

VÝROBA NÍZKOALKOHOLICKÉHO PIVA IMOBILIZOVANÝMI KVASINKAMI

ZOLTÁN DÖMÉNY, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, ERNEST ŠTURDÍK, JAROSLAVA PÁTKOVÁ,
Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Bratislava,
Slovenská republika

Kľúčové slová: *pivo, kvasinky, fermentor, gas-lift reaktor*

1. ÚVOD

Produkcia nízkoalkoholického piva je už dlhodobým problémom v pivovarníctve. Nároky konzumenta na senzorické vlastnosti sú totožné ako u klasických pív, ale obsah alkoholu musí byť redukovaný z legislatívnych a zdravotných dôvodov. Výroba piva s nízkou koncentráciou alkoholu vyžaduje zmeny v technologických postupoch. V praxi sa najviac aplikujú dva spôsoby výroby, a to vedenie kvasenia tak, aby v produkte zostala koncentrácia alkoholu pod požadovanou koncentráciou, a druhá možnosť je separácia alkoholu z piva vyrobeného klasickou technológiou pomocou membránových procesov. Sú však pokusy aj s výrobou nízkoalkoholického piva pomocou imobilizovaných kvasiniek a pomocou geneticky manipulovaných kvasiniek.

2. LITERÁRNY PREHLAD

Využitie imobilizovaných systémov pri produkcii piva sa po štvrt- a poloprevádzkových pokusoch dostáva už aj do výroby. Známe sú hlavne aplikácie na dokvasovanie [1]. Testované sú však aj systémy na výrobu nízko a nealkoholických pív. V prevádzkach sú nasadzované fermentory s perforovanými etážmi, kde sa ako nosič používa DEAE celulóza. Takéto zariadenia sú používané v Holandsku a v Dánsku. Na výrobu nealkoholického piva je používaný aj bioreaktor s vnútorným recyklom substrátu, kde kvasinky sú imobilizované v silikon-karbido- vom nosiči [2]. Takto vyrobené pivo má obsah alkoholu v rozmedzí 0,5-0,1 % obj., avšak vyznačuje sa miernou kvasinkovou príchuťou a sýtou arómou. Okrem uvedených dvoch nosičov na výrobu nízkoalkoholického piva boli využité aj kvasinky

imobilizované do sintrovaného makroporézneho skla [3] o priemere guľičiek 1–2 mm a porozite až 55 %. Fermentácia prebieha vo fluidnom reaktore a zdržný čas produktu je 1 hodina. Takto získané pivo hodnotili degustátnym testom a porovnávali s pivom vyrobeným klasickou „stop-fermentáciou“. Štyria z degustátorov uprednostnili porovnávacie pivo a traja jednoznačne preferovali pivo vyrobené novou technológiou. Výhody výroby nízkoalkoholického piva sú hlavne v regulácii parametrov fermentácie [4], čo determinuje senzorické a analytické vlastnosti hotového produktu. Reguláciou prietokovej a zriedovacej rýchlosti, teploty kvasenia a množstva biomasy môžeme dosiahnuť vyváženost jednotlivých parametrov hotového produktu. Polysacharidové nosiče, ako alginát a pektát vápenatý možno úspešne použiť pri výrobe klasických pív diskontinuálnym [5] i kontinuálnym

spôsobom [6]. Pri kontinuálnom kvasení mladiny v „gas-lift“ reaktore a v náplňovej kolóne boli porovnané alginátové a pektátové guľičky s imobilizovanými kvasinkami [6]. Z uvedených nosičov je uprednostňovaný pektát vápenatý z dôvodu vyššej mechanickej stability [7]. Pektát vápenatý ako imobilizačný materiál však dosiaľ nebol odskúšaný pri výrobe nízkoalkoholického piva. Cieľom tejto práce bolo testovať pektátový gél s imobilizovanými kvasinkami, ktorý už bol odskúšaný pri laboratórnych pokusoch s kontinuálnym kvasením mladiny na výrobu piva [6].

