

K. Wackerbauer, A. Ludwig und J. Legrand

Verbesserung der Langzeitstabilität in Hauptgärungen mit immobilisierter Hefe

I. Versuche in Festbettreaktoren und Einfluss definierter Belüftung

In einem Festbettreaktor mit DEAE-Cellulose wurde innerhalb eines Screeningversuches eine für die gewählten Versuchsbedingungen optimal erscheinende Belüftungsrate ermittelt, um auf diese Weise die Langzeitstabilität des Reaktors zu verbessern. Änderungen der Belüftungsrate wirkten sich innerhalb eines Tages auf Menge und Zusammensetzung der gebildeten Gärnebenprodukte aus. In einem weiteren Versuch im Festbett wurde mit der Standard-Belüftungsrate über die gesamte Versuchsdauer belüftet und das produzierte Bier umfassend analysiert. Gegenüber einem unbelüfteten Referenzversuch ergab sich eine erheblich konstantere Bierqualität über die Reaktorlaufzeit von 47 Tagen hinsichtlich der höheren aliphatischen Alkohole und Ester. Es kam aber tendenziell auch im belüfteten Ansatz zu einer Abschwächung der FAN-Konsumption und zu einem Anstieg des pH-Wertes. Ferner zeigte DEAE-Cellulose eine starke Verblockungsneigung, so dass Versuche mit diesem Material nicht weitergeführt wurden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Sinterglasmaterial Siran® mit einem neuartigen Carrier aus Silikon verglichen, da sich beide morphologisch sehr ähneln. Die Immobilisierungsrate des neuen Materials war geringer als die von Siran®, auch wurden vom neuen Material mehr Bitterstoffe adsorbiert. Ein großer Vorzug des Silikon-Carriers war aber seine gute mechanische Stabilität. Die Auswirkungen der beiden Trägermaterialien auf die Bierqualität im belüfteten und unbelüfteten Ansatz waren während des Reaktorbetriebes von eher untergeordneter Bedeutung. Hier hatte die Belüftung einen deutlich größeren Einfluss als das Material. Ähnlich wie in den Versuchen mit DEAE-Cellulose kam es im Falle der belüfteten Ansätze ebenfalls zu einer allmählichen Veränderung der Bierqualität. Die Verblockungsneigung beider Materialien fiel hingegen geringer aus als die von DEAE-Cellulose.

BC 23 Gärung

(Deskriptoren: Langzeitstabilität, Geschmacksstoffe, Aromakomponenten, immobilisierte Hauptgärung, Trägermaterialien.

Descriptors: Long term stability, flavour substances, aroma compounds, immobilized main fermentation, carrier materials).

1 Einleitung

Die Etablierung kontinuierlicher Prozesse in der Brauerei stellt seit langer Zeit eine Herausforderung für die brauwissenschaftliche Forschung dar. Die größte Aufmerksamkeit ist dabei der Hauptgärung und Reifung des Bieres als geschwindigkeitsbestimmende Schritte unter den verschiedenen Prozessstufen der Bierproduktion gewidmet worden. Besondere Bedeutung erlangten hierbei Verfahren zur Immobilisierung von Hefe an oder in Trägermaterialien bzw. hinter Membranen. Die Idee einer Immobilisierung von Hefe im Brauprozess wurde bereits 1892 von *Delbrück*, dem ersten wissenschaftlichen Direktor der VLB Berlin, in dessen „Arbeiten mit gefesselter Hefe“ formuliert (1). Allerdings setzten sich die seinerzeit vorgeschlagenen Ansätze nicht in der Praxis durch. Aufgegriffen wurde die Idee zur Immo-

bilisierung von Hefe erst wieder in den 1960er Jahren. So wurde von *Berdelle-Hilge* ein System zur Immobilisierung mittels Anschwemmung der Hefe auf einer Stützschiicht entwickelt (2). Versuche zur beschleunigten Gärung und Reifung auf der Basis dieses Systems durch *Narziß* und *Hellich* führten zu nahezu endvergorenen Bieren. Als problematisch erwiesen sich jedoch die inkonstanten pH-Verhältnisse im Bier sowie erhöhte Gehalte an freiem α -Aminostickstoff und Diacetyl (3). In der Arbeit von *Narziß* und *Hellich* wurden bereits Probleme beschrieben, die bis in die jüngste Zeit bei der Anwendung immobilisierter Hefe für die Hauptgärung von Bedeutung sind.

Die 1980er und 1990er Jahre brachten wichtige Innovationen im Bereich der „Immo“-Technologie nicht zuletzt durch den Einsatz neuartiger Trägermaterialien. So wurden Systeme zur kontinuierlichen Reifung des konventionell vergorenen Jungbieres vorgestellt, welche bereits seit über zehn Jahren in zwei finnischen Brauereien großtechnisch eingesetzt werden (4, 5). Ähnliches gilt für die Anwendung immobilisierter Hefe zur Herstellung alkoholfreier Biere in einer niederländischen Brauerei (6).

Immer noch in der Phase der Entwicklung sind jedoch Systeme für die „Immo“-Hauptgärung. Die prinzipiellen Vorteile, die man sich von derartigen Verfahren verspricht, sind insbesondere eine höhere Zelldichte pro Einheit Reaktorvolumen und hierdurch eine vergrößerte volumenbezogene Produktivität des Bioreaktors, höhere Gäraten, ein reduziertes Reaktorvolumen und ein verringertes Risiko von Kontaminationen im Reaktor (7). Des weiteren werden als Vorteile eine einheitlichere Qualität des Produkts aufgrund des kontinuierlichen Betriebs sowie eine einfachere Überwachung des Prozesses genannt (8).

Tabelle 1 Entwicklungstendenzen für ausgewählte Analysenparameter in Jungbier während des unbelüfteten Reaktorbetriebs (9, 10)

Analysenparameter	Typische Entwicklung im "Immo-Jungbier"
pH-Wert	steigt
Freier α -Aminostickstoff	steigt, hohe Werte nach mehreren Wochen Reaktorbetrieb
Vicinale Diketone (Gesamt)	Mit hohen Werten beginnend (> 1 ppm), beträchtlicher Abfall über die Laufzeit
Höhere Alkohole	sinkend, relativ geringes Niveau
Acetate	steigend, aber relativ geringes Niveau

1.1 Langzeitstabilität als Aufgabe

Trotz der offensichtlichen Vorzüge und auch erheblicher Fortschritte in den vergangenen 30 Jahren hat sich die Hauptgärung mittels immobilisierter Hefe bis heute nicht in der industriellen Praxis durchsetzen können. Ein wichtiger Grund für diesen Umstand ist, dass die Bierqualität über eine lange Laufzeit des Reaktors nicht konstant und auch nicht einheitlich gut ist. Dies wäre aber notwendig, um eine wirtschaftlich sinnvolle großtechnische Anwendung des Verfahrens zu gewährleisten. Hierzu wäre ein mehrwöchiger, wenn nicht mehrmonatiger Betrieb des Reaktors ohne Reinigung und Neuansatz bei gleichbleibend guter Qualität des produzierten Bieres erforderlich. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Veränderungen der Bierqualität, die während des Reaktorbetriebs stattfinden. Neben den in Tabelle 1 genannten Veränderungen kann gerade in den ersten Tagen des Reaktorbetriebes eine überdurchschnittlich große Farbaufhellung und ein erheblicher Verlust an Bitterstoffen aufgrund von Adsorption am Trägermaterial auftreten (9).

Soweit die Versuchsanordnungen der einzelnen Autoren vergleichbar sind, wurden ähnliche Tendenzen wie sie in Tabelle 1 dargestellt sind auch von *Curin et al.* 1987 (11), *Kronlöf et al.* 1989 (12) oder *Linko und Kronlöf* 1991 (13) beobachtet.

Es ist offensichtlich, dass die dargestellten zeitlichen Veränderungen der Zusammensetzung des Bieres direkt mit Veränderungen des Hefestoffwechsels verknüpft sind. Hier spielt insbesondere die verringerte Vermehrung der Hefe eine Rolle, die zu einer verminderten Aufnahme von Aminosäuren und einer damit einhergehenden veränderten Bildung von Gärnebenprodukten führt. Als Konsequenz müssen demnach Maßnahmen gefunden werden, welche die Vermehrung der Hefe in der Weise fördern, dass das gewünschte Spektrum von Gärnebenprodukten im Bier gebildet wird.

