliminovať. Fermentácia prebiehala v dvojnádobovom systéme. V prvom tanku prebiehalo kvasenie pomocou voľných buniek za mierneho prevzdušnenia na 0,5 mg.l⁻¹. Fermentácia trvala 15 hodín a produkt na výstupe bol porovnateľný s pivom, ktorý vzniká klasickou fermentáciou za 4 dní. Po fermentácii nastala separácia kvasníc pomocou centrifúgy. Pri hlavnom kvasení takýmto spôsobom došlo k značnému poklesu dusíkatých látok.

V druhom tanku prebiehalo dokvasovanie pomocou imobilizovaných kvasiniek na keramickom nosiči, pričom autori poukazujú na výhody keramického nosiča oproti použitiu alginátu vápenatého. Dokvasovanie bolo odskúšané na oboch nosičoch. Doba fermentácie bola 180 dní, pričom $V/V_{\max}$ pri použití keramického nosiča klesol na 80 % a v prípade alginátu vápenatého na 38 % pôvodnej hodnoty.

Osobitným prípadom v pivovarníctve je výroba špeciálnych pív. Na výrobu nízkoalkoholického alebo bezalkoholického piva sú dve možnosti: 1. odstránenie alkoholu pomocou separačných techník (vakuová destilácia, dialýza, reverzná osmóza); 2. pomocou tzv. stop kvasenia. Vo vsádzkovom systéme je tento proces ťažko regulovateľný. Nová éra vo výrobe bezalkoholického piva sa začala po aplikácii imobilizovaných kvasiniek v kontinuálnom systéme. V kontinuálnom fermentore s vnútorným recyklom substrátu pri 15 °C prebieha kvasný proces so zdržným časom od 1 do 7,7 hodín. Koncentrácia etanolu na výstupe sa udržiava v rozsahu od 0,1 do 0,4 % obj. Zdržný čas je regulovaný na základe koncentrácie etanolu na výstupe z fermentora. Koncentrácia imobilizovaných buniek je 10 g suchých kvasiniek na 1 kg náplne. Fermentácia prebieha za aerácie $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ O}_2$. Koncentrácia buniek na výstupe fermentora je $0,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ suchej hmotnosti.

Nedović a kol.⁹ modeloval kvasenie mladiny pomocou imobilizovaných kvasiniek v gas-lift reaktore. „Veľkosť“ nosiča, ktorým bol alginát-vápenatý, bola v priemere 3 mm. Fermentácia trvala 3 mesiace pričom po vyčerpaní skvasiteľných sacharidov z fermentačného média bol substrát vymenený za čerstvý. Autori charakterizovali Monodovu konštantu a porovnávali ju s modelovou hodnotou. Zaujímavý bol malý rozdiel medzi nameranou a vypočítanou hodnotou (0,34 %). Rast buniek v nosiči charakterizovali pomocou špecifických rastových rýchlostí a časom zdvojenia. Fermentačný proces podľa rýchlosti poklesu extraktu delili na dve časti, na hlavné kvasenia a na dokvasovanie. Čas zdvojenia buniek v prvej fáze bol 2,75 hodín a v druhej fáze 12,56 h. Celý fermentačný proces trval 16 až 20 hodín v závislosti od cyklu fermentácie.

Poledníková a kol.¹⁰ vyrábali pivo taktiež pomocou imobilizovaných kvasiniek. Kvasný cyklus na výrobu 10° piva trval 7 dní. Ako nosič používali alginát vápenatý. Pivo malo porovnateľné parametre s pivom vyrobeným klasickým spôsobom za trojnásobnú dobu fermentácie. Peletky alginátu vápenatého s kvasinkami nasádzali 60-krát. Mechanické vlastnosti biokatalyzátora boli vyhovujúce po 8 mesiacoch. Bol zistený aj rozdiel v utilizácii aminokyselín pri aplikácii jednotlivých kvasiniek v imobilizovanej a voľ-

nej forme. Pri dlhých kvasných cykloch sledovali vzťah medzi množstvom biokatalyzátora, teplotou fermentácie a kvalitou získaného piva.