3. POPIS EXPERIMENTÁLNEHO PREVEDENIA

Mikroorganizmus: Používali sme zbierkový kmeň, *Saccharomyces cerevisiae* W-96 (kvasinky spodného kvasenia) udržiavaný na sladidlovom agare s frekvenciou preočkovávania 1 mesiac. Kvasničné bunky boli pomnožené v kvapalnom médiu obsahujúcom: glukózu ($c = 10$ g/l); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($c = 5$ g/l); kvasničný autolyzát ($c = 3$ g/l); KH_2PO_4 ($c = 2$ g/l); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1$ g/l); CaCl_2 ($c = 0,1$ g/l); NaCl ($c = 0,1$ g/l); pH bolo upravené na 5,8; podmienky sterilizácie: 120 kPa, 20 minút pri 120 °C.

Príprava nosiča: Na imobilizáciu sme používali prírodný materiál polysacharidového typu pektát draselný [6]. Pripravovali sme suspenzie pektátu draselného vyrobeného v Realizačnom oddelení Chemického ústavu SAV [8], kvasničného mlieka a vody. Z uvedených zložiek sme získali viskóznú hmotu, ktorá kvapkaním do roztoku CaCl_2 ($c = 0,1$ mol/l) poskytovala guľičky. Veľkosť guľičiek sme regulovali pomocou prietoku vzduchu cez rúrku s dýzou, cez ktorú sa pretláča viskózná hmota nosiča a kvasiniek. V roztoku chloridu vápenatého dochádza k sol-gel prechodu, výmenou K^+ iónov v pektáte iónmi Ca^{2+} . Tým sa mení rozpustný pektát draselný na nerozpustnú vápenatú soľ. Gélové guľičky sme ponechali v roztoku CaCl_2 30 minút a potom sme ich preniesli do fermentora. Vyrobili sme guľičky s koncentraciami biomasy 51,7 g sušiny na 1 l gélu. Koncentráciu viazanej biomasy sme stanovili po rozpustení pektátu vo vínane sodno-draselnom. Roztok bol filtrovaný cez odvážený bakteriologický filter, premytý a sušený do konštantnej hmotnosti.

Kultivačné média: 12 % mladina zahustená na koncentráciu extraktu 24 % pomocou vákuovej rotačnej odparky.

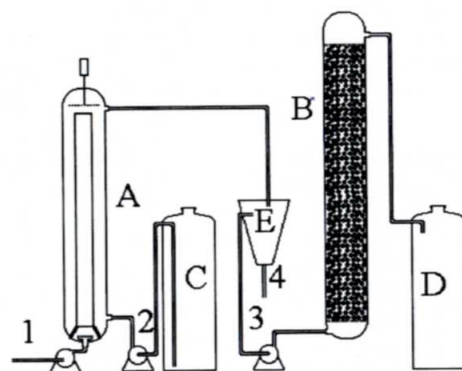
Realizácia pokusov: Fermentácie boli uskutočňované v systéme reaktorov zapojených podľa obr. 1. Hlavné kvasenie prebiehalo v „gas-lift“ reaktore (ktorý pozostáva z dvoch rúr - rúrka v rúrke - nosný plyn sa vedie zo spodu vnútornou rúrou a premiešava obsah fermentora) pomocou voľných buniek (koncentrácia v ustálenom stave 5,1 g/l). Pracovný objem fermentora bol 492 ml. Ako nosný plyn sme používali filtrovaný vzduch. Po hlavnom kvasení mladé pivo tieklo do usadzovacej nádoby a odiaľ do do-

kvasovacej kolóny. Pracovný objem dokvasovacieho fermentora je 800 ml, objem biokatalyzátora 600 ml. Koncentrácia kyslíka bola sledovaná pomocou kyslíkovej elektrody, a bola v kolóne na hlavné kvasenie 4 mg/l a na vstupe do dokvasovacej kolóny 0,8 mg/l, teplota fermentácie 15 °C.

Analytické metódy: Celkové polyfenoly podľa EBC, celkové dusíkaté látky podľa Kjeldahla, bielkovinový dusík pomocou farbiva CBB (comass brilliant blue), farba podľa EBC, horkosť podľa EBC, zdanlivý a skutočný extrakt destilačne, etanol a prchavé zložky plynovou chromatografiou (CHROM 5, náplňová kolóna 8% FFAP metóda head-space), aminokyseliny plynovou chromatografiou (CHROM 5 náplňová kolóna fáza SE 30). Všetky postupy boli realizované podľa Basařové a kol. [9].