1.2 Sauerstoffversorgung der Hefe im Reaktor

Die offensichtlichste Möglichkeit, die Vermehrung der Hefe während des Reaktorbetriebes zu beeinflussen, besteht in der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff. Der Einfluss der Sauerstoffversorgung der Hefe auf die Bildung geschmacklich relevanter Komponenten wie höherer Alkohole oder Ester ist schon seit langem bekannt und soll an dieser Stelle auch nicht beschrieben werden. Neben der Beeinflussung des Geschmacks ist eine Sauerstoffversorgung generell sinnvoll für die Viabilität der Hefe, da ungesättigte Fettsäuren und Sterole ausschließlich in Anwesenheit molekularen Sauerstoffs synthetisiert werden können. Diese fungieren als essentielle Komponenten der Zellmembranen und sind notwendig für ihre Existenz und Vermehrung (*Jakobsen und Thorne* 1980 (14)). In den letzten Jahren sind eine Reihe von Arbeiten erschienen, in denen Applikationen mit immobilisierter Hefe in Verbindung mit Belüftung beschrieben sind:

So lieferten *Kronlöf und Linko* 1992 einen Beitrag, in dem eine diskontinuierliche Belüftung des Reaktors mit einer Stickstoff-Sauerstoff-Mischung beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass der Reaktor durch eine solche Behandlung regeneriert werden konnte. Diese führte zu einer „korrigierten“ Zusammensetzung der Hefemetabolite im Bier, welche zuvor im anaeroben Reaktorbetrieb die typischen Veränderungen aufwies, darüber hinaus aber auch zu einer Verbesserung der Viabilität der Hefe (15). Die Bivalenz der Belüftung in kontinuierlichen Systemen für die Bierherstellung, die auch zu unerwünschten und unbalancierten Gehalten an Hefemetaboliten führen kann, wurde 1994 durch *Norton und D'Amore* angemerkt (16). Hieraus folgt die Notwendigkeit einer definierten Belüftung, das heisst, dass für eine Reaktorbelüftung jeweils das richtige Maß gefunden werden muss. Versuche mit definierter Belüftung durch Kohlendioxid-Sauerstoff-Mischungen und ihr Einfluss auf die Bildung von Gärnebenprodukten im Reaktorsystem sind von *Linko et al.* im Jahr 1997 beschrieben worden (17). Unter ähnlichen Versuchseinstellungen wurde in einer von *Virkajärvi et al.* verfassten Arbeit 1999 versucht, die Bildung von höheren Alkoholen und Estern in Abhängigkeit von der Gaszusammensetzung mathematisch zu modellieren (18). Schließlich wurden in jüngerer Zeit Arbeiten über verschiedene halb-technische Versuche veröffentlicht, in denen jeweils zwar keine Reaktorbelüftung, jedoch eine Belüftung der Würze vor Eintritt in den Reaktor vorgenommen wurde, so 1999 durch *Kronlöf et al.* (19), 1999 durch *Andersen et al.* (20) bzw. 2000 durch *Pajunen* (21). In unserer Arbeit sollten in einem ersten Schritt Standardbedingungen für die definierte Belüftung unserer Reaktoren entwickelt werden, um danach im Langzeitversuch die Auswirkungen derselben auf die Bierqualität zu untersuchen.

1.3 Bedeutung verschiedener Trägermaterialien

Für Trägermaterialien zur Immobilisierung von Mikroorganismen können laut *Cashin* die Mechanismen Einschluss in eine Gelmatrix, Anlagerung an eine feste Oberfläche, Adsorption in einer Aushöhlung oder Zurückhalten hinter einer Barriere unterschieden werden (22). Die Einschlussimmobilisierung in eine Gelmatrix wird aufgrund der Limitationen des „internen Massentransfers“ zur und von der immobilisierten Zelle (Diffusionslimitationen) mitunter als problematisch angesehen. Dennoch präsentierten *Pilkington et al.* in jüngerer Zeit aus dem Material Kappa-Karrageenan bestehende Gelkugeln, die in einem Gaslift-Reaktor für die Bierherstellung eingesetzt wurden (23). Beim MPI-Reaktor, der durch die belgische Firma Meura-Delta entwickelt wurde, befindet sich die Hefe immobilisiert in und auf festen Siliciumcarbid-Modulen. Der Reaktor ist als Schleifenreaktor konzipiert, die Module mit der Hefe werden permanent durch das Substrat angeströmt (24). Das System wurde durch *Wackerbauer et al.* geprüft und als vom technologischen Standpunkt her vielverspre-

chend bewertet (25). Dennoch machen sich die meisten eingesetzten Trägermaterialien die Mechanismen Anlagerung oder Adsorption für die Immobilisierung zunutze. Ihre Anwendung erfolgt zumeist in Festbettreaktoren (4 – 6,9,10,12,13,15,17 – 21). Relevante Faktoren für die Auswahl eines Trägermaterials sind neben dem internen Massentransfer laut Linko die folgenden: Es sollte unter anderem kostengünstig und einfach im Umgang sein, sollte die Hefe schnell und effektiv an sich binden. Das Trägermaterial sollte ferner stabil und robust sein, sollte eine geringe Verblockungsneigung haben und für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie geeignet sein (17). Als weiterer Schwerpunkt unserer Arbeit sollten ausgewählte Trägermaterialien untersucht und verglichen werden. Hierzu sollten sowohl mögliche Einflüsse auf die Qualität des Bieres im Langzeitversuch als auch die verfahrenstechnische Eignung der Materialien überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reaktorsystem

Das verwendete Festbettreaktorsystem ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt. Für Parallelversuche standen mehrere baugleiche Einheiten zur Verfügung. Die Würze wurde in einem gekühlten Raum bei 1 °C aufbewahrt, ebenso das produzierte Jungbier. Der Durchsatz betrug 0,5 kg/h, die Gärtemperatur 15 °C. Als Kontaminationsschutz wurde der Würzebehälter mit sterilem Inertgas (N₂) beaufschlagt. Ferner bestand die Möglichkeit, den Reaktor über die zufließende Würze steril zu belüften. Mittels eines Nadelventils konnte der Gasstrom exakt eingestellt und an einem Durchflussmesser abgelesen werden. Ferner war ein Druckregler installiert, der den Durchsatz unabhängig vom Hinterdruck konstant hielt. Das effektive Reaktorvolumen betrug ca. 12 Liter, davon ca. 9 Liter Festbettvolumen.

2.2 Trägermaterialien

Als Trägermaterialien kamen DEAE-Cellulose (Spezyme® GDC 220, Fa. Cultor), Sinterglas (Siran® SIKUG/012/05/300, QVF-

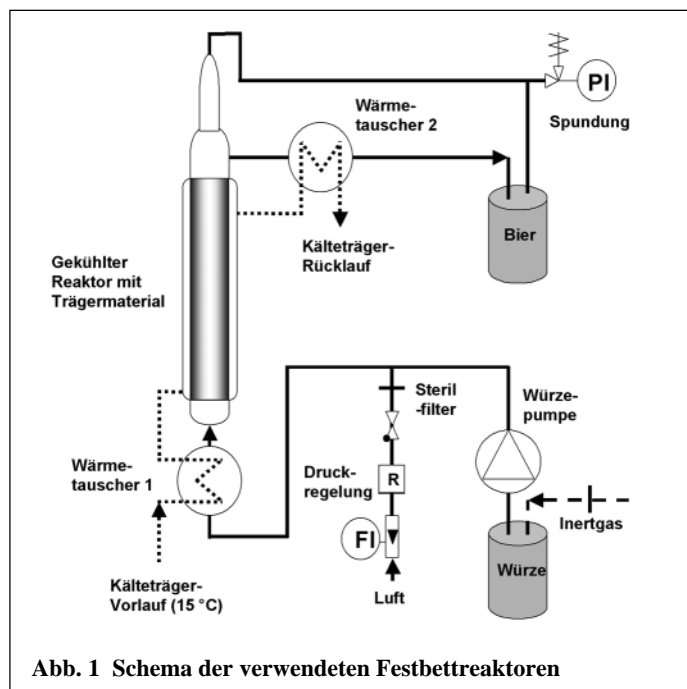


Abb. 1 Schema der verwendeten Festbettreaktoren

Engineering) und ein nicht kommerziell vertriebenes Trägermaterial aus Silikon zum Einsatz, das im Rahmen eines DFG-Forschungsprojektes entwickelt wurde (26).

2.3 Analysen

Nasschemische und gaschromatographische Analysen erfolgten gemäß den Analysenvorschriften der MEBAK. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie der TU Berlin angefertigt.

Die Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung wurde mit einer Schüttelvorrichtung bestimmt. Dazu wurden 50 ml Trägermaterial in einen 100 ml Standkolben gegeben und dieser mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurde eine Stunde mit 100 min⁻¹ geschüttelt. Der Inhalt der Kolben wurde danach über Faltenfilter filtriert, und der Rückstand durch ein Sieb mit 0,5 mm Maschenweite fraktioniert. Somit wurde das zerriebene Trägermaterial vom intakt gebliebenen getrennt und konnte quantifiziert werden.

Geräte: Schüttler, Fa. Gerhardt, 100 ml Standkolben, Faltenfilter 597½, Fa. Schleicher&Schuell, Edelstahl-Sieb, Maschenweite 0,5 mm

Die Anlagerung von Hefen und Bitterstoffen an den Trägermaterialien wurde mit einem 600 ml-Reaktor aus genormten Glasbauteilen untersucht. Zur Bestimmung der Bitterstoffadsorption wurde der Reaktor mit 500 ml Würze und 100 ml Trägermaterial befüllt. Die Versuchsdauer war auf acht Stunden, bei einer Zirkulationsrate von 2 l/h, festgelegt. Vor und nach Kontakt mit dem Carrier wurden die Bittereinheiten analysiert.

