

ÎMBUNĂȚIREA CAPACITĂȚII DE FERMENTARE A MALTOZEI ȘI MALTOTRIOZEI LA FERMENTAREA BERII FOLOSIND CELULE DE DROJDIE IMOBILIZATE

Șef lucrări ing. Rodica Stingheriu
Universitatea "Ștefan cel Mare" Suceava

Rezumat

Drojdia *Saccharomyces cerevisiae* metabolizează spectrul de zaharuri într-o succesiune bine stabilită. Regula este cunoscută sub numele de efect prin catabolit, deoarece prezența glucozei inhibă asimilarea și metabolismul celorlalte zaharuri cum ar fi maltoza și glucoza.

Folosirea unui sistem de celule immobilizate este o tehnică ușoară de a reduce inhibarea pe care o induce prezența glucozei.

Summary

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* metabolizes the wort sugar spectrum in a certain order. The regulation is known as glucose control, i.e. the presence of glucose inhibits the uptake and metabolism of others sugars such as maltose and maltotriose.

The use of an immobilized cell system is an easy technique to reduce the glucose inhibition.

Introducere

Din totalul zaharurilor asimilabile de către drojdie din mustul de bere: fructoza, glucoza, maltoza și maltotrioza, maltoza reprezintă 50-70%. Asimilarea maltozei și a maltotriozei este inhibată de concentrații mari de glucoză. Numai când 60% din glucoza mustului a fost asimilată de drojdie, va începe și asimilarea maltozei. Când se lucrează cu musturi concentrate în carbohidrați (tehnologia high gravity), represia produsă de glucoză este chiar mai accentuată. Iată motivul pentru care demararea târzie a fermentației reprezintă o problemă în cazul fermentării musturilor concentrate. Drojdia *Saccharomyces cerevisiae* metabolizează spectrul de zaharuri într-o succesiune bine stabilită. Prezența glucozei inhibă metabolizarea celorlalte zaharuri, cum ar fi: maltoza, maltotrioza.

În ultima decadă, multe cercetări au avut ca subiect tehnologia immobilizării celulelor. Câteva sisteme au fost deja implementate la scară industrială și au fost

testate câteva prototipuri de matrici de fixare și reactoare. Tehnologia de immobilizare a celulelor a fost folosită pentru producerea berilor fără alcool sau cu conținut redus de alcool și pentru maturarea berii. Schott Engineering (Germania) și Alfa Laval (Belgia) au creat un sistem de maturare pe baza immobilizării celulelor de drojdie pe perle din sticlă poroasă. Meura Delta (Belgia) au creat un sistem continuu cu celule immobilizate care poate fi utilizat pentru fermentația primară și/sau fermentația secundară. Kirin Brewery (Japonia) au creat, la rândul lor, un sistem continuu, în două etape, din care faza finală a fermentației este realizată de celule de drojdie immobilizate.

Cele mai multe aplicații la scară industrială sunt concentrate asupra maturării berii. Sunt necesare totuși cercetări pentru a optimiza fermentația primară cu celule de drojdie immobilizate și pentru a înțelege pe deplin dinamica comportamentului celulelor immobilizate pe diferite tipuri de matrici.

Utilizarea sistemelor cu celule imobilizate este o tehnică care reduce efectul inhibării produs de glucoză. Limitările difuzionale sunt în general recunoscute ca serioase dezavantaje din moment ce acestea împiedică asimilarea substratului, iar pe de altă parte, sunt benefice deoarece, odată consumată glucoza, este favorizată asimilarea maltozei și a maltotriozei. Într-un sistem cu celule de drojdie imobilizate, asimilarea secvențială a zaharurilor fermentescibile poate fi separată în spațiu. Prin studiul asimilării maltozei într-un sistem cu celule imobilizate s-a observat utilizarea simultană a glucozei și a maltozei. Ca sistem model s-a folosit imobilizarea pe gel

de alginat pentru a studia asimilarea glucozei, maltozei și maltotriozei într-un sistem imobilizat. Dificultatea măsurătorilor *in situ* pentru studierea comportamentului celulelor imobilizate constă în necesitatea prelevării unor date asupra evoluției concentrațiilor în interiorul sistemului de celule imobilizate, care pot fi foarte diferite de cele din masa de soluție. Pentru a obține o imagine clară despre sistemele de celule imobilizate este necesară o informare detaliată *in situ*. Prin urmare s-a creat un reactor membrană gel pentru a studia consumarea zahărului de către celulele de drojdie imobilizate în membrana de alginat de calciu.