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri práci sme používali systém, ktorý pozostáva zo sériovo zapojeného „gas-lift“ reaktora a z náplňovej kolóny. Hlavné kvasenie prebiehalo pomocou voľných buniek o koncentracii v ustálenom stave 5,1 g sušiny/l v „gas-lift“ reaktore pri zdržnom čase mladiny 12,4 h. Tento fermentor pracoval za aerobných podmienok, koncentrácia rozpusteného kyslíka bola 4 mg/l. Mladé pivo z hlavy kolóny bolo privádzané do usadzovacej nádoby, kde sa oddelilo 92 % sušiny kvasiniek kontinuálne. Po usadzovaní mladé pivo bolo prevedené do dokvasovacej kolóny s imobilizovanými kvasinkami, celkový zdržný čas mladého piva v dokvasovacej kolóne bol 96,4 h. Ako vstupnú surovinu sme používali 12% mladinu zahustenú na 24 %. Vzorky sme odoberali v 24hodinových intervaloch pred a po dokvasovaní a nariedili destilovanou vodou (1:1) na pôvodnú koncentráciu extraktu. Na riedenie sme používali destilovanú vodu, ktorá ďalej nebola upravovaná. Na porovnanie sme používali hotové alkoholické pivo s koncentraciou pôvodného extraktu 24 %, kvasené vsádzkovým spôsobom v uzavretej nádobe s kvasinkami imobilizovanými v pektáte vápenatom. Pomer hmotnosti gélu a fermentačného



Obr. 1 Schéma experimentálnej zostavy použitej na výrobu nízkoalkoholického piva: A – „gas-lift“ reaktor, B – dokvasovacia kolóna, C – zásobník mladiny, D – zásobník produktu, E – usadzovacia nádoba, 1 – kompresor, 2 – peristaltická pumpa na mladinu, 3 – peristaltická pumpa na mladé pivo, 4 – odtok separovaných kvasiniek

média bol 1:9. Koncentrácia buniek v nosiči bola totožná s koncentraciou vo fermentore na dokvasovanie. Kvasenie trvalo 13 dní pri 15 °C a hotové pivo bolo nariedené s destilovanou vodou v pomere 1:1. Na porovnanie sme analyzovali aj pivo kvasené z tej istej mladiny klasickým spôsobom v CKT. Výsledky kontinuálneho procesu v ustálenom stave sme spracovali štatisticky a aritmetický priemer všetkých meraní je v tab. 1. Systém pracoval v ustálenom stave 35 dní.

Parametre mladého a dokvaseného piva, tak ako aj porovnávacích vzoriek sú v tab. 1. Skutočný extrakt porovnávacích pív je dvojnásobkom skutočného extraktu dokvaseného nízkoalkoholického piva. Rozdiely v koncentracii skutočného extraktu vyvolávajú aj diferencie v hodnote skutočného prekvasenia. Čo sa týka produkcie etanolu, koncentrácia je v mladom pive po „gas-lift“ reaktore 0,3 % obj. Táto nízka koncentrácia je vyvolaná väčším nárastom biomasy v reaktore, čo je vyvolané prevzdušňovaním na koncentráciu kyslíka 4 mg/l. V dokvasovacej kolóne s imobilizovanými kvasinkami koncentrácia etanolu narastala na 0,8 % obj. Čo sa týka koncentrácie etanolu v porovná-

Tab. 1 Parametre piva vyrobeného: 1. dvojfázovým kontinuálnym kvasením pri 15 °C. Hlavné kvasenie v „gas-lift“ reaktore voľnými kvasinkami, dokvasovanie imobilizovanými kvasinkami v náplňovom reaktore. 2. jednorázovým vsádzkovým kvasením imobilizovanými kvasinkami pri 15 °C. 3. Kontrola – pivo z prevádzky kvasené v CKT pri max. teplote 12 °C, dokvasovanie pri min. teplote 1 °C.

