

PRIMENA POSTUPKA ELEKTROSTATIČKE EKSTRUZIJE PRI DOBIJANJU ALGINATNIH ČESTICA MALIH DIMENZIJA SA IMOBILISANIM ČELIJAMA PIVSKOG KVASCA

Viktor A. Nedović, Ida Leskošek-Čukalović, Olivera Trifunović,
Radojica Pešić, Branko Bugarski

Pri primeni imobilisanih ćelija kvasca u fermentaciji piva važno je, kako sa aspekta produktivnosti sistema, tako i sa aspekta hemijskog sastava piva, da se otpori prenosu mase supstrata i proizvoda metabolizma ćelija unutar matrice nosača svedu na najmanju moguću meru. Ovo se može postići podešavanjem veličine, teksture i poroznosti matrice nosača. Obzirom da klasična tehnika imobilizacije kvasca u matrici Ca-alginata daje čestice većih dimenzija (prečnika od 2 do 3 mm), danas je razvijeno više različitih tehnika koje pružaju mogućnost dobijanja čestica malih dimenzija. Jedna od novih tehnika, čije su mogućnosti primene u cilju optimizacije veličine alginatnih čestica ispitivane u sklopu ovog istraživanja, je postupak elektrostatičke ekstruzije. Dobijeni rezultati su pokazali da je primenom ove tehnike moguće dobiti kontrolisanu i stabilnu proizvodnju mikročestica uniformne veličine, čiji se prečnik kretao u rasponu od nekoliko stotina mikrometara do 2 mm, u zavisnosti od primenjene razlike potencijala, prečnika igle i rastojanja između elektroda.

KLJUČNE REČI: *imobilizacija, pivski kvasac, elektrostatička ekstruzija, mikročestice, alginat*

UVOD

Tokom poslednjih dvadeset godina intezivno se istražuje mogućnost primene imobilisanih ćelija kvasca u pivarstvu. Iako postoji više različitih pristupa mogućoj primeni imobilisanih ćelija kvasca za izvođenje glavnog vrenja, ni jedan od njih nije još uvek razvijen do industrijskog nivoa. Sa druge strane, postoji nekoliko industrijskih postrojenja koja koriste ove sisteme za naknadno vrenje i odležavanje piva, kao i za proizvodnju bezalkoholnog piva (finska pivara „Synebrychoff”, holandska pivara „Bavaria” i dr.)(5,9,10).

U prvobitnim istraživanjima vezanim za kompletnu fermentaciju pивske sladovine imobilisanim ćelijama kvasca, dobijano je pivo koje je imalo izmenjen hemijski sastav i senzorne

Mr Viktor A. Nedović, asistent, Dr Ida Leskošek-Čukalović, profesor, Dipl. in. Olivera Trifunović, stručni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju, Nemanjina 6, 11081 Beograd, Jugoslavija; Mr Radojica Pešić, asistent, Dr Branko Bugarski, docent, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Katedra za hemijsko inženjerstvo, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Jugoslavija.

karakteristike. Razlozi za ovu pojavu leže u nedovoljnoj asimilaciji aminokiselinskog azota od strane imobilisanih ćelija, što dovodi do poremećaja u metabolizmu ćelije kvasca (4,5,9). Za kvalitet i senzorna svojstva piva metabolizam aminokiselina je izuzetno važan jer je usko povezan sa formiranjem lako isparljivih komponenti arome kao što su vicinalni diketoni, viši alkoholi, organske kiseline i sumporna jedinjenja (5). Za nedovoljnu asimilaciju slobodnog amino azota pre svega su odgovorni povećani otpori prenosu mase supstrata ka matrici nosača i unutar nje, kao i proizvoda metabolizma ćelija iz matrice ka spoljnoj sredini. U cilju rešavanja ovog problema vršena su ispitivanja uticaja tipa i konfiguracije bioreaktora, odnosno hidrodinamičkih uslova u njemu, na tok fermentacije, metabolizam ćelija i karakteristike finalnog proizvoda. Faktor koji bitno utiče na izbor tipa bioreaktora za izvođenje fermentacije imobilisanim ćelijama kvasca je metod imobilizacije, odnosno vrsta korišćenog nosača. Za primenu u pivarskoj industriji od praktičnog značaja su dva tipa nosača: čvrsti nosači i hidrogelovi. Od čvrstih nosača najviše su korišćeni dijatomejska zemlja, DEAE celuloza, keramika i sinterovano staklo, a od hidrogelova alginat, kapa-karagen, hitozan i pektin (9).