Šmogrovičová a kol.¹¹ odskúšali dva typy reaktorov, v oboch bol použitý pektátový aj alginátový nosič. Medzi zvolenými nosičmi nebol podstatný rozdiel, výsledky záviseli od typu reaktora. Najvyššie špecifické rýchlosti spotreby substrátu sa dosiahli v air-lift reaktore ($\max. 6,07 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). V prípade rúrkového reaktora s perforovanými etážami rýchlosť prekvasenia bola vyššia ako v sériovom systéme reaktorov, maximálna dosiahnutá špecifická rýchlosť spotreby substrátu bola $4,62 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a substrát bol úplne prekvasený (konc. sacharidov na výstupe $18,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Zaujímavá kombinácia pri výrobe piva je publikovaná Andriesom a kol.¹² V prvom stupni bol použitý náplňový reaktor s vnútorným recyklom fermentačného média. Kvasinky boli imobilizované do silikón-karbidového nosiča. V druhom fermentore prebiehalo dokvasovanie voľných kvasiniek. Objem prvého fermentora bol 0,36 hl, prietok substrátu $4,5 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$, to znamená že zdržný čas vo fermentore bol 8 hodín. Koncentrácia imobilizovaných kvasiniek bola $1,8 \times 10^8$ buniek a $5,5 \times 10^7$ voľných buniek na ml média. V druhom fermentore prebiehalo dokvasovanie pomocou voľných kvasiniek s koncentráciou $8 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Zdržný čas piva bol 16 hodín. Teplota v oboch fermentoroch bola 24 °C.

5. Kontinuálne dokvasovanie imobilizovanými bunkami

Odstránenie diacetylu, 2,3-pentadiónu a ich prekurzorov α -acetolaktátu a α -acetohydroxybutyrátu je jedným z hlavných cieľov procesu dokvasovania. Chuťová hranica vicinálnych diketónov je stanovená na 0,1 ppm.

Tvorba a odbúranie vicinálnych diketónov je zahrnutá v troch krokoch: 1. syntéza a vylúčenie α -acetohydroxylových kyselín kvasinkou; 2. oxidatívna dekarboxylácia α -acetohydroxylových kyselín na ich diketóny; 3. redukcia vicinálnych diketónov kvasinkami. Limitujúcim krokom je konverzia α -acetohydroxylových kyselín na vicinálne diketóny, efektívna kontrola diacetylu a 2,3-pentadiónu môže byť dosiahnutá zabránením tvorby ich prekurzorov alebo zvýšením rýchlosti chemickej dekarboxylácie.

Tvorba vicinálnych diketónov bola dlho študovaná a dobre objasnená^{13,14}. Je dôsledkom oxidatívnej dekarboxylácie α -acetohydroxylových kyselín prepúšťaných z biosynthetickej dráhy izoleucín-valín. Treonín-deamináza a aceto-

laktát-syntetáza sú vystavené veľmi silnej inhibícií spätnou väzbou vyvolanou izoleucínom resp. valínom. Pivovarnícke kvasinky pri fermentácii mladiny využívajú tieto aminokyseliny s oneskorením. Hlavná príčina nadprodukcie α -acetohydroxylových kyselín v začiatkoch fermentácie je zvýšenie aktivity enzýmov zodpovedných za ich tvorbu. Výber a konštrukcia kmeňov s redukovanou alebo mutáciami upravenou katalytickou funkciou syntetázy acetohydroxykyselín^{15,16} môže byť krokom k dosiahnutiu prahovej úrovne vicinálnych diketónov v pive. Na druhej strane, pokles aktivity produktu génu ILV2 na limitujúcu úroveň uvoľní kontrolu spätnej väzby znížením obsahu valínu a vzápätí spôsobí nadprodukciu vicinálnych diketónov. Toto bolo potvrdené experimentami s dávkovaním génu¹⁷, ktoré ukázali, že 90%-ná redukcia aktivity acetolaktát syntetázy mala za následok zníženie obsahu izoleucínu a valínu, ale nie produkcie vicinálnych diketónov.