Zur Bestimmung der Besiedlungsdichten am und im Trägermaterial wurde der Reaktor mit 150 ml Trägermaterial befüllt. Um realen Bedingungen gerecht zu werden, wurde die Hefezellzahl mit mehr als 150 Millionen Zellen/ml eingestellt. Die Hefe wurde in filtriertes Bier suspendiert, dadurch entsprach der pH-Wert in etwa dem einer Reinzuchtsuspension, und eine Verfälschung der Ergebnisse etwa durch Anlagerung von Trubpartikeln am Material konnte weitestgehend ausgeschlossen werden. Der Volumenstrom betrug 2 l/h. Nach 24 Stunden wurde das Trägermaterial aus dem Reaktor entfernt und die Gewichts Differenz ermittelt. Für die spätere Quantifizierung war ebenfalls die Kenntnis der Hefetrockensubstanz erforderlich.

Geräte: Feinwaage, Fa. Mettler AT 200, Trockenschrank, Fa. WTB Binder

3 Ergebnisse

3.1 Versuche mit DEAE-Cellulose bei definierter Begasung

Zunächst wurde im Festbettreaktor mit dem Trägermaterial DEAE-Cellulose ein Screening-Versuch durchgeführt. Es sollte der Einfluss verschiedener Belüftungsraten auf die Qualität des erzeugten Bieres in unserem Reaktor überprüft werden. Hierzu wurden alternierend Belüftungsraten von 0 ml/min bzw. 50, 5 und 2 ml/min eingestellt. Die Resultate für die wichtigsten Gärnebenprodukte sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die Reaktion der Hefe auf eine eingestellte Belüftungsrate ergab sich innerhalb von einem Tag. Dies wird insbesondere bei der extrem hohen Rate von 50 ml/min deutlich. Hier zeigten VDK und Acetaldehyd besonders hohe Konzentrationen im Jungbier. Die höheren aliphatischen Alkohole (HAA) zeigten bei dieser Rate erhöhte und die Ester verringerte Werte. Bereits kurze Zeit nach

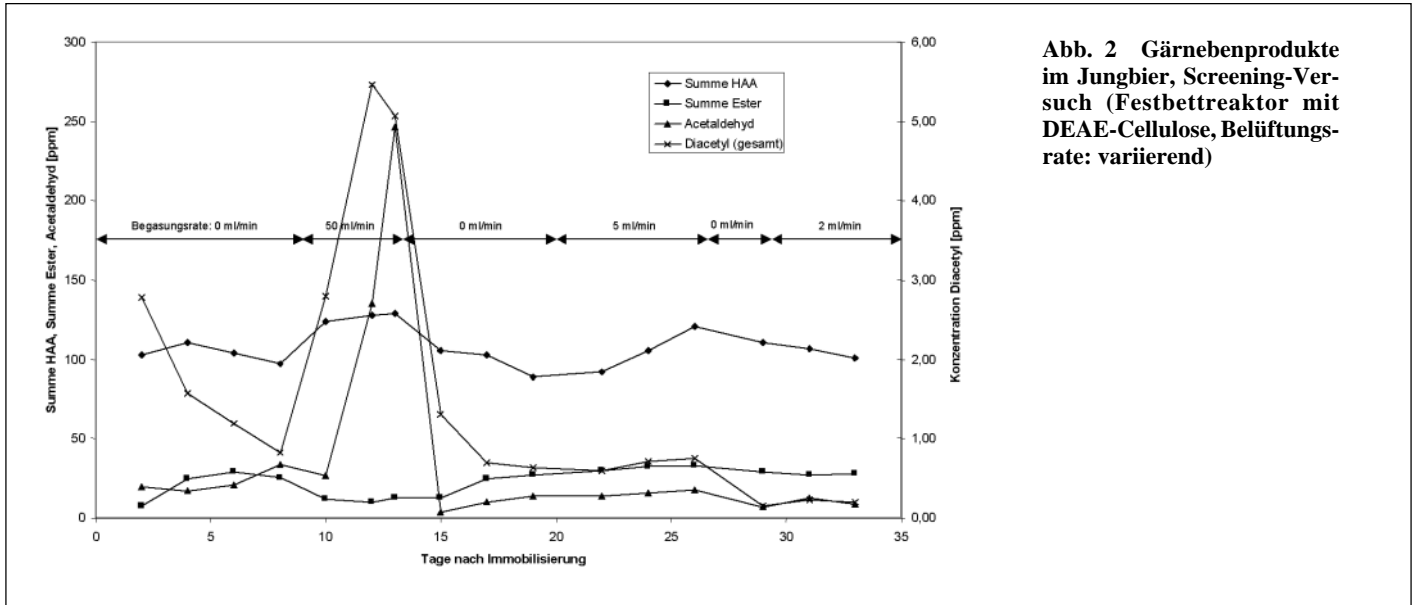


Abb. 2 Gärnebenprodukte im Jungbier, Screening-Versuch (Festbettreaktor mit DEAE-Cellulose, Belüftungsrate: variierend)

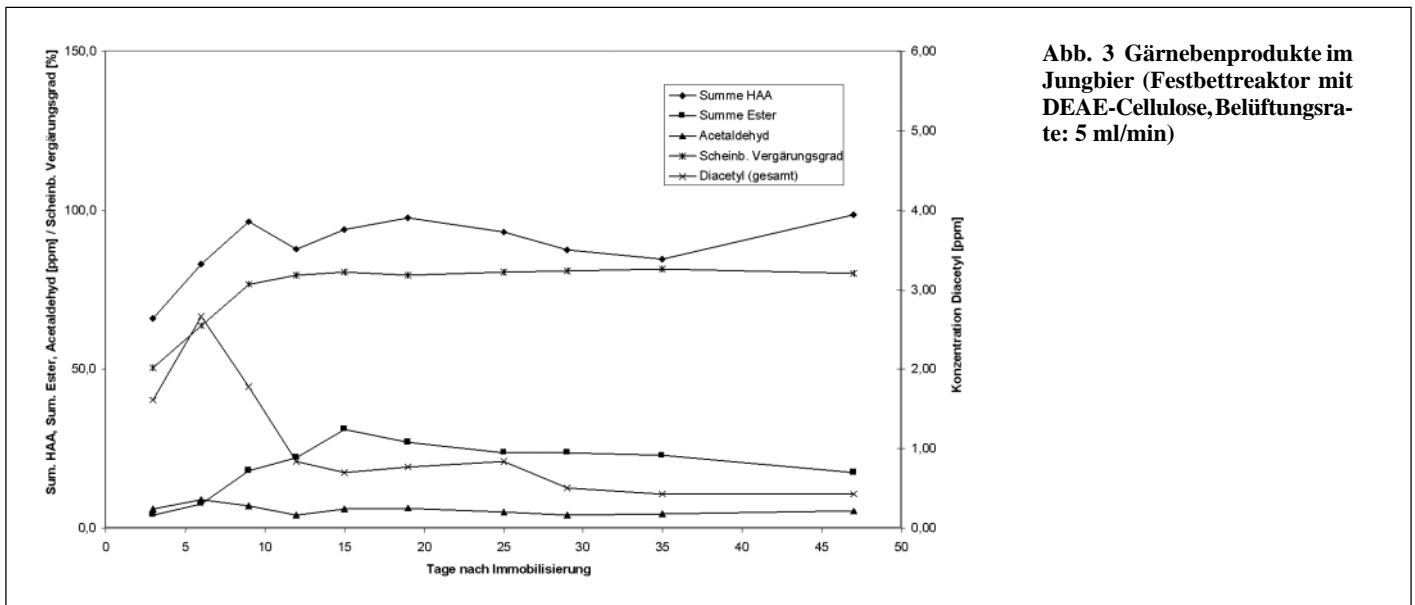


Abb. 3 Gärnebenprodukte im Jungbier (Festbettreaktor mit DEAE-Cellulose, Belüftungsrate: 5 ml/min)