Kod reaktora stacionarnog tipa, kod kojih se supstrat kreće naviše ili naniže kroz pakovani sloj čestica sa imobilisanim ćelijama pogodni su čvrsti nosači zbog svojih dobrih mehaničkih karakteristika, koje ovde dolaze do izražaja. Međutim, kod ovog tipa reaktora česta je pojava kanalisnog strujanja, usled čega dolazi do neravnomerne raspodele supstrata unutar pakovanog sloja čestica i do limitiranog prenosa mase nutrijenata ka ćelijama na površini i unutar čestica. U reaktorima sa fluidizovanim slojem obezbeđeno je mešanje čestica i supstrata, a samim tim i poboljšan prenos mase. Međutim, ukoliko je razlika u gustini čestica i tečne sredine mala, brzina prenosa mase je takođe mala, dok se sa povećanjem gustine čestica povećavaju i energetski trošci potrebni za održavanje sloja u stanju fluidizacije. Većina ovih problema prevaziđena je primenom trofaznog gas-lift bioreaktorskog sistema, koji je prvi put u istraživanju u oblasti fermentacije piva imobilisanim ćelijama kvasca uveden od strane naše istraživačke grupe (6). Gas-lift reaktori sa unutrašnjom cirkulacijom imaju dobre karakteristike mešanja i omogućavaju odličan prenos toplote i mase pri malim smicajnim naponima u strujnom polju fluida. Osnovne karakteristike ove grupe bioreaktora su jednostavna konstrukcija, smanjen rizik od kontaminacije, lako podešavanje i kontrola operativnih parametara, dobro definisan tok faza i jednostavno povećanje razmera na veće kapacitete, usled čega dobijaju sve veći značaj i primenu u biotehnologiji i procesnoj hemijskoj industriji. Mešanje se ostvaruje uvođenjem komprimovanog gasa preko raspodeljivača u reaktor koji dovodi do cirkulacije tečne faze unutar sistema. Ovo predstavlja izuzetnu pogodnost za primenu gas-lift reaktora u trofaznim fluidizacionim sistemima u kojima čvrstu fazu čine čestice malih gustina (bliskih gustini vode) koje su osetljive na mehanička naprezanja (7,8).

Jedan od načina da se poveća asimilacija slobodnog amino azota, i samim tim dobije pivo sa izbalansiranim senzornim svojstvima, jeste smanjenje otpora prenosu mase unutar nosača. Ovo se može postići podešavanjem veličine, teksture i poroznosti matrice nosača. S obzirom da klasična metoda imobilizacije kvasca unutar matrice alginatnog nosača (metoda ukapavanja) daje čestice prečnika većih od 1 mm (obično 2 do 3 mm), ona ne pruža zadovoljavajuća rešenja za probleme u prenosu mase koji se javljaju kod čestica većih dimenzija (1,3,12). Danas je razvijeno više različitih ekstruzionih metoda koje omogućavaju dobijanje čestica malih dimenzija, kao što su ukapavanje uz primenu sekundarnog toka vazduha, vibraciona metoda, metoda raspršavanja pomoću rotirajućeg ravnog diska, metoda presecanja mlaza, i elektrostatička ekstruzija (9,11).

U ovom radu je ispitivana mogućnost dobijanja čestica malih dimenzija sa imobilisanim ćelijama kvasca postupkom elektrostatičke ekstruzije, kao i parametri koji bitno utiču na oblik i veličinu čestica.

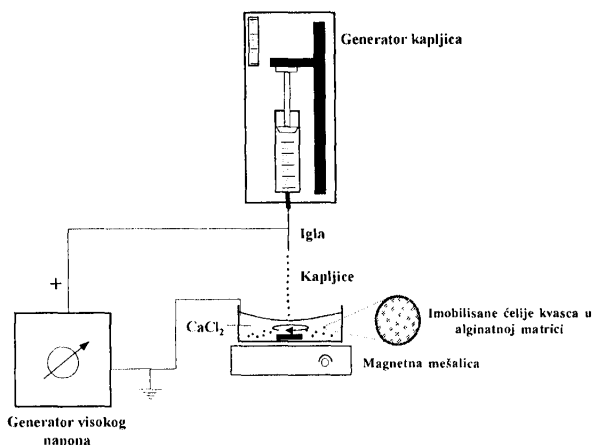
EKSPERIMENTALNI DEO

Priprema suspenzije alginata i kvasca

Rastvaranjem 10 g natrijum alginata u 500 ml destilovane vode pripremljen je 2 % (m/v) rastvor. Suspenzija alginata i kvasca je pripremljena mešanjem 2% Na-alginata sa gustim suspenzijom ćelija kvasca (*Saccharomyces uvarum*) u odgovarajućem odnosu.