Spôsob kvasenia	Kontinuálne kvasenie		Imobilizované kvasinky	Kontrola CKT
	mladé pivo	dokvasené		
Pôvodný extrakt (w/w, %)	12	12	12	12,1
Skutočný extrakt (w/w, %)	3,65	2,07	4,11	4,21
Alkohol (w/w, %)	0,3	0,8	4,34	4,08
Skutočné prekvasenie (%)	69,5	82,7	65,7	65,2
Farba (j. EBC)	17	20	19	14
pH	4,39	4,24	4,20	4,10
Horkosť BU	22	21	19	18
Celkový dusík (mg/100 ml)	69,1	67,6	97,4	82,9
Voľný dusík (mg/100 ml)	21,4	18,1	37,4	31,4
Celkové polyfenoly (mg/l)	36,7	25,4	23,1	21,4

Tab. 2 Prchavé látky piva vyrobeného: 1. dvojfázovým kontinuálnym kvasením pri 15 °C. Hlavné kvasenie v „gas-lift“ reaktore voľnými kvasinkami, dokvasovanie imobilizovanými kvasinkami v náplňovom reaktore. 2. jednorázovým vsádzkovým kvasením imobilizovanými kvasinkami pri 15 °C. 3. Kontrola – pivo z prevádzky kvasené v CKT pri max. teplote 12 °C, dokvasovanie pri min. teplote 1 °C.

Spôsob kvasenia	Kontinuálne kvasenie		Imobilizované	Kontrola
Parameter [mg/l]	mladé pivo	dokvasené	kvasinky	CKT
propanol	5,44	6,33	12,6	18,7
2-metylpropanol	33,7	38,7	38,2	39,8
2 a 3-metylpropanol	105,6	99,28	54,7	51,7
etylformiát	6,54	2,56	1,9	1,9
etylacetát	12,7	10,7	12,9	11,7
etylpropionát	2,4	2,9	3,8	3,6
3-metylbutylacetát	3,67	2,58	1,1	1,2
diacetyl	0,68	0,19	0,22	0,11

vacích vzorkách, pri vsádzkovej fermentácii imobilizovanými kvasinkami a vo vzorke z CKT boli hodnoty 4, 37 a 4,08. Za celú dobu fermentácie koncentrácia buniek v celkovom objeme fermentora narastla v prípade imobilizovaných buniek o 5,2 % a v prípade CKT o 11,7 %. Pri kontinuálnej fermentácii v „gas-lift“ reaktore nárast koncentrácie kvasiniek bol 2,23násobný za 12 hodín fermentácie. Z týchto výsledkov môžeme usúdiť, že sacharidy pri hlavnom kontinuálnom kvasení sú zúžitkované na tvorbu biomasy. Túto predstavu potvrdzuje aj nižšia koncentrácia voľných a celkových dusíkatých látok v mladom pive. Pokles koncentrácie dusíkatých látok je už pri kontinuálnom dokvasovaní pomocou imobilizovaných kvasiniek malý. Najvyššia koncentrácia dusíkatých látok je v porovnaní piva kvaseného pomocou imobilizovaných kvasiniek vsádzkovým spôsobom.

Okrem hlavných parametrov jednotlivých vzoriek sme stanovili aj profil niektorých prchavých látok (tab. 2). Koncentrácia propanolu v nízkoalkoholickom pive bola iba tretinou koncentrácie v porovnávacej vzorke kvasenej v CKT. Táto koncentrácia bola však rádovo väčšia, ako napr. v pive

„Haake Beck“ [3]. Koncentrácia 2-metylpropanolu bola totožná v každej vzorke, a 2- a 3-metylbutanolu v nízkoalkoholickom pive bola dvojnásobkom koncentrácie v porovnávacích vzorkách. U esterov koncentrácia etylformiátu bola najväčšia v mladom nízkoalkoholickom pive, pri dokvasovaní klesala na polovicu, ale aj táto hodnota bola väčšia ako koncentrácia v porovnávacích vzorkách. Podobne môžeme charakterizovať aj rozdiely v obsahu 3-metylbutylacetátu. Z vicinálnych diketónov sme stanovili koncentráciu diacetyl. Po hlavnom kvasení mladé pivo obsahovalo 0,68 mg/l, ale v prípade dokvasovania bol obsah diacetyl redukován na 0,19 mg/l, pričom táto koncentrácia je medzi hodnotami stanovenými v porovnávacích pivách.

Analýzovali sme aj koncentráciu aminokyselín v mladine, ktorú sme používali na fermentáciu v jednotlivých vzorkách a obsah sme vyjadrovali v percentách využitia (tab. 3).