Pokles funkcionálnych ILV5 génov vedie k zvýšeniu produkcie vicinálnych diketónov. Z toho je zrejmé, že izoméroreduktáza je limitujúcim krokom rýchlosti v ILV biosyntetickej dráhe. Tieto zistenia boli potvrdené v predchádzajúcich štúdiách, ktoré ukázali, že zosilnenie ILV génu má za následok 70 až 80%-ný pokles úrovne celkových vicinálnych diketónov¹⁸⁻²⁰.

Iný spôsob dosiahnutia subprahovej úrovne vicinálnych diketónov v pivovarníckych fermentáciách je klonovanie α -acetolaktát dekarboxylázy z *Klebsiella terrigenis* do pivovarníckych kvasiniek^{21,22}. Priemyselné využitie upravených pivovarníckych kvasinkových kmeňov by viedlo k prekonaniu problémov s diacetylmi v pivovarníctve. Aplikácia technológií rekombinantných DNA do pivovarníckych kvasiniek je však legislatívne regulovaná a vo veľkej miere podlieha aj tradíciám a požiadavkám spotrebiteľa.

Problém rýchleho a kompletného odstránenia vicinálnych diketónov by bolo možné riešiť práve použitím technológií s imobilizovanými kvasinkami.

Keďže limitujúcim krokom je konverzia α -acetohydroxylových kyselín na vicinálne diketóny, efektívna kontrola koncentrácie diacetylu a 2,3-pentadiónu vo finálnom produkte by mohla byť dosiahnutá zvýšením rýchlosti chemickej dekarboxylácie. Toto je možné riešiť zahrievaním piva po separácii kvasiniek.

Ukázalo sa, že na kompletnú konverziu acetolaktátu sú potrebné teploty v intervale 80 až 90 °C. Zaujímavé je, že pri striktno anaeróbných podmienkach reakcia za diacetylom prebieha priamo na acetoín²³.

H. Lommi a kol.²⁴ navrhovali na dokvasovanie mladého piva systém pomocou imobilizovaných buniek. Hlav-

né kvasenie prebiehalo klasickým spôsobom. Pivo sa po hlavnom kvasení čírlilo centrifugáciou. Táto operácia je dôležitá, lebo pri nedokonalnej separácii by mohlo dôjsť k autolýze buniek pri ďalších operáciách. Po separácii kvasiniek pivo postupovalo do výmenníka tepla. Vo výmenníku došlo k zohriatiu piva za účelom odbúrania diacetylu a ostatných prekursorov tejto nežiadúcej látky. Zároveň pri tejto operácii bolo mladé pivo vysterilizované pred vstupom do dokvasovacej kolóny. V ďalšom výmenníku bolo pivo ochladené na 10 °C a pri tejto teplote prebiehalo dokvasovanie v náplňovej kolóne pomocou imobilizovaných kvasiniek na DEAE celulóze. Zdržný čas mladého piva vo fermentore bol 2 až 3 hodiny. Kvalita takto vyrobeného piva je porovnateľná s pivom dokvasovým za 14 dní klasickým spôsobom.