Imobilizacija ćelija kvasca elektrostatičkom ekstruzijom

Suspenzija kvasca i alginata je pomoću pumpe (Razel, Scientific Instruments, Stamford, CT) istiskivana iz plastičnog šprica zapremine 5 ml kroz tanku iglu konstantnom brzinom od 25,2 ml/h. Elektrostatičko polje stvoreno je povezivanjem pozitivne elektrode generatora visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York) sa iglom, i elektrode za uzemljenje sa rastvorom CaCl_2 (Slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za dobijanje alginatnih mikročestica

Tokom istraživanja varirana je jačina elektrostatičkog polja, rastojanje između elektroda i prečnik igle. Jačina elektrostatičkog polja je podešavana menjanjem napona u opsegu od 0 do 8 kV tokom svakog od eksperimenata pri konstantnom rastojanju između elektroda (rastojanje između površine rastvora CaCl_2 i vrha igle) i unutrašnjeg prečnika igle. Kada suspenzija kvasca i alginata potiskivana pumpom dođe do vrha igle, ona se pod dejstvom gravitacionih i elektrostatičkih sila otkida u vidu mlaza sitnih naelektrisanih kapljica koje padaju u 2% rastvor CaCl_2 , gde želiraju uz malu kontrakciju zapremine (dolazi do razmene Na^+ i Ca^{2+} jona usled čega alginat prelazi iz tečne u gel fazu). Proces želatinizacije je nastavljen sledećih pola sata u uslovima mešanja, posle čega se čestice ostavljane da odstoje 60 min na 4 °C u rastvoru CaCl_2 kako bi se proces završio.

Rastojanje između elektroda je podešavano na 2,0, 2,5, 4,0, 6,0 ili 8,0 cm. U eksperimentima su korišćene tri različite igle, prečnika 1,0, 0,7 i 0,4 mm.

Određivanje prečnika čestica

Uzorak od 30 čestica je uziman nakon svakog od eksperimenata i prečnik čestica je meren pomoću svetlosnog mikroskopa sa skalom. Rezultati su iskazani kao prosečni prečnik čestica u uzorku sa standardnim odstupanjem.

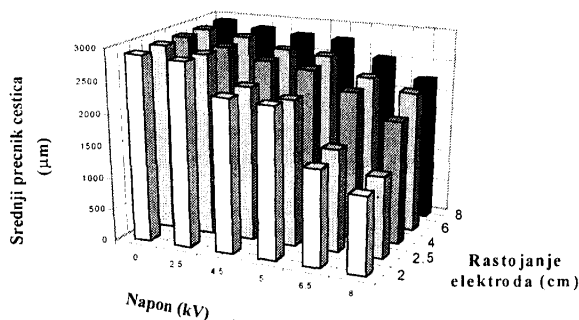
Viabilnost ćelija

Viabilnost ćelija kvasca nakon elektrostatičke ekstruzije je ispitivana standardnom metodom bojenja metilenskim plavim.

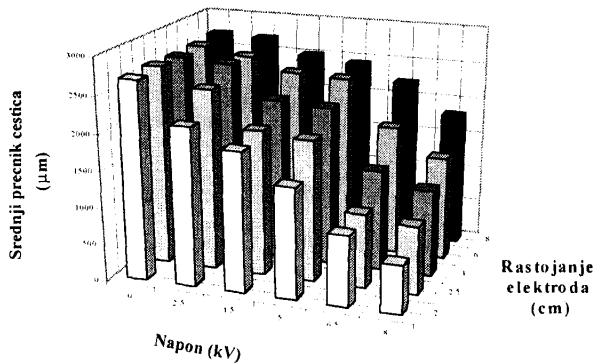
REZULTATI I DISKUSIJA

Izvedeno je više serija eksperimenata kako bi se ispitaio uticaj razmaka između elektroda, primenjenog napona i unutrašnjeg prečnika igle na uniformnost oblika i veličinu dobijenih čestica.

