

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität

Prozess und Anlagenentwicklung zur kontinuierlichen Bierfermentation

Konrad Felix Christian Müller-Auffermann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst-Christian Langowski

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. agr. Ludwig Narziß
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Thomas Becker
3. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Hans Michael Eßlinger

Die Dissertation wurde am 12.08.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.04.2017 angenommen.

Kurzfassung

Basierend auf den Erkenntnissen vorangegangener Arbeiten wurde in dieser Abhandlung ein alternatives Verfahren und eine Vorrichtung entwickelt, um dauerhaft qualitativ hochwertige Biere ökonomisch mithilfe von kontinuierlichen Fermentationsverfahren herzustellen.

Dabei sieht das Konzept die Verwendung von klassischen Tanks vor, die durch die Installation von Leitrohren derart modifiziert werden, dass im Inneren zwei separate, jedoch miteinander in Verbindung stehende Reaktionsräume entstehen. Partikel und Organismen können so herkömmlich sedimentieren und bei Bedarf gezielt entnommen und wiederverwendet werden.

Um die angestrebten Prozesse adäquat beurteilen und mit Batchverfahren in industriellen Maßstäben vergleichen zu können, erfolgten Basisexperimente, in denen die Reaktionskinetik von Hefen systematisch evaluiert wurde. Ferner wurden spezifische Analysemethoden zur Detektion von Strömungseigenschaften und der vereinfachten Untersuchung der physiologischen Eigenschaften von Mikroorganismen entwickelt. Zum Zwecke der verfahrenstechnischen Optimierung erfolgten Untersuchungen zur Substratbehandlung mit Bakteriziden und der Verwendung von Antischaummitteln.

Anhand dieser Erkenntnisse wurde anschließend eine kontinuierlich betreibbare Pilotanlage mit 50 Liter Tagesdurchsatz konstruiert, in der insgesamt 4 Langzeitversuche erfolgten.

Schlussendlich gelang es durch eine entsprechende Betriebsweise, Produkte in angestrebter Qualität herzustellen.

In einer Forschungs Kooperation wird nun evaluiert, welche Prozesse und Ideen sich auf einen industriellen Maßstab übertragen lassen.

Schlagerwörter: *kontinuierliche Fermentation, kontinuierliche Hauptgärung, Bierfermentation*

Abstract

Based on the knowledge of previous works, an alternative plant and process concept were developed in this thesis, in order to efficiently produce a stable, high quality beer in a continuous mode.

The concept thereby foresees the usage of classical tanks, which are modified by the installation of central pipes, so that two separate, yet interconnected reaction spaces result. Particles and organisms can sediment conventionally and may be removed and recycled if required.

In order to assess the targeted processes adequately, and to enable the comparison to industrial sized applications in batch modes, fundamental experiments were conducted preliminary, in which the reaction kinetics of yeasts were evaluated systematically. Additionally, specific methods were developed to detect the characteristics of currents in reactors and to simplify the analytical determination of the vitality of microbes. For process optimization purposes, the addition of bactericides and anti-foam-agents into the substrate were tested.

The findings were used in order to construct a pilot scale plant with a daily production capacity of 50 liters. With it, four long-term trials were performed before the ideal parameters were determined to produce beer at the targeted quality.

Currently, the applicability of the here developed processes to an industrial scale is being investigated in a cooperated research project.

Key Words: *continuous fermentation, continuous main fermentation, beer fermentation*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in keiner gleichen oder ähnlichen Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Freising, den 21.06.2017

Danksagung

Diese Arbeit ist zum größten Teil während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter, beratender Ingenieur und Abteilungsleiter der Fachbereiche Forschung und Entwicklung sowie Hygienic Design am Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmitteltechnologie (TUM) entstanden.

Zahlreiche Menschen haben mich während dieser Zeit direkt oder indirekt unterstützt, wofür ich mich an dieser Stelle herzlich bedanke.

Besonders hebe ich dabei meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. L. Narziß hervor. Seine Persönlichkeit und seine wissenschaftliche Betreuung haben mich geprägt.

In gleichem Maße danke ich Herrn Prof. Dr. F. Jacob, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Das Vertrauen und die Unterstützung, die er mir entgegenbrachte, waren beispiellos.

Zudem gilt Herrn Prof. Dr. T. Becker und Herrn Prof. Dr. M. Eßlinger mein Dank für den fachlichen Rat und die Übernahme der Zweit- und Drittprüferschaft sowie Herrn Prof. Dr. H. C. Langowski für die Übernahme des Prüfungsvorsitzenden.