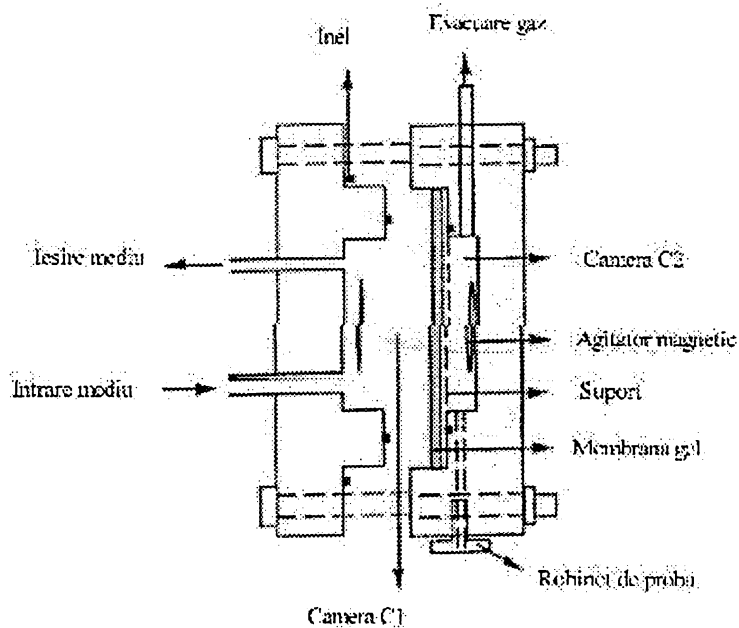


Fig. 1. Secțiune transversală prin reactorul gel - membrană

Materiale și metode

Saccharomyces cerevisiae a fost imobilizată în alginat de calciu. S-a folosit

un mediu sintetic de fermentare și s-a determinat concentrația de glucoză și

maltoză. S-a construit un reactor membrană gel care conține o membrană gel plană. S-a construit un model matematic bazat pe bilanțul masic și s-a integrat folosind metoda Runge-Kutta și s-a folosit pentru a estima parametrii cinetici intrinseci. Figura 1 ilustrează secțiunea transversală printr-un reactor membrană gel.

Modelul matematic

3.1 Modelul stabil de stare

Modelul stabil de stare a fost derivat pornind de la bilanțul masic pentru a

$$\mu_G = \frac{\mu_{max,G} C_G}{K_{m,G} + C_G}$$

$$\mu_M = \frac{\mu_{max,M} C_M}{K_{m,M} + C_M} \frac{K_G}{K_G + C_G}$$

$$\mu_{Mt} = \frac{\mu_{max,Mt} C_{Mt}}{K_{m,Mt} + C_{Mt}} \frac{K_G}{K_G + C_G} \frac{K_M}{K_M + C_M}$$

unde $\mu_{max,i}$ reprezintă rata specifică maximă de creștere pentru glucoză ($i = G$), maltoză ($i = M$) și maltotrioză ($i = Mt$);

C_G , C_M și C_{Mt} sunt concentrațiile în glucoză, maltoză și maltotrioză; K_G reprezintă constanta de

descrie evoluția concentrației de glucoză și maltoză într-o particulă imobilizată de formă sferică. S-a presupus că biomasa este distribuită omogen și că sunt neglijabile limitele de transfer de masă către exterior. Represia pe care o exercită glucoza și maltoza asupra asimilării maltozei și maltotriozei poate fi exprimată prin următoarele expresii cinetice pentru ratele specifice de creștere. (Gee și Ramirez, 1994).

inhibare a glucozei; K_M reprezintă constanta de inhibare a maltozei; $K_{m,G}$, $K_{m,M}$ și $K_{m,Mt}$ reprezintă constantele Monod pentru glucoză, maltoză și maltotrioză. Bilanțul masic pentru glucoză, maltoză și maltotrioză poate fi exprimat astfel:

$$D G_e \left(\frac{d^2 C_G}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_G}{dr} \right) - \frac{\mu_G X}{Y_{XG}} = 0$$

$$D M_e \left(\frac{d^2 C_M}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_M}{dr} \right) - \frac{\mu_M X}{Y_{XM}} = 0$$

$$D M_{te} \left(\frac{d^2 C_{Mt}}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_{Mt}}{dr} \right) - \frac{\mu_{Mt} X}{Y_{XMt}} = 0$$

unde D_{G_e} , D_{M_e} și $D_{M_{te}}$ reprezintă coeficienții de difuzie efectivă în matricea de imobilizare pentru glucoză, maltoză și maltotrioză; X este concentrația în

biomasă; Y_{XG} , Y_{XM} și Y_{XMt} reprezintă creșterile în biomasă datorate glucozei, maltozei și maltotriozei, iar r este

coordonata radială. Condițiile limită pentru geometria sferică sunt:

$$\text{în centrul perlei: } r = 0: \frac{dC_G}{dr} = 0, \frac{dC_M}{dr} = 0, \frac{dC_{Mt}}{dr} = 0,$$

$$\text{la suprafața perlei: } r = R: C_G = C_{Gb}, C_M = C_{Mb}, C_{Mt} = C_{Mtb}$$

unde C_{Gb} , C_{Mb} și C_{Mtb} sunt concentrațiile de glucoză, maltoză și maltotrioză din masă. Acest set de ecuații diferențiale ordinare împreună cu condițiile limită impuse a fost rezolvat folosind metoda Runge-Kutta de ordinul patru. Pentru că nu se cunosc concentrațiile la

centru ale glucozei, maltozei și maltotriozei s-a folosit o metodă mai rapidă.