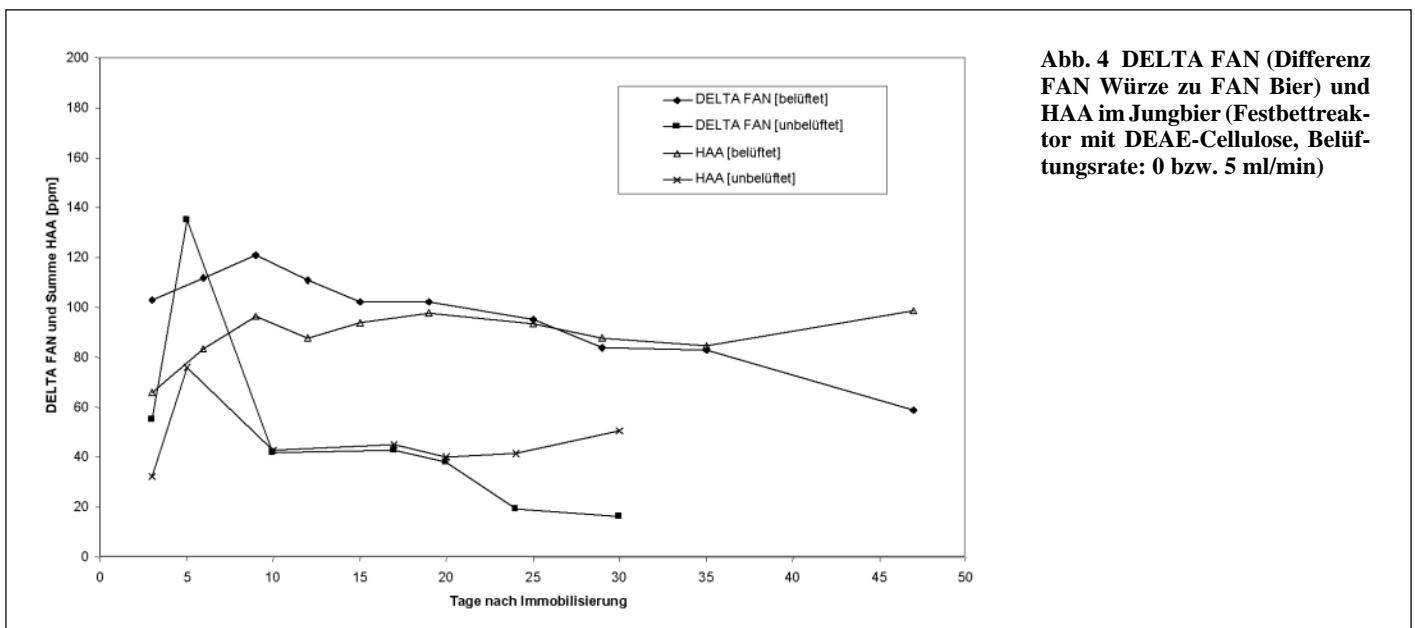


Abb. 4 DELTA FAN (Differenz FAN Würze zu FAN Bier) und HAA im Jungbier (Festbettreaktor mit DEAE-Cellulose, Belüftungsrate: 0 bzw. 5 ml/min)

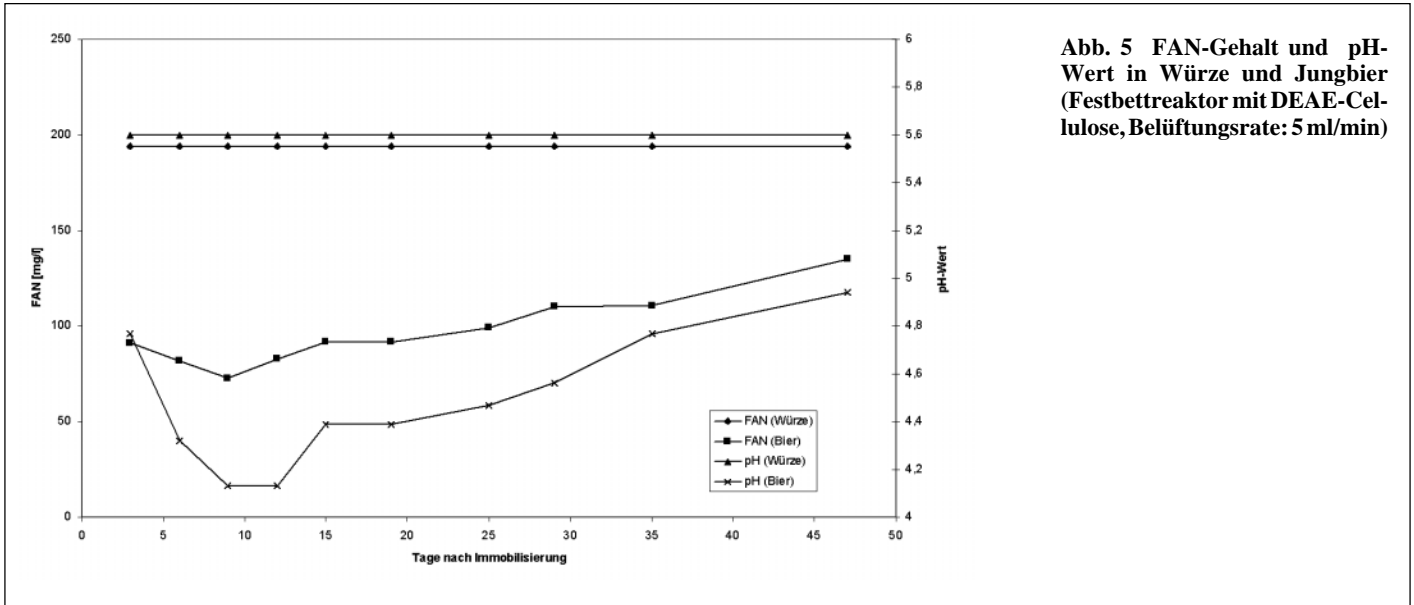


Abb. 5 FAN-Gehalt und pH-Wert in Würze und Jungbier (Festbettreaktor mit DEAE-Cellulose, Belüftungsrate: 5 ml/min)

dem Unterbrechen der Belüftung wurden in etwa wieder die Verhältnisse wie zuvor gefunden. Für die weiteren Versuche wurde eine Belüftungsrate von 5 ml/min festgelegt, da hier zwar noch ein Einfluss auf den Gehalt insbesondere der HAA erkennbar war, jedoch ohne dass die Komponenten Diacetyl und Acetaldehyd allzu hohe Werte annahmen, was für eine nachgeschaltete Reifung von Nachteil sein würde.

Die Ergebnisse eines solchen Versuchs mit konstanter Belüftung sind in der Abbildung 3 dargestellt, wobei die Bedingungen ansonsten denen des Screenings entsprachen. Es ist anzumerken, dass es innerhalb dieses Versuchs gelang, die Gehalte an höheren aliphatischen Alkoholen (HAA) sowie der Ester nach einem technischen Problem zu Versuchsbeginn (zu hoher Durchsatz) relativ konstant zu halten. Eine erhebliche Abnahme erfuhr hingegen der Diacetylgehalt im Jungbier nach Erreichen eines Spitzenwertes in der ersten Versuchswoche. Der Vergärungsgrad konnte wie gewünscht auf recht hohem Niveau eingestellt werden.

Um die Verbesserung der Reaktorkonfiguration mit definierter Belüftung gegenüber unbelüftet geführten Versuchen unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen zu prüfen, wurde ein Referenzversuch durchgeführt. Beispielhaft ist die Situation anhand der Parameter HAA und dem DELTA FAN (d. h. Abnahme des FAN Gehaltes von der Würze zum Bier) in der Abbildung 4 dargestellt. Die positive Wirkung der Belüftung auf die Konstanz der Produktzusammensetzung im Vergleich zum Referenzversuch ist unschwer zu erkennen.

Es soll jedoch nicht verschwiegen werden, dass trotz der offensichtlichen Verbesserung der Situation im Reaktor die Probleme mit dieser Reaktorkonfiguration nicht vollständig lösbar waren. Dies wird in Abbildung 5 deutlich.

Es kam immer noch zu einer allmählichen Veränderung der Produktzusammensetzung, obwohl diese verzögert wurde. Der FAN-Gehalt und pH-Wert stiegen im Laufe der Zeit an, was auf eine sich abschwächende Vermehrung der Hefe hinweist. In nahezu allen belüfteten Versuchen war ferner eine starke Verblockungsneigung des Trägermaterials DEAE-Cellulose zu verzeichnen, was zu einer ungleichmäßigen Verteilung von Würze und Bier im Reaktor aber auch zu einem starken Anstieg der Druckdifferenz im Reaktor führte. In der Folge wurden Versuche mit

DEAE-Cellulose ausgesetzt und es wurde nach geeigneteren Trägermaterialien Ausschau gehalten.

3.2 Vergleich von SIRAN® und einem neuartigen Silikon-Trägermaterial

Aufbauend auf den Erfahrungen mit dem Trägermaterial DEAE-Cellulose kam ein Material zum Einsatz, das ursprünglich in einer umwelttechnischen Anwendung eingesetzt wurde. Dieses Trägermaterial ist aus Silikon gefertigt und demnach permeabel für Gase, was für belüftete Versuche von Interesse ist. Seine Konsistenz ist gummiartig-elastisch und morphologisch erinnert es an das Sinterglasmaterial Siran® (siehe Abb. 6), das seit Jahren Verwendung findet.

Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl eines Trägermaterials sind neben möglichen Auswirkungen auf technologische Parameter die Eigenschaften des Materials im Prozess, etwa Veränderungen der Würze durch das Material oder seine mechanische Beständigkeit. Tabelle 2 fasst die gefundenen Ergebnisse kurz zusammen.

Die Auswirkungen der Trägermaterialien auf die Würzefarbe sind zu vernachlässigen. Eine offensichtlich gegebene Adsorption von Bitterstoffen fällt beim Silikon-Carrier stärker aus als bei Siran®.