Ferner danke ich explizit Herrn Prof. Dr. H. Parlar, dem ehemaligem Lehrstuhlinhaber sowie allen Mitarbeiter(inne)n des Forschungszentrums. Namentlich sind dabei insbesondere die Herren Dr. M. Hutzler, H. Walter, C. Bromig, Prof. Dr. M. Coelhan, Dr. J. Hoffmann, F. Mallok J. Englmann, H.-P. Schropp, Dr. K. Litzenburger, D. Cotterchio, H. Schneiderbanger, R. Riedl, D. Stretz, A. Zeidler, T. Meier-Dörnberg, M. Michel, M. Schmidt und S. Pellmeier sowie den Damen: G. Widmann, J. Vilser, S. Hubensteiner, S. Illing, T. Spranger, S. Dawidowitsch und M. Gramma zu erwähnen, da sie durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre Anregungen zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin all meinen studentischen Mitarbeiter(inne)n sowie meinen Studien- und Diplomarbeiter(inne)n.

Außerdem bedanke ich mich bei den Herren P. Gattermeyer, P. Guler und S. Thomandl von der Krones AG für ihr Engagement in diesem Forschungsprojekt. Ohne sie hätte das Vorhaben nicht in einen industriellen Maßstab übertragen werden können.

Zudem bedanke ich mich hiermit ausdrücklich bei Herrn Dr. V. Kronseder und der gesamten Belegschaft der Krones AG. Durch ihr Vertrauen und die Einstellung als Leiter der Entwicklungsabteilung im Fachbereich Brauereianlagen ist es mir auch zukünftig möglich, Prozesse aktiv und kreativ mitzugestalten.

Weiterhin bedanke ich mich bei all meinen Freunden, Kollegen und Bekannten für ihre Förderung während der Erstellung dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei S. Möschler, die mich in vielen Jahren unterstützt hat und mir stets zur Seite stand. Diesbezüglich gilt mein Dank auch ihren Eltern und ihrer Familie.

Abschließend bedanke ich mich ausdrücklich bei meinen Eltern und Geschwistern. Sie haben mir meinen Werdegang ermöglicht und waren in allen Lebenslagen für mich da, weshalb ich ihnen diese Arbeit widme.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	ZIELSETZUNG	2
3	GRUNDLAGEN.....	3
3.1	Systematische Betriebs- und Systemeinteilungen.....	3
3.2	Grundlagen zum Anlagenbetrieb	4
3.3	Vor- und Nachteile kontinuierlicher Gärführungen	6
3.4	Eignungsanalyse zur Getränkeherstellung.....	7
3.5	Reaktoren zur kontinuierlichen Bier(haupt)gärung.....	8
3.5.1	Immobilisierte Fermentationsorganismen	9
3.5.2	Nicht trägerfixierte Fermentationsorganismen	12
3.5.2.1	Das Coutts-Verfahren	15
3.5.2.2	Das Fort-Worth-Verfahren	17
3.5.2.3	Das Watney / Bishop-Verfahren	18
3.5.2.4	Die APV-Turmfermentation	19
3.5.2.5	Das Gotha-Gärverfahren	20
3.6	Grundlagen der Fermentationstechnologie	21
3.6.1	Klassische Stressbedingungen für Brauereihefen	21
3.6.2	Auswirkungen technologischer Stellglieder auf die Fermentation	22
3.6.2.1	Variationen der Biomassegehalte.....	22
3.6.2.2	Variationen der Gärtemperaturen.....	23
3.6.2.3	Variationen der Belüftungsraten	24
3.6.2.4	Variationen der Gärdrücke	25
4	ALTERNATIVES VERFAHRENSKONZEPT	27
4.1	Beurteilung des Standes der Technik	27
4.2	Alternative Prozesstechnologie	29
4.3	Patentanmeldung zum Verfahren und Vorrichtung.....	34
5	BASISEXPERIMENTE.....	35
5.1	Rahmenbedingungen für Fermentationen im Versuchsmaßstab	35
5.1.1	Fermentationssubstrat	35
5.1.2	Fermentationsorganismen	38
5.1.2.1	Hefepropagation	38
5.1.2.2	Erntehefe	40
5.1.3	Reaktoren für Laborfermentationen	40
5.1.3.1	Kleinfermenter (KF)	41
5.1.3.2	Versuche in Kleinfermentern (KF)	43
5.1.3.3	Scale-up-Verhalten der Kleinfermenter (KF)	46
5.1.3.4	Testfermenter (TF50)	47
5.1.3.5	(Batch-)Versuche in Testfermentern (TF50).....	50
5.1.3.6	Scale-up-Verhalten der Testfermenter (TF50)	51