Pajunen a kol.²⁵ poukázali na komerčne využitie dokvasiaceho systému s použitím imobilizovaných kvasiniek na granulovanom derivatizovanom celulóзовom materiáli (DEAE celulóza) - pezymeR GDC, vyrábanom firmou Cultor vo Finsku. Vicinálne diketóny boli čiastočne odbúrané tepelnou konverziou. Pred teplotným spracovaním mladého piva bol zabudovaný separačný modul na odstránenie kvasiniek z piva. Odseparované kvasinky boli vrátené do fermentorov na hlavné kvasenie. Pri dokvasovaní bežne dochádza k autolýze kvasiniek, preto je dôležité, aby boli kvasinky separované pred tepelným zásahom. Prekursor diacetylu boli odbúrané pri 90 °C za 7 minút. Mladé pivo po ochladení na 15 °C vstupovalo do fermentora, kde prebiehalo dokvasovanie imobilizovanými kvasinkami. Zdržný čas v kolóne na dokvasovanie bol od 2 do 3 hodín v závislosti od stupňa prekvasenia na vstupe. Kombináciou takéhoto typu dokvasovania s hlavným kvasením v cylindrokonickej tanku sa dá zefektívniť využitie priestorov o 55 %. Zámerom pri iniciácii tejto technológie bolo zvýšenie a väčšia flexibilita objemovej produktivity ako aj redukcia skladovacích potrieb. Proces bol zameraný na aplikáciu imobilizovaných buniek na dosiahnutie a dostatočnú redukciu diacetylu pri nezmenenej primárnej fermentácii voľnými bunkami. Zariadenie obsahovalo hermetickú centrifúgu, regeneračný výmenník tepla s variabilným objemom buniek, reaktor s imobilizovanými bunkami a chladič piva. Celé zariadenie bolo skonštruované z nerežovej ocele, s automatickými ventilmi a kontrolovateľným prietokom. V tomto systéme boli zvyškové kvasinky v pive na konci primárnej fermentácie scentrifugované kvôli zabráneniu prenikania autolyzovanej chuti do piva počas procesu. Odstránenie buniek kvasiniek a proteínov sa ukázalo byť kritické, pretože dochádzalo k riziku znečistenia

výmenníka tepla a upchania náplňovej vrstvy reaktora. Tepelné pôsobenie (7 min pri 90 °C) umožnilo celkovú konverziu α -acetolaktátu na diacetyl. Toto tepelné opracovanie piva bolo realizované pred vstupom do bioreaktora s imobilizovanými kvasinkami. V reaktore s náplňovou vrstvou bol prietok piva v smere zhora nadol v snahe zabrániť tvorbe kanálikov. Kontaktný čas 2 hodiny bol optimálny z hľadiska ukončenia fermentácie fermentovateľného extraktu a dosiahnutia koncentrácie diacetylu pod povolenou hranicou 0,05 mg.l⁻¹. Vyššie opísaný Synebrychoffov dokvášací systém nevykazoval žiadne detegovateľné rozdiely v chuťových vlastnostiach piva v porovnaní s pivom dokvášaným tradičnými technológiami. Celkový čas dokvasovania bol zredukovaný z 10 až 14 dní na 2 až 3 hodiny. V tomto reaktore neboli pozorované žiadne nové syntézy α -acetolaktátu. Jediný parameter, ktorý vplýval na kvalitu piva, bola dĺžka tepelného pôsobenia. V prípade predĺženia tepelného pôsobenia na 20 min sa pomaly zvyšovala koncentrácia hydroxymetylfurfuralu²⁶.

Tento dokvášací systém je realizovaný v pivovare Synebrychoff Kerava s kapacitou 1 milión hl/rok (cit.²⁵). Po tepelnom pôsobení sú zaradené štyri reaktory s maximálnym celkovým prietokom 140 hl.h⁻¹, ktorý korešponduje s kapacitou centrifúgy a časom potrebným na vyprázdnenie fermentorov pre potreby primárnej fermentácie. Konštrukcia systému je stavebnicová, čo umožňuje dve, tri, alebo aj štyri fermentačné operácie.

6. Záver

Udržanie trendu ekonomicky výhodnej produkcie piva so zachovanou kvalitou výrobku znamená využívať technológie s kratším časom fermentácie, čo je spojené s aplikáciou imobilizovaných kvasiniek.

Medzi operačné výhody systémov s imobilizovanými kvasinkami patrí:

1. krátka lag-fáza pred dosiahnutím ustáleného stavu,
2. možná náhrada filtračného modulu,
3. ľahké a rýchle naštartovanie fermentácie,
4. imobilizácia a regenerácia v reaktore,
5. možnosť stavebnicových operácií,
6. flexibilita manipulácie porovnateľná s filtráciou.

Ako je možné vidieť z odbornej a vedeckej svetovej literatúry, kontinualizácia kvasenia v pivovarníctve je predmetom výskumu v mnohých inštitúciách. Prítom je potrebné zachovať analytické, ale aj senzorické parametre nápoja a zároveň musí vyhovovať požiadavkám trhu.