Tabelle 2 Relevante Prozesseigenschaften des Silikon-Trägers und Siran®		
	Silikon-Träger	Siran®
Relative Immobilisierungsrate (Index Siran® = 100 %)	70%	100%
Durch Abrasion entstandene Fraktion nach 1 h definierten Schüttelns (50 ml Material)	0,1 – 0,2%	4 – 5%
Verringerung der Bittereinheiten (ohne Hefe)	11 BU	8 BU
Verringerung der Farbe (ohne Hefe)	0,5 EBC	0,5 EBC

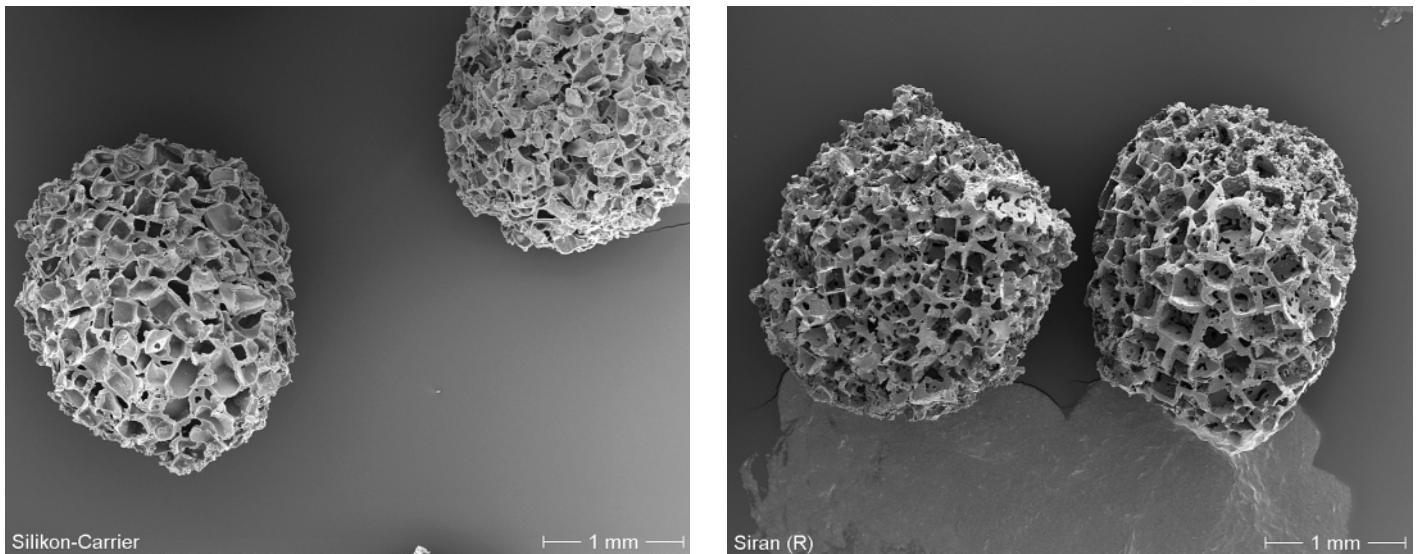


Abb. 6 REM-Aufnahmen zweier Trägermaterialien (Links: Unbenannter Silikon-Carrier, rechts: SIRAN®)

Die Immobilisierungsrate, die natürlich nur eine Momentaufnahme ist, liegt bei Siran® höher, während das Silikonmaterial hinsichtlich seiner mechanischen Beständigkeit klare Vorteile aufweist.

Es wurde dann eine Versuchsreihe konzipiert, in der das Silikonmaterial und Siran® in unbelüfteten und belüfteten Versuchen verglichen wurden. Die Tests fanden in Festbettreaktoren statt. Wenn belüftet wurde, geschah dies wieder mit einer Rate von 5 ml/min.

Beide Trägermaterialien sind im Festbettreaktor einsetzbar und es gelang, nahezu endvergorene Jungbiere akzeptabler Qualität herzustellen. Die Bierfarben lagen bei allen Versuchseinstellungen recht konstant bei ca. 6 EBC-Einheiten. In der Abbildung 7 sind die im Bier analysierten Gehalte an Bittereinheiten dargestellt. Bestätigt werden konnte auch im Hauptversuch die bereits erwähnte Tendenz der größeren Bitterstoffabsorption durch das Silikon-Trägermaterial. Sowohl im belüfteten als auch im unbe-

lüfteten Ansatz lag der BE-Gehalt bei Silikon unter dem von Siran®. Tendenziell lag der BE-Gehalt der belüfteten Versuche unter dem der unbelüfteten Ansätze. Durch Absättigung potenzieller Adsorptionsstellen steigt der BE-Gehalt bei allen Versuchen mit der Laufzeit des Reaktors an.

Auswirkungen der Trägermaterialien auf sonstige Analysenparameter des Bieres waren nicht so stark feststellbar wie dies erwartet wurde. Als Beispiele sind in der Abbildung 8 die Gehalte an höheren aliphatischen Alkoholen für die beiden Trägermaterialien mit bzw. ohne Belüftung dargestellt. Die Abbildung 9 zeigt die FAN-Gehalte.

Nach Überwinden der Anfahrphase sind die Unterschiede zwischen belüfteten und unbelüfteten Versuchen gut zu erkennen. Effekte, die auf das Trägermaterial zurückgeführt werden können, sind aus diesen Ergebnissen nicht zu entnehmen. Die Entwicklung der vicinalen Diketone (nicht gezeigt), entspricht grund-