V nealkoholickom pive je využívaný všetok arginín, serín a treonín, na rozdiel od porovnávacích vzoriek, kde je využívaný iba arginín na 100 %. Podobný stupeň utili-

Tab. 3 Percentá využitia aminokyselín piva vyrobeného: 1. dvojfázovým kontinuálnym kvasením pri 15 °C. Hlavné kvasenie v „gas-lift“ reaktore voľnými kvasinkami, dokvasovanie imobilizovanými kvasinkami v náplňovom reaktore. 2. jednorázovým vsádzkovým kvasením imobilizovanými kvasinkami pri 15 °C. 3. Kontrola – pivo z prevádzky kvasené v CKT pri max. teplote 12 °C, dokvasovanie pri min. teplote 1 °C.

Spôsob kvasenia	Kontinuálne kvasenie		Imobilizované	Kontrola
Parameter [%]	mladé pivo	dokvasené	kvasinky	CKT
serín	93	100	95	96
treonín	100	100	97	98
asparagín	89	97	97	95
arginín	100	100	100	100
izoleucín	94	97	96	97
leucín	93	99	94	93
lyzín	90	95	98	98
metionín	84	99	79	85
valín	54	64	81	86
glycín	95	99	84	89
alanín	64	75	63	71
fenylalanín	63	69	66	68
tyrozín	81	94	72	75
tryptofán	68	85	74	74
histidín	67	79	65	69

zácie ako u porovnávacích vzoriek nameral van de Winkel a kol.[10] pri hodnotení parametrov piv vyrobených kontinuálnou fermentáciou vo fermentore s vnútorným recyklovaním substrátu.

5. ZÁVER

V práci bol odskúšaný systém pozostávajúci zo sériovo zapojeného „gas-lift“ reaktora a z náplňovej kolóny na výrobu nízkoalkoholického piva. Zdržným časom 106 hodín v systéme reaktorov pri 15 °C sa podarilo vyrobiť nízkoalkoholické pivo s obsahom etanolu 0,8 obj.%. Koncentrácia senzoricke aktívnych látok bola podobná ako pri porovnávacích vzorkách. Obsah celkových a voľných dusíkatých látok bol nižší. Senzoriku vyrobeného piva charakterizovala hlavne silná ovocná vôňa, čo môže byť vyvolané vyššou koncentráciou etylformiátu a 3-metylbutylacetátu. Mladé pivo po hlavnom kvasení obsahovalo 5,1 g sušiny kvasiniek na 1 l, z čoho 92 % biomasy bolo separovaných pred vstupom do dokvasovacej kolóny. Tieto kvasinky v prípade pivovarskej prevádzky môžu čiastočne nahradiť kvasinky z propagačnej stanice. Pripravené pivo boli senzoricke hodnotené desiatimi bežnými konzumentami. Sedem z nich považovalo pripravené nízkoalkoholické pivo za porovnateľné s kontrolnými vzorkami a trom vadila ovocná vôňa a chuťový rozdiel vyvolaný nižšou koncentráciou etanolu.

Podakovanie

Práca bola vypracovaná s podporou Slovenskej grantovej agentúry pre vedu č. 95/5 195/199 a 2 4149 97.

LITERATÚRA

- [1] WACKELBAUER, R.K., FITZNER, M., GIENHNER, J.: Brauwelt 136, 1996 (45), s. 2140
- [2] VAN DE WINKEL, L., VAN BEVEREN, P.C., MASSCHELEIN, C.A.: Proc. Eur. Brew. Chem. Conv., 1991, s. 574
- [3] AIVASIDIS, A., ET AL.: Proc. Eur. Brew. Chem. Conv., 1991, s. 569
- [4] STEVEN, A.H., POWER, J., RYDER, D.S.: Brew. Digest, 1991 (1), s. 44
- [5] POLEDNÍKOVÁ, M., et al.: Kvasny Prum., 39, 1993, s. 2
- [6] ŠMOGROVIČOVÁ, D., et al.: Biotech. Tech., 4, 1997, s. 261
- [7] GEMEINER, P., et al.: Biotechnol. Appl. Biochem. 13, 1991, s. 335
- [8] An.: List of products. Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, 1995, s. 18
- [9] BASAŘOVÁ, G. et al.: Pivovarsko – sladařská analytika (Merkanta) Praha, 1992
- [10] VAN DE WINKEL L., et al.: Proc. Eur. Brew., Chem. Conv., 1993, s. 307

Lektoroval: Ing. Miloš Hrabák
Do redakcie došlo 25. 6. 1998