LITERATÚRA

1. Hardwick W. A.: *Handbook of Brewing*. Marcel Dekker, New York 1995.
2. Kolektiv autorov VÚPS a VIPPN Moskva: *Pokroky v technológii výroby sladu a piva*. SNTL, Praha 1982.
3. Klover W. J., Roberts R. H., Royston M. G., Ault R. G.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 10th Congress, Stockholm 238 (1965)*.
4. Masschelein C. A.: *Proc. Inst. of Brew., Australia and New Zealand, Section 21st Conf., Auckland 6 (1990)*.
5. Pajunen E., Grönquist A., Ranta B.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 23rd Congress, Lisbon 361 (1991)*.
6. Pajunen E.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 24th Congress, Oslo 559 (1993)*.
7. Van de Winkel L., Van Beveren P., Borremans E., Goosens E., Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 24th Congress, Oslo 307 (1993)*.
8. Pajunen E., Mäkinen V., Gisler R.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 21st Congress, Madrid 441 (1987)*.
9. Nedovič V., Obradovič B., Vunjak-Novakovič G., Leskosek-Cukalovič I.: *Hem. Ind. 47, 168 (1993)*.
10. Poledníková M., Voborský I., Chládek L., Šrma T.: *Kvas. Prum. 39, 2 (1993)*.
11. Andries M., van Beveren P. C., Goffin O., Masschelein C. A., Rajotte P.: *Brewing and Distilling 2, 13 (1997)*.
12. Šmogrovičová D., Dömény Z., Gemeiner P., Malovíková A., Šturdík E.: *Biotechnol. Techn. 11, 261 (1997)*.
13. Giermanssen C., Nilsson-Tilgren T., Litske-Petersen J. G., Killand-Brandt M. C., Sigsgaard P., Holmberg S.: *J. Basic Microbiol. 28, 175 (1988)*.
14. Holmberg S., Litske-Petersen J. G.: *Curr. Genet. 13, 207 (1988)*.
15. Wada M., Kato J., Chibata I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. 14, 275 (1980)*.
16. Galvan L., Perez A., Delgado M., Conde J.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 21st Congress, Madrid 385 (1987)*.
17. Debourg A., Masschelein C. A., Pierard A.: *6th Int. Symp. Genet. Ind. Microorganisms, Abst. C31, 148 (1990)*.
18. Dilleman M., Goosens E., Goffin O., Masschelein C. A.: *J. Am. Soc. Brew. Chem 45, 81 (1987)*.
19. Goosens E., Dilleman M., Debourg A., Masschelein C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 21st Congress, Madrid 553 (1987)*.

20. Villanueva K. D., Goosens E., Masschelein C. A.: J. Atn. Soc. Brew. Chem. 48, 11 (1990).
21. Simon J. P., Benoot T., Defroyennes J. P., Deckers B., Dekegel D., Vandegans J.: *Physiology of Immobilized Cells*. Elsevier, Amsterdam 1990.
22. Simon J. P., Kaub R., Lebecque S., Defroyennes J. P., Plaisant A. M.: *Proc. XII Int. Special Symp. Yeast, Leuven, Belgium 184 (1989)*.
23. Inoue T., Murayama H., Kapino K., Kamiya T., Mitsui S., Mawatori M.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 23rd Congress, Lisbon 369 (1991)*.
24. Lommi H., Grönquist A., Pajunen E.: Food Technol. May, 127 (1990)
25. Pajunen E., Grönquist A., Ranta B.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 22nd Congress, Zürich 339 (1989)*.
26. Pajunen E.: *Proc. Eur. Brew. Conf., 24th Congress, Madrid 559 (1993)*.

Z. Dömény, D. Šmogrovičová, and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Slovak Technical University, Slovak Republic*): **Continuous Fermentation Processes in Beer Production Using Immobilized Yeast**

The continuous beer fermentation has been studied. The results from the continualization of the primary and secondary fermentation, where immobilized cells were applied, are presented. Different carriers used are compared and the recent knowledge of the reactor systems applied in the beer fermentation is summarized.