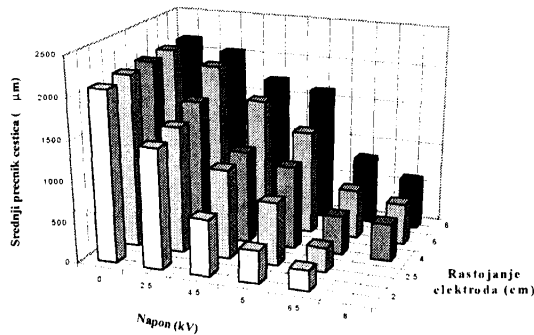
Na slikama 2, 3 i 4 prikazan je uticaj primenjenog napona i razmaka između elektroda na prečnik dobijenih čestica pri konstantnom unutrašnjem prečniku igle. Uočava se da u odsustvu elektrostatičkog polja (napon od 0 kV) povećanje razmaka između elektroda nema vidni uticaj na prečnik čestica, koji u ovim uslovima zavisi u najvećoj meri od veličine igle. U prisustvu elektrostatičkog polja sa povećanjem napona i smanjenjem rastojanja između elektroda smanjuje se i prečnik dobijenih čestica. U slučaju igle prečnika 1 mm (Slika 2) uticaj smanjenja razmaka između elektroda ispoljavao se pri naponu iznad 2,5 kV, uz izrazito smanjenje prečnika čestica pri naponima iznad 5 kV. Pri navedenim uslovima maksimalna redukcija prečnika postignuta je na 8 kV, gde se pri smanjenju razmaka između elektroda sa 8 na 2 cm, prečnik dobijenih čestica smanjuje sa 2250 na 1200 μm .



Slika 2. Uticaj primenjenog napona i rastojanja između elektroda na dimenzije čestica - igla unutrašnjeg prečnika 1,0 mm



Slika 3. Uticaj primenjenog napona i rastojanja između elektroda na dimenzije čestica - igla unutrašnjeg prečnika 0,7 mm



Slika 4. Uticaj primenjenog napona i rastojanja između elektroda na dimenzije čestica - igla unutrašnjeg prečnika 0,4 mm

Pri korišćenju iglala prečnika 0,7 i 0,4 mm, uticaj napona je evidentan odmah po uspostavljanju elektrostatičkog polja. Najveći padovi prečnika dobijenih čestica za iglu veličine 0,7 mm (slika 3) zapaženi su pri naponoma iznad 4,5 kV, dok je pri naponu od 8 kV sa smanjenjem rastojanja između elektroda sa 8 na 2 cm smanjen prečnik čestica sa 1830 na 650 μm . Ovo je u suprotnosti sa rezultatima Bugarskog i sar. (2), koji su pokazali da pri korišćenju slične eksperimentalne aparature sa pozitivnim električnim nabojem na igli, smanjenje rastojanja između elektroda nema skoro nikakav uticaj na promenu dimenzija dobijenih čestica. U slučaju igle prečnika 0,4 mm (Slika 4), pri primeni napona od 6,5 kV i na rastojanju između elektroda od 2 cm dobijene su uniformne mikročestice najmanjih dimenzija (oko 250 μm). Ovaj napon (6.5 kV) je za datu iglu predstavljao početak oblasti kritičnog napona, što se manifestovalo prirodnim harmonijskim oscilacijama igle pri daljem povećanju napona. Prema zapažanjima Bugarskog i sar. (1) ova pojava dovodi do formiranja čestica izuzetno malih dimenzija ali neujednačene veličine, tj. javlja se bimodalna distribucija veličina čestica. Primena elektrostatičkog polja u ispitivanim opsezima nije imala uticaj na viabilnost ćelija kvasca, odnosno viabilnost ćelija je ostala nepromenjena nakon prolaska ćelija kroz polje određene jačine.

ZAKLJUČAK

Imobilizacija ćelija kvasca u matrici alginatnog nosača metodom elektrostatičke ekstruzije se pokazala veoma dobrom za kontrolisanu proizvodnju mikročestica, pri čemu nije dolazilo do promene viabilnosti imobilisanih ćelija kvasca. Faktori koji utiču na veličinu čestica su razmak između elektroda, primenjeni napon i unutrašnji prečnik igle. Najmanje čestice, veličine 250 μm , dobijene su korišćenjem igle prečnika 0,4 μm pri rastojanju elektroda od 2 cm i naponu od 6,5 kV. Korišćenjem igle prečnika 0,7 mm dobijene su čestice veličine 650 μm pri rastojanju između elektroda od 2 cm i naponu od 8 kV. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da se imobilizacijom ćelija kvasca metodom elektrostatičke ekstruzije mogu proizvesti izuzetno male čestice uniformnog oblika i time u velikoj meri prevazići problemi limitiranog prenosa mase kroz matricu nosača, koji su zapaženi kod primene čestica većih dimenzija (preko 1 mm u prečniku) u fermentaciji piva.