5.2	Auswirkung technologischer Stellglieder	52
5.2.1	Variationen der Anstellzellzahl, Gärtemperatur und Belüftungsraten	52
5.2.1.1	Extraktabbau	54
5.2.1.2	Alkoholgehalt	58
5.2.1.3	Zeit zum Überwinden der Lag-Phase	59
5.2.1.4	FAN-Aufnahme 24 Stunden nach dem Anstellen	60
5.2.2	Variationen der Fermentationsdrücke	61
5.2.2.1	Isobare Spunddruckerhöhungen	61
5.2.2.2	Variierende Spundungsdrücke	65
5.2.2.3	Sukzessiv erhöhte und verringerte Spundungsdrücke	68
5.3	Fermentationsorganismen	69
5.3.1	Physiologischer Zustand der Kulturorganismen	69
5.3.1.1	CO ₂ -Volumen und Ladungstitration zur Vitalitätsbestimmung	70
5.3.1.2	CO ₂ -Druckaufbau zur Vitalitätsbestimmung	70
5.3.2	Hefecharakterisierung	72
5.3.3	Adaptionsvermögen	73
5.4	Verfahrenstechnische Parameter	78
5.4.1	Substratstabilität	79
5.4.1.1	Variation der Substratlagerungstemperatur	79
5.4.1.2	Substratstabilität: Zugabe Bakterizide	80
5.4.2	Antischaummitteleinsatz	81
5.4.3	Verweilzeittests	82
6	KONTINUIERLICHE FERMENTATION.....	83
6.1	Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation.....	83
6.1.1	Fermentationssubstrat	84
6.1.2	Belüftung und Inokulation	85
6.1.3	Hefedosage und Lagerung	85
6.1.4	Hauptreaktoren (TFM50)	86
6.1.5	Lagerung und Produktabführung	86
6.1.6	Probenahme und Systemeinstellung	87
6.1.7	Analysenmethoden	88
6.2	Langzeitversuche	89
6.2.1	Langzeitversuch 1 (LV1): [Laufzeit 29 Tage]	89
6.2.2	Langzeitversuch 2 (LV2): [Laufzeit 28 Tage]	92
6.2.3	Langzeitversuch 3 (LV3): [Laufzeit 37 Tage]	97
6.2.4	Langzeitversuch 4 (LV4): [Laufzeit 57 Tage]	105
7	ZUSAMMENFASSUNG	114
7.1	Zusammenfassung Grundlagen	114
7.2	Zusammenfassung Basisexperimente	114
7.3	Zusammenfassung über die kontinuierlichen Gärungen	117