Factorii de eficiență internă pentru glucoză (η_G), maltoză (η_M) și maltotrioză (η_{Mt}) pentru geometria sferică sunt definite astfel:

$$\eta_G = \frac{3(1+\beta_G)dC^*_M}{\varphi^2_G dr^*} \Big|_{r^*=1}$$

$$\varphi^2_G = \frac{R^2 XH_{max,G}}{DGe YXG Km,G}$$

$$\eta_M = \frac{3(1+\beta_M)(1+\alpha)dC^*_M}{\varphi^2_M dr^*} \Big|_{r^*=1}$$

$$\varphi^2_M = \frac{R^2 XH_{max,M}}{DMe YXM Km,M}$$

$$\eta_{Mt} = \frac{3(1+\beta_{Mt})(1+\alpha)(1+\delta)dC^*_{Mt}}{\varphi^2_{Mt} dr^*} \Big|_{r^*=1}$$

$$\varphi^2_{Mt} = \frac{R^2 XH_{max,Mt}}{DMte YXMt Km,Mt}$$

unde $\beta_G = \frac{C_{Gb}}{K_{m,G}}$, $\beta_M = \frac{C_{Mb}}{K_{m,M}}$

$$\beta_{Mt} = \frac{C_{Mtb}}{K_{m,Mt}}$$

$$\alpha = \frac{C_{Gb}}{K_G}$$

$$\delta = \frac{C_{Mb}}{K_M};$$

Φ_G , Φ_M și Φ_{Mt} sunt modulii Thiele pentru glucoză, maltoză și maltotrioză; $C_i^* = C_i/C_{ip}$ concentrația adimensională și $r^* = r/R$ este coordonata radială adimensională.

3.2 Modelul dinamic

S-a construit un model de tranziție care descrie creșterea drojdiei și

asimilarea glucozei și maltozei în reactorul membrană gel:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = (\mu_G + \mu_M)X$$

$$\frac{\partial C_G}{\partial t} = \frac{DGe}{d^2} \frac{\partial C_G}{\partial X^*} - \frac{\mu_G X}{YXG}$$

$$\frac{\partial C_M}{\partial t} = \frac{DMe}{d^2} \frac{\partial C_M}{\partial X^*} - \frac{\mu_M X}{YXM}$$

unde d este grosimea membranei gel și $x^* = x/d$ este coordonata de lungime adimensională. Acest set de ecuații diferențiale parțiale au fost rezolvate prin metoda colocației ortogonale și prin

metoda Runge-Kutta-Gill de ordinul patru. S-au folosit următoarele condiții inițiale unde S este aria suprafeței membranei gel și V_{C2} este volumul celei de-a doua camere a reactorului membrană gel.

$$0 \leq x^* \leq 1: C_i = 0 \quad \text{și} \quad 0 \leq x^* \leq 1: X = X_0$$

$$x^* = 0: C_i = C_{ib} \quad \text{condiții limită}$$

$$x^* = 1: -\frac{D_{ie}S}{d} \frac{\partial C_i}{\partial x^*} = V_{C2} \frac{\partial C_i}{\partial t}$$

Rezultate și discuții

Concentrațiile de glucoză și maltoză care au fost măsurate în camera C2 a reactorului membrană, în funcție de timp sunt reprezentate în figura 2. Modelul dinamic s-a folosit pentru a corela datele experimentale și pentru a determina parametrii cinetici (tabelul 1).

Tabelul 1

Valorile parametrilor cinetici

Parametrii cinetici	Valoare
$\mu_{\max G}$	$0,145h^{-1}$
$\mu_{\max M}$	$0,170h^{-1}$
Y_{XG}	$0,105 g g^{-1}$
Y_{XM}	$0,09 g g^{-1}$
K_{mG}	$0,15 g l^{-1}$
K_{mM}	$0,20 g l^{-1}$
K_G	$0,6 g l^{-1}$