LITERATURA

1. Bugarski, B., Smith, J., Wu, J., and M.F.A. Goosen: Methods for Animal Cell Immobilization Using Electrostatic Droplet Generation. *Biotechnol. Tech.* **7**, 9 (1993), 677-682.
2. Bugarski, B., Li, Q., Goosen, M.F.A., Poncelet, D., Neufeld, R.J., and G. Vunjak: Electrostatic Droplet Generation: Mechanism of Polymer Droplet Formation. *AIChE Journal* **40**, 6 (1994), 1026-1031.
3. Goosen M.F.A., Al-Ghafri A.S., El Mardi O., Al-Blushi M.I.J., Al-Hajri H.A., Mahmud E.S.E., and E. C. Consolaacion: Electrostatic Droplet Generation for Encapsulation of Somatic Tissue: Assessment of High-Voltage Power Supply. *Biotechnol. Prog.* **13**, 4 (1997), 497-502.
4. Hayes, S.A., Power, J., and D.S. Ryder: Physiology of Immobilized Cells and the Application to Brewing. *Brewers Digest* **66**, 11 (1991), 28-35.
5. Masschelein, C.A., Ryder D.S., and J.-P. Simon: Immobilized Cell Technology in Beer Production. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, 2 (1994), 155-177.
6. Nedović, V., Obradović, B., Vunjak G. i I. Leskošek-Čukalović: Ispitivanje kinetike fermentacije pivske sladovine imobilisanim ćelijama kvasca. *Hem. ind.* **47** (1993), 168-172.
7. Nedović, V.A., Leskošek-Čukalović, I., and G. Vunjak-Novaković: Short-Time Fermentation of Beer in an Immobilized Yeast Air-Lift Reactor. in *Proc. of the 24th Conv. Inst. Brew. Ed. J. Harvey, Winetitles, Adelaide* (1996), pp. 245-247.
8. Nedović, V.A., Leskošek-Čukalović, I., Milošević, V., and G. Vunjak-Novaković: Flavour Formation During Beer Fermentation with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a Gas-Lift Bioreactor. in *Proc. Int. Symp. BIOENCAPSULATION VI: "From fundamentals to industrial applications"*. Eds. D. Poncelet and F. Godia, Barcelona (1997), T-5.3 pp. 1-4.
9. Nedović V.: Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva, Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd (1999).
10. Pikington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., and I. Russell: Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. *J. Inst. Brew.* **104** (1998), 19-31.
11. Poncelet, D., Neufeld, R.J., Goosen, M.F.A., Bugarski, B., and V. Babak: Formation of Microgel Beads Containing Biocatalyst by Electric Dispersion of Polymer Solutions. in *Proc. Int. Symp. BIOENCAPSULATION VI: "From fundamentals to industrial applications"*. Eds. D. Poncelet and F. Godia, Barcelona (1997), P-42 pp. 1-4.

12. Poncelet, D., Babak, V.G., Neufeld, R.J., Goosen, M.F.A., and B. Bugarski: Theory of Electrostatic Dispersion of Polymer Solutions in the Production of Microgel Beads Containing Biocatalyst. *Adv. Colloid Interface Sci.* **79** (1999), 213-228.

IMMOBILIZATION OF YEAST CELLS IN SMALL ALGINATE BEADS USING ELECTROSTATIC DROPLET GENERATION

*Viktor A. Nedović, Ida Leskošek-Čukalović, Olivera Trifunović,
Radojica Pešić, Branko Bugarski*

In beer brewing with immobilized yeast cells it is very important to minimize the mass transfer resistance, problem associated with large diameter beads, because the mass transfer limitations may force the cells to alter their metabolic states and thus, impact the efficiency of fermentation process and quality of final beer. Internal mass transfer can be optimized by adjusting the immobilization matrix size, texture and porosity. The classical dripping method, that is commonly used to produce gel beads, has a limitation in the large diameter of the produced beads, which is typically 2 to 3 mm. In recent time other techniques have been developed to produce smaller particles of equal size. The major objective of this study was to optimize the bead size by using the new technique, electrostatic droplet generation. We have obtained promising results since in this way it was possible to produce very small uniform microbeads (in the diameter range of several hundreds of micrometers to 2 mm) under stable conditions. The size of beads was strongly influenced by applied potential, needle size and electrode distance.

Prispeo 28. decembra 1999.
Prihvaćen 18. jula 2000.