8	AUSBLICK UND DISKUSSION.....	118
8.1	Wirtschaftliche Betrachtung.....	118
8.1.1	Kapitalkostenreduzierungen (Capex)	118
8.1.2	Betriebskostenreduzierung (Opex)	119
8.2	Industrielle Umsetzung des Konzeptes.....	120
8.3	Fokus weiterer Forschungsarbeiten.....	124
8.3.1	Manipulation der Substrateigenschaften	124
8.3.2	Optimierung der Würzelagerung.....	124
8.3.3	Charakterisierung weiterer Hefestämme	124
8.3.4	Optimierung des Anstellens	124
8.3.5	Prozessüberwachung	125
8.3.6	Verfahrenstechnische und konstruktive Modifikationen.....	125
8.3.7	Ergänzende und alternative Technologien	125
8.4	Fazit	129
9	ANHANG.....	130
	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Systematische Einteilung kontinuierlicher Systeme nach PORTNO	4
Abb. 2: Kritische Durchflussrate	5
Abb. 3: Wachstum i. Abh. d. Substrates.....	5
Abb. 4: Kontinuierliche Fermentation: Verfahren der Kirin Brauerei	10
Abb. 5: Reaktorklassen für immobilisierte Organismen nach KRONLÖF	11
Abb. 6: 18 homogene Systeme zur kontinuierlichen Fermentation mit freien Zellen	13
Abb. 7: 18 heterogene Systeme zur kontinuierlichen Fermentation mit freien Zellen	14
Abb. 8: Kontinuierliche Fermentation: Coutts-Verfahren.....	16
Abb. 9: Kontinuierliche Fermentation: Fort–Worth-Verfahren	17
Abb. 10: Kontinuierliche Fermentation: Watney-/Bishop-Verfahren	18
Abb. 11: Kontinuierliche Fermentation: APV Gärturm.....	19
Abb. 12: Kontinuierliche Fermentation: Gotha-Verfahren	20
Abb. 13: Modifiziertes Diagramm zur Hefestressung nach GIBSON	21
Abb. 14: Modifizierter Tank	31
Abb. 15: Tankkaskade zur kontinuierlichen Fermentation	32
Abb. 16: Approximierter Extraktabbau in unterschiedlichen Systemen.....	33
Abb. 17: Angenommenes Strömungsprofil in der Kaskade.....	34
Abb. 18: Ausführungsbeispiele von Laborfermentern	42
Abb. 19: Präparation der Kleinfärmer (KF).....	43
Abb. 20: Spundung und Kühlung der Kleinfärmer (KF).....	44
Abb. 21: Probenbehandlung bei Kleinfärmentationen.....	45
Abb. 22: Konstruktionsdetails des Testfermenters (TF50).....	48
Abb. 23: Prozessanbindung des Testfermenters (TF50)	49
Abb. 24: Installation der Testfermenter (TF50) in der Forschungsbrauerei	50
Abb. 25: Extraktabbau i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temperatur	54
Abb. 26: Produktivitätsverlust von Hefe i. Abh. d. Inokulationsgehalte	56
Abb. 27: Abweichungen der Universalformel zu empirisch ermittelten Werten.....	57
Abb. 28: Alkohol i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temperatur	58
Abb. 29: Alkoholbildung i. Abh. d. Extraktabbaus	59
Abb. 30: Überwindung der Lag-Phase i. Abh. d. Anstellhefemenge und der Temperatur	60
Abb. 31: FAN-Abbau nach 24 Stunden i. Abh. d. Anstellhefemenge und der Temperatur	61
Abb. 32: Versuchsaufbau für variierende Spundungsdrücke in Kleinfärmentern.....	66
Abb. 33: Druckprofil für periodische Variationen	67
Abb. 34: Druckprofile für sukzessiv steigende/fallende Druckgärungen	68
Abb. 35: Vitalitätsprüfung von Hefe.....	72
Abb. 36: Verfahren zur Untersuchung des Adaptionvermögens von Hefe.....	74
Abb. 37: Wachstumsanpassungen von Hefen bei dauerhafter Stressung.....	75
Abb. 38: Wachstumsanpassungen von Hefen bei variierender Stressung	76
Abb. 39: Extraktabbau von Hefen bei dauerhafter Stressung	77
Abb. 40: Extraktabbau von Hefen bei variierender Stressung	77
Abb. 41: Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation	84
Abb. 42: Foto der Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation.....	87
Abb. 43: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV1)	90
Abb. 44: Vergärungsgrade in der Pilotanlage (LV1).....	90
Abb. 45: Verfahrenseinstellungen (LV1)	91
Abb. 46: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV2)	92
Abb. 47: Vergärungsgrade in der Pilotanlage (LV2).....	93
Abb. 48: Verfahrenseinstellungen (LV2/P1: 15/15/15/9/0).....	93
Abb. 49: Verfahrenseinstellungen (LV2/P2: 15/15/15/11/0).....	94
Abb. 50: Verweilzeittest (LV2: 15/15/15/11/0).....	95