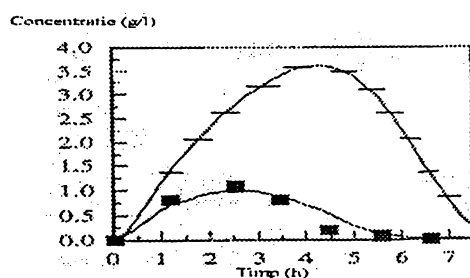
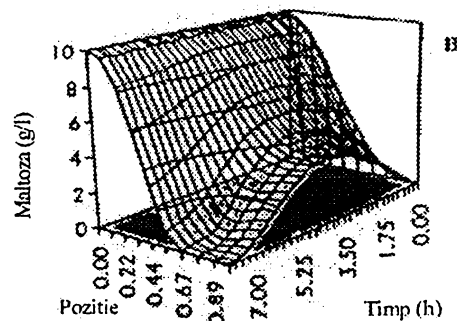
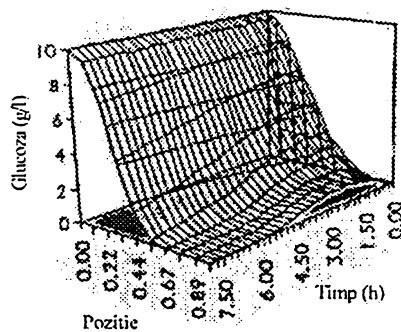


Figura 2: Date experimentale (Glucoza = ■, maltoza = —)



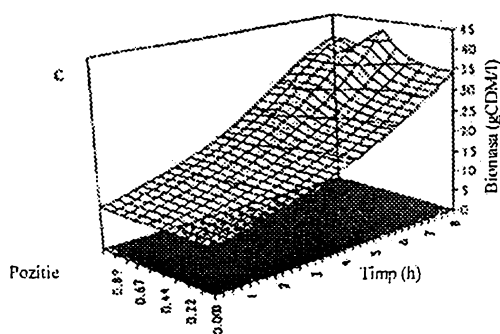


Fig.3 Cantitatea de biomasă formată

Calculul factorului de eficiență

Folosind modelul stabil de stare, s-a trasat curba factorului de eficiență ca funcție de modulul Thiele pentru glucoză și maltoză (figura 4). β_G variază de la 50 la 200 și β_M de la 100 la 400. O concentrație mare de glucoză de 15-20 g/l și de maltoză de 60-80 g/l într-un must de 16°Bllg, folosind parametrii cinetici din tabelul 1, conduc la $\beta_G=100-130$ și $\beta_M=300-400$. O estimare a modulului Thiele pentru maltoză într-un strat de 3 mm grosime și o densitate de celule de 100 g/l ne conduce la o valoare de 40. În limitele difuziei, factorul de eficiență pentru glucoză se reduce la 0,7-0,8. Factorul de eficiență pentru maltoză este mai mare decât 1: 2,5-3,5. Asta înseamnă că rata de asimilare a maltozei într-un sistem de imobilizare este de 2,5-3,5 ori mai ridicată decât aceeași rată într-un sistem în care celulele sunt libere. Dacă încărcătura de biomasă și

raza sunt mari, modulul Thiele va fi de asemenea mare rezultând factori de eficiență ridicați pentru maltoză și scăzuți pentru glucoză.

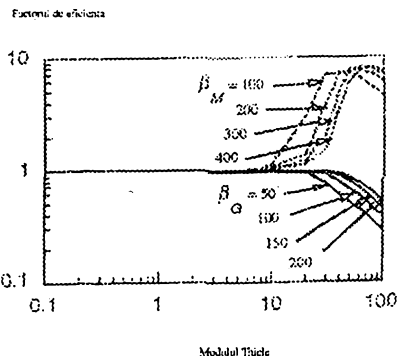


Fig.4 Curba factorului de eficiență funcție de modulul Thiele

Concluzie

Asimilarea secvențială a zaharurilor fermentescibile de către celulele de *S. cerevisiae* poate fi separată în spațiu folosind pentru imobilizare gel. Concentrația de glucoză este ridicată către zona exterioară a matricei gel și tinde către 0 spre interior. Celulele de drojdie de la exteriorul membranei vor consuma cea mai mare parte a cantității de glucoză disponibile. În această zonă asimilarea maltozei și a maltotriozei va fi inhibată de glucoză. Celulele localizate în zona apropiată de centrul suportului nu vor fi inhibate de glucoză și asimilarea maltozei și a maltotriozei poate decurge normal.

BIBLIOGRAFIE

1. Aivasidis, A., *Cerevisia*, 1996, 21 (1), pag. 27-32;
2. Van De Winkel, L., Van Beveren, P. & Masschelein, C. A., *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 1991, pag. 577-584;
3. Willaert, R.G., De Backer, L. & Baron, G.V., *Immobilized Living Cell System*, Chi Chester, John Wiley & Sons, 1996;
4. Wilbert, R., Van De Winkle L., De Vuyst L., *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 1999, 663-670.