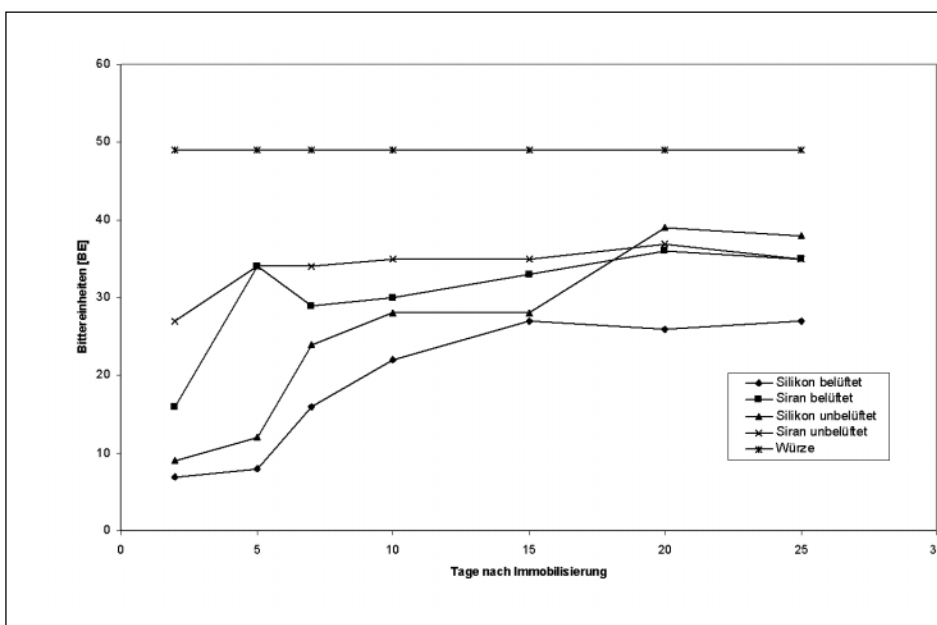
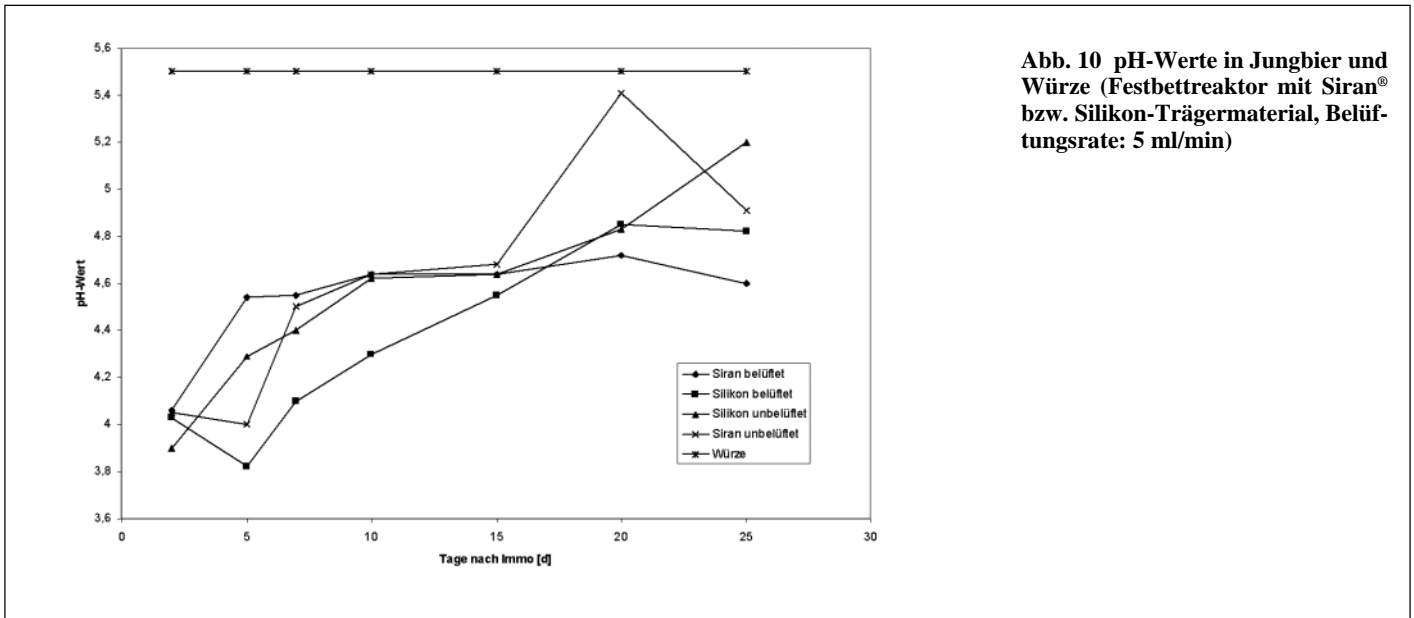
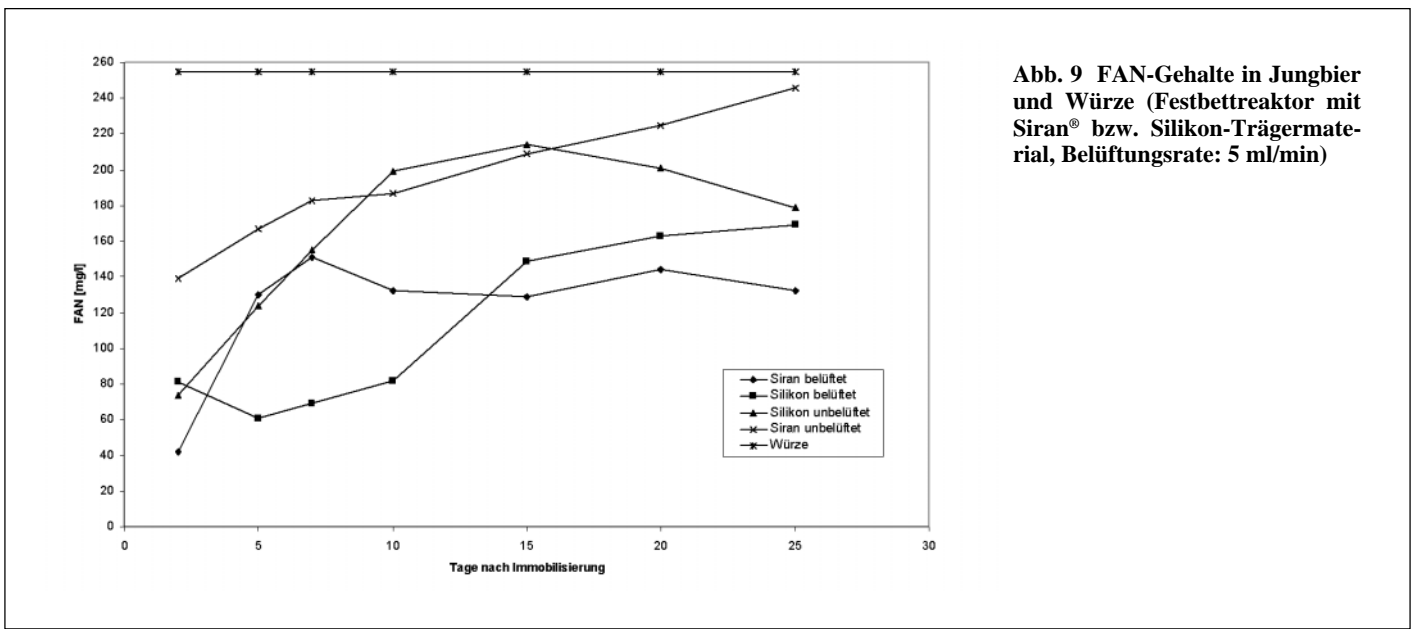
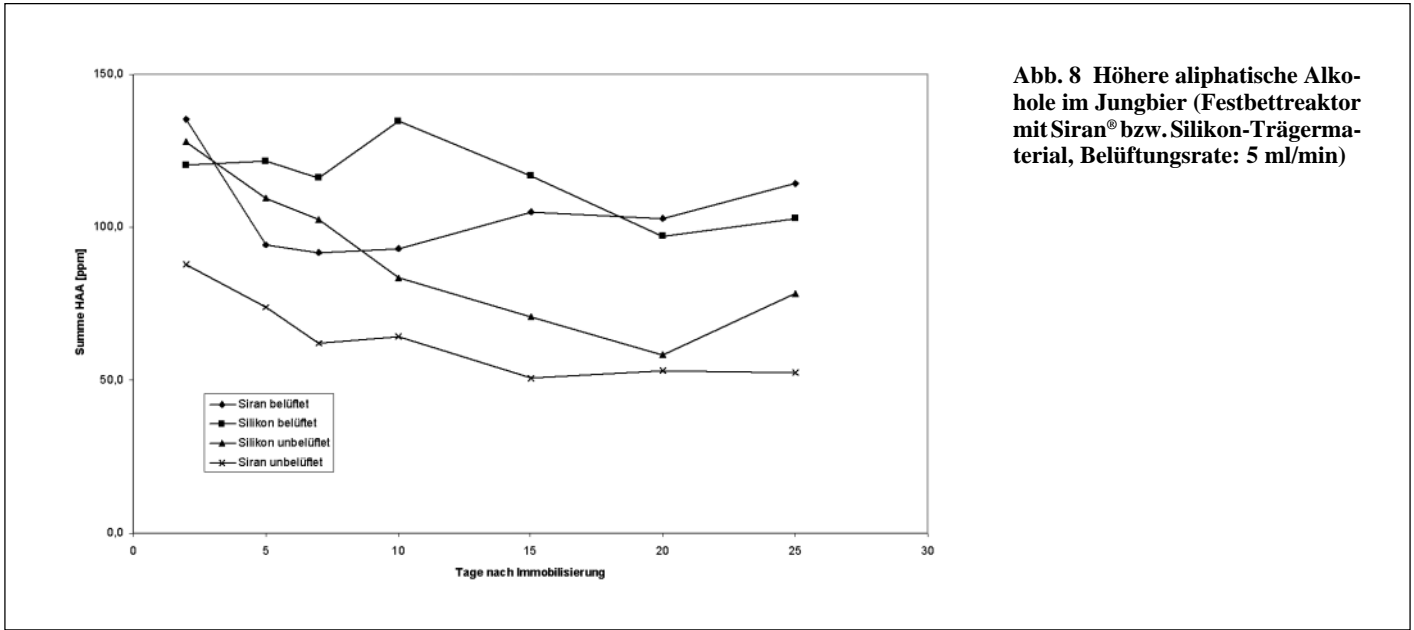


Abb. 7 Bittereinheiten in Würze und Jungbier (Festbettreaktor mit Siran® bzw. Silikon-Trägermaterial, Belüftungsrate: 5 ml/min)



sätzlich dem Verlauf, der mit dem Trägermaterial DEAE-Cellulose gefunden wurde.

Bei den in Abbildung 10 dargestellten pH-Werten stellt sich ein uneinheitliches Bild dar. Gerade während der ersten Versuchshälfte sind Effekte sowohl der Belüftung als auch des Trägermaterials kaum zu erkennen. Nach etwa 15 Versuchstagen stellt sich aber dann die erwartete Situation ein: Die pH-Werte der Biere aus den unbelüfteten Versuchen steigen an, während die der belüfteten Ansätze sich auf niedrigerem Niveau einzustellen scheinen.

Deutlich zu erkennen ist insgesamt wieder der positive Einfluss der definierten Belüftung auf die Konstanz des Produktes. Die Belüftung scheint jedoch wiederum nur eine Verzögerung der Veränderungen im Reaktor bewirkt zu haben, was die Ergebnisse der Versuche mit DEAE-Cellulose bestätigt. Mit längerer Laufzeit kam es auch in den belüfteten Ansätzen wieder zu einer tendenziellen Abnahme der Gehalte an HAA, Zunahme der FAN-Gehalte und der pH-Werte.

Verfahrenstechnisch ist für das Silikon-Trägermaterial in einer Festbettkonfiguration als nachteilig festzustellen, dass das Material sehr leicht ist. Es schwamm zu Versuchsbeginn auf und sank im Laufe der Versuche dann im Reaktor durch die sich vergrößernde Biomasse ab, was im Hinblick auf gleichmäßige Betriebsbedingungen nicht optimal ist. Der große Vorteil des Materials war jedoch seine hohe mechanische Beständigkeit. Während die Menge abgeriebenen Materials bei Siran® im Reaktor sichtbar war, war dies im Falle des Silikon-Carriers nicht festzustellen. Die Verblockungsneigung war während des Reaktorbetriebes sowohl bei Siran® als auch beim Silikon-Carrier geringer ausgeprägt als bei DEAE-Cellulose, aber immer noch gegeben.

4 Diskussion

Zunächst ist festzuhalten, dass es gelang, im Festbettreaktor durch die definierte Belüftung über einen längeren Zeitraum eine konstantere Qualität des Produktes hinsichtlich seiner Zusammensetzung zu erzielen als dies im unbelüftet geführten Vergleichsversuch der Fall war. Diese Tendenz war bei allen von uns genutzten Trägermaterialien zu verzeichnen. Insofern ist die definierte Belüftung zumindest ein Hilfsmittel, die Langzeitstabilität des Reaktorbetriebes zu verbessern. Nichtsdestoweniger stellte sich aber auch im Falle belüfteter Versuche eine Veränderung der Zusammensetzung des Bieres über die Laufzeit der Reaktoren ein. Die Bildung höherer Alkohole und Ester war von diesen Veränderungen weniger betroffen als die Aufnahme freier α -Aminosäuren und die Synthese vicinaler Diketone. Ferner erfährt der pH-Wert eine Erhöhung mit zunehmender Laufzeit. Die gefundene Symptomatik lässt auch für den Fall eines belüfteten Reaktors auf eine abnehmende Vermehrung der Hefe schließen. Zwei Problemkreise sind hierfür als Erklärungsansätze geeignet:

Ansatz 1) Die immobilisierte Hefe könnte durch ihre mehrwöchige Anwesenheit im Millieu des Reaktors (Anwesenheit von Ethanol und CO_2 , niedriger pH) eine Beeinträchtigung ihrer Vitalität und damit eine Veränderung ihrer physiologischen Eigenschaften erfahren. Dies könnte zu einer Abnahme der Vermehrungsrate führen, obwohl im Substrat alle Komponenten enthalten sind, die eine Vermehrung gestatten würden. Aussagen hierüber finden sich in der Literatur, beispielsweise von Jones und Greenfield hinsichtlich des Einflusses von CO_2 (27) oder von Panchel und Stewart bezüglich der Wirkung von Ethanol (28). Zu diesem Ansatz sind aufgrund der in unserer Arbeit dargestellten Ergebnisse keine gesicherten Aussagen möglich, da hier von der Bierqua-

lität indirekt auf die Physiologie der Hefe geschlossen werden musste und gezielte Untersuchungen, beispielsweise der Hefevitalität, in die hier dargestellten Versuche nicht integriert wurden. Hieraus ergibt sich für die Zukunft die Aufgabenstellung, neben der Bewertung der Bierqualität während des Reaktorbetriebes durch Anwendung geeigneter Analysen auch den physiologischen Zustand der Hefe selbst zu beurteilen.

Ansatz 2) Aufgrund der Bedingungen im Reaktor, insbesondere des Nährstofftransports vom Substrat zur Zelle, könnten nicht alle Komponenten vom Substrat zur Zelle gelangen, die für eine Vermehrung notwendig wären, beispielsweise Sauerstoff. Dies könnte zu einer abnehmenden Vermehrungsrate führen.

Bezüglich dieses Punktes sind die Begriffe „Limitierung interner und externer Massentransfers“ von besonderer Bedeutung, das heisst die Begrenzung des Nährstofftransportes vom Substrat zum Carrier (extern) bzw. vom Trägermaterial zur Zelle (intern). Der letztgenannte Punkt ist insbesondere vom Trägermaterial abhängig. Hierbei sind aber vor allem Einschlussimmobilisate betroffen und weniger die von uns verwendeten Trägermaterialien mit Immobilisierung an der Oberfläche (8), da hier keine Diffusion durch die Gelmatrix stattfinden muss, sondern ein direkter Stoffübergang aus dem Substrat zur Zelle. Denkbar wäre aber ein Einfluss der Anlagerung der Zellen an das Material, etwa ob es sich dabei um eine dünne Zellschicht handelt oder um große Zellkonglomerate, die ihrerseits den Nährstofftransport behindern. Aus unseren Ergebnissen ist nicht abzuleiten, dass eines der hier eingesetzten Trägermaterialien hinsichtlich der Langzeitstabilität einen besonderen Vorteil erbracht hätte, da bei allen Materialien eine ähnliche Entwicklung der Bierqualität über die Reaktorlaufzeit gefunden wurde. In dieser Arbeit wurde die Beeinflussung von Limitationen des „externen Massentransfers“ nicht betrachtet. Dieser Faktor hängt ganz entscheidend vom Reaktortyp, seiner Größe und den Betriebsbedingungen ab (8), welche in den hier dargestellten Versuchen nicht variiert wurden. Limitierend für den „externen Massentransfer“ ist die Ausprägung der laminaren Flüssigkeitsschicht an festen Körpern (Hefezellen, Trägerpartikel) in der flüssigen Phase. Insbesondere die Strömungsbedingungen (z. B. Turbulenz der Strömung) im Reaktor haben Einfluss auf die durch die laminare Grenzschicht hervorgerufenen Begrenzungen des Stofftransportes (16).

Ein makroskopisch wahrnehmbares Phänomen ist die Verblockung des Trägermaterials in den von uns eingesetzten Festbettreaktoren. Dies äußerte sich durch die Ausbildung kompakter Bereiche im Reaktorbett, die aus Trägermaterial, Hefe – vermutlich in Verbindung mit Trubpartikeln – bestanden. Diese führten sowohl zu einer Erhöhung der Druckdifferenz als auch zu einem kanalartigen Durchfluss der Würze durch das Bett. Somit waren Bereiche vorhanden, die nicht permanent von frischem Substrat umspült waren, was einen Einfluss auf die Nährstoffversorgung der Hefe gehabt haben dürfte. Durch Variation der Strömungsverhältnisse im Reaktor, beispielsweise Anlegen einer Zwangsströmung (z. B. Schleifenreaktor), ein bewegtes Trägerbett (z. B. Wirbelbettreaktor) in Verbindung mit der konstruktiven Optimierung von Reaktoren (z. B. Minimierung von Totbereichen) stehen unseres Erachtens noch eine Fülle von Möglichkeiten zur Verfügung, den Stofftransport von und zur Zelle zu verbessern und so einen positiven Einfluss auf den physiologischen Zustand der Hefe zu nehmen. Ferner scheinen Festbettreaktoren unabhängig vom eingesetzten Trägermaterial aufgrund der beschriebenen Verblockungsprobleme für eine Immo-Hauptgärung nicht die optimale Lösung zu sein.

Danksagung

Wir bedanken uns für die Förderung dieser Arbeit aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft (BMWi) unter der Projektkennziffer AiF 13338 durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF).

5 Summary

Wackerbauer, K., Ludwig, A., and Legrand, J.: Improvement of long term stability in main fermentations with immobilized yeast – I. Trials in fixed bed reactors and influence of defined aeration — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 7/8, 128 – 137, 2002

BC 23 Fermentation

Within a screening-test in a fixed bed reactor with DEAE-cellulose one aeration rate was determined that appeared to be suitable for the chosen test conditions in order to improve the long term stability of the reactor operation by this means. Changes of the aeration rate had an effect on concentration and composition of fermentation by-products within one day. In a further fixed bed trial aeration was applied with the standard aeration-rate over the entire test period and the produced beer was analyzed comprehensively. Compared with an unaerated reference trial a considerably improved constance of beer quality concerning higher aliphatic alcohols and esters was found during the reactor operation period of 47 days. Nevertheless a tendency of reduced FAN-consumption and increased pH-value was found in the aerated trial, too. Furthermore DEAE-cellulose tended to clog and in consequence trials with this material were not continued. In an additional test series the sinterglass material SIRAN® was compared with a novel carrier made of silicon, since both materials showed big similarities concerning their morphology. The immobilisation rate was smaller than that of SIRAN® and more bittering substances were adsorbed by the new material, too. A great advantage of the silicon-carrier has been its good mechanical stability. During reactor operation in aerated and unaerated applications the influence of both carrier materials on beer quality was almost neglectable. Here the aeration had an considerably stronger influence than the used material. Like in the trials with DEAE-cellulose a slight change of beer quality was determinable in case of the aerated tests. On the other hand the tendency of clogging was lower for both materials in comparison to DEAE-cellulose.

Wackerbauer, K., Ludwig, A., et Legrand, J.: Amélioration de la stabilité de longue durée de la fermentation principale avec de la levure immobilisée – I. Essais avec réacteur à lit fixe et influence de l'aération définie — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 7/8, 128 – 137, 2002

BC 23 Fermentation

Pour un essai de faisabilité on a déterminé dans un réacteur à lit fixe avec de la cellulose DEAE les conditions d'expérience pour l'aération paraissant optimales dans le but d'améliorer la stabilité de longue durée du réacteur. Des changements dans le débit d'aération en une journée conduisait à des changements de la quantité et la composition des produits de fermentation formés. Dans un autre essai dans le lit fixe on a effectué l'aération standard pendant toute la durée de l'expérience et analysé de façon détaillé la bière ainsi produite. En comparaison avec un essai de référence non aéré, on a obtenu après une durée du réacteur de 47 jours, une qualité de bière bien plus régulière concernant les alcools supérieurs aliphatiques et les esters. Il a pu être toutefois tendentieux d'observer, également pour l'essai aéré, une diminution de la consommation de l'azote aminé libre (AAL) et d'une augmentation du pH. En plus la cellulose DEAE montrait une forte tendance de blocage ce qui conduit à la non-continuation des essais avec ce matériel. Dans une autre série d'expériences on a comparé le matériel de verre sinter avec un nouveau support en silicone, ces deux matériaux ont une similitude morpholo-

gique. Le taux d'immobilisation avec ce nouveau matériau était plus faible comparé au Siran® et l'absorption de composés amers était plus élevée. Un grand avantage du support en silicone était une grande stabilité mécanique. La répercussion des deux matériaux de support sur la qualité de la bière avec l'essai aéré et non-aéré pendant le déroulement du réacteur n'avait qu'une influence secondaire. L'aération avait une plus grande influence que le matériel. On a observé dans ce cas un changement de la qualité de la bière dans la durée, de la même façon que pour les essais aérés avec la cellulose DEAE. La tendance de blocage avec les deux matériaux était moins importante qu'avec la cellulose DEAE.

6 Literatur

1. Delbrück, M.: Vortrag gehalten anlässlich des 7. Deutschen Brauertages in Hamburg am 14. Juni 1892, veröffentlicht in: Wochenschrift für Brauerei **10**, 25, 695 – 698, 1892.
2. Berdelle-Hilge, P.: Offenlegungsschrift 1 517 814 beim Deutschen Patentamt vom 2. September 1966.
3. Narziß, L., Hellich, P.: Ein Beitrag zur wesentlichen Beschleunigung der Gärung und Reifung des Bieres, Brauwelt **111**, 1491 – 1500, 1971.
4. Pajunen, E.: Immobilized yeast lager maturation: DEAE-Cellulose at Sinebrychoff, EBC-Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 24 – 33, 1995.
5. Hyttinen, I., Kronlöf, J., Hartwall, P.: Use of porous glass at Hartwall brewery in the maturation of beer with immobilized yeast, EBC-Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 55 – 61, 1995.
6. Van Dieren, B.: Yeast metabolism and the production of alcohol-free beer, EBC-Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 66 – 73, 1995.
7. Mc Murrough, I.: Scope and limitations for immobilized cell systems in the brewing industry, EBC-Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 2 – 12, 1995.
8. Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russel, I.: Fundamentals of immobilised yeast cells for continous beer fermentation: a review, J. Inst. Brew. **104**, 19 – 31, 1998.
9. Fitzner, M.: Der Einsatz immobilisierter Hefen in der Brauerei unter besonderer Berücksichtigung der Angärphase und ausgewählter Reaktortypen und Trägermaterialien, Dissertation, Technische Universität Berlin, D 83, FB 15 Nr. 124, 1998.
10. Wackerbauer, K., Fitzner, M., Günther, J.: Technisch-technologische Möglichkeiten mit immobilisierter Hefe, Brauwelt **136**, 2140 – 2150, 1996.
11. Curin, J., Pardonová, B., Poledniková, M., Sedová, H., Kahler, M.: Beer production with immobilized yeast, Proceeding 21st EBC-Congress, Madrid, 433 – 440, 1987.
12. Kronlöf, J., Härkönen, T., Hartwall, P., Home, S., Linko, M.: Main fermentation with immobilized yeast, Proceeding 22nd EBC-Congress, Zürich, 355 – 362, 1989.
13. Linko, M., Kronlöf, J.: Main fermentation with immobilized yeast, Proceeding 23rd EBC-Congress, Lissabon, 353 – 360, 1991.
14. Jakobsen, M., Thorne, R.S.W.: Oxygen requirements of brewing strains of *Saccharomyces uvarum* (*Carlsbergensis*) – bottom fermenting yeast, J. Inst. Brew. **86**, 284 – 287, 1980.
15. Kronlöf, J., Linko, M.: Production of beer using immobilized yeast encoding a-acetolactate decarboxylase, J. Inst. Brew., **98**, 479 – 491, 1992.
16. Norton, S., D'Amore, T.: Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing, Enzyme Microb. Technol. **16**, 365 – 375, 1994.
17. Linko, M., Virkajärvi, I., Pohjala, N., Lindborg, K., Kronlöf, J., Pajunen, E.: Main fermentation with immobilized yeast – a breakthrough? Proceeding 26th EBC-Congress, Maastricht, 385 – 394, 1997.
18. Virkajärvi, I., Lindborg, K., Kronlöf, J., Pajunen, E.: Effects of aeration on flavor compounds in immobilized primary fermentation, Monatsschrift für Brauwissenschaft **52**, 9 – 12, 25 – 28, 1999.
19. Kronlöf, J., Virkajärvi, I.: Primary fermentation with immobilised yeast, Proceeding 27th EBC-Congress, Cannes, 761 – 770, 1999.

20. Andersen, K., Bergin, J., Ranta, B., Viljava, T.: New process for continuous fermentation of beer, Proceeding 27th EBC-Congress, Cannes, 771 – 778, 1999.
21. Pajunen, E., Ranta, B., Andersen, K., Lommi, H., Viljava, T., Bergin, J., Guercia, H.: Novel process for beer fermentation with immobilised yeast, Proceeding 26th Congress of the IOB – Asia Pacific Section, Singapur, 2000.
22. Cashin, M.M.: Comparative studies of five porous supports for yeast immobilisation by adsorption / attachment, J. Inst. Brew., **102**, 5 – 10, 1996.
23. Pilkington, H., Margaritis, A., Mensour, N., Sobczak, J., Hancock, I., Russel, I.: Kappa-carrageenan gel immobilisation of lager brewing yeast, J. Inst. Brew. **105**, 398 – 404, 1999.
24. Andries, M., van Beveren, P.C., Goffin, O., Masschelein, C.A.: Design of a Multi-Purpose Immobilized Yeast Bioreactor System for application in the brewing process, EBC-Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 134 - 143, 1995.
25. Wackerbauer, K., Fitzner, M., Lopsien, M.: Untersuchungen mit dem neuen MPI-Bioreaktor-System, Brauwelt **136**, 2250 – 2256, 1996.
26. DFG-Forschergruppe „Biologische Prozesse mit dispersen Feststoffen“, Abschlussbericht Projekt 3: „Schadstoffabbau und Bioproduktion in einem Dreiphasen-Wirbelschicht-Bioreaktor“, 2000.
27. Jones, R.P., Greenfield, P.F.: Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation, Enzyme Microb. Technol. **4**, 210–223, 1982.
28. Panchel, C.J., Stewart, G.G.: The effect of osmotic pressure on the production and the excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain, J. Inst. Brew. **86**, 207 – 210, 1980.

(Manuskripteingang: 11. 3. 2002)

News from the Council of the European Brewery Convention

Reporting on the 109th Council Meeting (May 2002) and related issues

New Council Members

Mrs. Dr. Hilary L. Jones (Scottish Courage Brewing Ltd., United Kingdom), Dr. Frank J. Lynch (Guinness, Ireland) and Mrs. Maria Nastase (Brau Union Romania, Romania) had been nominated new Council Member. They succeed Mr. D. Jacques, Dr. A.N. Campbell-Crawford and Mr. V. Versescu, respectively.

Re-election Vice President

Mr. Leo A. van der Stappen was – by acclamation – re-elected Vice President of EBC for a second term of four years.

Report on EBC Activities, 1998 – 2001

Reference was made to the recently published report, describing EBC's management and activities in the period 1998 – 2001, copies of which can be obtained from the EBC Secretariat (secretariat@ebc-nl.com).

Cooperation with CBMC (“The Brewers of Europe”)

The pilot project “Mycotoxins”, established in the scope of the cooperation between EBC and CBMC, had resulted in a successful joint presentation to the EU Commission OTA Forum Meeting. Activities in this area continue under chairmanship of Dr. Stéphane Dupire.

Agreement has been reached to develop an “Industry Code of Practice”. In view of the EU Food Law and the requirement for traceability, it was thought to be of great value if a European Brewery Guideline could be developed to give methodology for quantifying risks in site-specific processes. A joint EBC/CBMC Working Group will be installed for this purpose.

29th Congress – Dublin, 17 – 22 May 2003

Exhibition

The Council decided to, for the first time ever, organize a table top exhibition for suppliers to the brewing industry during the 29th Congress.

Scientific Programme

The following “special interest areas” have been selected:

Beer & Health – Technology, with emphasis on environmental-friendly technology – Flavour & Taste Stability, including sensory issues – Packaging.

Anyone wishing to submit a paper or poster for consideration is invited to inform the EBC Secretariat; details can be found on EBC's website: www.ebc-nl.com. Deadlines: 1 September 2002 for submission of papers and 1 December 2002 for submission of posters.

A joint lecture programme with CBMC will be arranged on the Wednesday afternoon of the Congress; papers will a.o. treat the “anti-alcohol lobby”, “freedom to market” and “cost of production (IPPC, BAT)”, preceded by a general introduction on the objectives and organisation of CBMC, its role towards the EU and how CBMC relates to EBC.

Analysis Committee

The work of amalgamating the EBC and IGB methods continues. Overall target is to complete the entire review and action within two years.

The Microbiology Subcommittee completed its important work on the manual and Analytica-Microbiologica-EBC was released in the beginning of 2002 in a CD-ROM format.

The specialist Sensory Subgroup held its first meeting. The work of this group is to write and evaluate sensory methods; to encourage sensory awareness (through workshops, publications, etc.); to monitor sensory developments (flavour standards, data capture systems, etc.).

Symposia

Topics for future Symposia will a.o. include “Mycotoxins and other Contaminants”, “Environmental Issues”, “Sensory Evaluation & Drinkability”, “Sanitary Hygiene” and “Quality Systems”.