Abb. 51: Einfluss von Antischaummitteln und Verfahrensvariationen (LV1/LV2).....	96
Abb. 52: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV3)	98
Abb. 53: Verfahrenseinstellungen (LV3/P1: 12/12/12/10)	98
Abb. 54: Verfahrenseinstellungen (LV3/P2: 11/13/14/15).....	99
Abb. 55: Verfahrenseinstellungen (LV3/P3: 10/12/16/16).....	100
Abb. 56: Verfahrenseinstellungen (LV3/P4: 10/10/16/16).....	100
Abb. 57: Viabilitäten der Frisch- und Erntehefen (LV3).....	101
Abb. 58: Viabilitäten der Hefen in Schwebelagerung (LV3)	102
Abb. 59: Haupthärparameter (HGP) in der Pilotanlage (LV3).....	102
Abb. 60: Gärungsnebenprodukte (GNP) in der Pilotanlage (LV3)	103
Abb. 61: Sensorischer Produkteindruck (LV3)	104
Abb. 62: Vicinale Diketone (VDK) in der Pilotanlage (LV3).....	105
Abb. 63: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV4)	106
Abb. 64: pH-Wert-Verläufe in der Pilotanlage (LV3)	106
Abb. 65: Diacetylgehalte der Halbwaren in der Pilotanlage (LV4)	107
Abb. 66: 2,3-Pentadiongehalte der Halbwaren in der Pilotanlage (LV4).....	107
Abb. 67: Verfahrenseinstellungen (LV4: 16/16/18/18/3)	108
Abb. 68: Verfahrenseinstellungen (LV4: 20/20/20/22/22)	109
Abb. 69: Verfahrenseinstellungen (LV4: 20/20/22/22/22)	109
Abb. 70: Viabilitäten der Erntehefen (LV4).....	110
Abb. 71: Hauptgärparameter (HGP) in der Pilotanlage (LV4)	111
Abb. 72: Vicinale Diketone (VDK) der Fertigprodukte in der Pilotanlage (LV4)	112
Abb. 73: Einfluss von Antischaummitteln und Verfahrensvariationen (LV3/LV4).....	113
Abb. 74: Prozessanbindung der herkömmlichen und alternativen Technologie	118
Abb. 75: Messmodell zur kontinuierlichen Biergärung	120
Abb. 76: Würzepuffer und Vorreaktoren zur kontinuierlichen Fermentation	121
Abb. 77: Hauptreaktoren zur kontinuierlichen Fermentation	122
Abb. 78: Industrielle Versuchsanlage zur kontinuierlichen Fermentation.....	123
Abb. 79: Links: Belüftungstrecke und Erntehefetanks.....	123
Abb. 80: Rechts: Leitrohr im Reaktor mit kräusenbedecktem Bierspiegel	123
Abb. 81: Funktionsschema der Verdrängungselemente	126
Abb. 82: Verdrängungskörper mit Drallelementen	126
Abb. 83: Verdrängungselement in Kombination mit Umwälzvorrichtungen	127
Abb. 84: Alternatives Tankverrohrungskonzept	127
Abb. 85: Alternatives Tankverrohrungskonzept in Kaskadenschaltung	128
Abb. 86: Versuchsanlage zur Tankumwälzung u. kontinuierlichen Fluidweiterleitung	128
Abb. 87: 1 °P Extraktreduktion (11,8→10,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	130
Abb. 88: 2 °P Extraktreduktion (11,8→9,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	131
Abb. 89: 3 °P Extraktreduktion (11,8→8,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	131
Abb. 90: 4 °P Extraktreduktion (11,8→7,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	132
Abb. 91: 5 °P Extraktreduktion (11,8→6,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	132
Abb. 92: 6 °P Extraktreduktion (11,8→5,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	133
Abb. 93: 7 °P Extraktreduktion (11,8→4,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	133
Abb. 94: 8 °P Extraktreduktion (11,8→3,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	134
Abb. 95: 9 °P Extraktreduktion (11,8→2,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.....	134

**Alle Abbildungen ohne Quellenangaben wurden vom Verfasser dieser Arbeit erstellt.*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der künstlichen Würze nach SACHER.....	35
Tabelle 2: Charakteristika von Sekundärwürzeprodukten.....	36
Tabelle 3: Würzeschwankungen in 8 aufeinanderfolgenden Produktionswochen	37
Tabelle 4: Molekularbiologische Untersuchungsmethoden zur Hefereinheit	39
Tabelle 5: Durchschnittliche Eigenschaften d. hitzebehandelten Propagationswürze	39
Tabelle 6: Analysen für Standard-Laborfermentationen.....	45
Tabelle 7: Variationen der Anstellkonzentration und Fermentationstemperaturen (0,5 bar)..	53
Tabelle 8: Arithmetische Korrelationen des Extraktabbau (0,5 bar)	55
Tabelle 9: Universalformel zur Berechnung von Batchgärungen	57
Tabelle 10: Variationen der Anstellkonzentrationen und der Temperatur (1,3 bar)	62
Tabelle 11: Variationen der Anstellkonzentrationen und der Temperatur (2,0 bar)	63
Tabelle 12: Gesamtbeurteilung von Druck-, Zellzahl- und Temperaturvariationen	64
Tabelle 13: Vitalitätsanalyse von Proben mit geringen Biomassegehalten.....	71
Tabelle 14: Methoden zur Qualitätsüberwachung der kontinuierlichen Fermentationen	88

**Alle Tabellen ohne Quellenangaben wurden vom Verfasser dieser Arbeit erstellt.*

Formelverzeichnis

Formel 1: Reaktionsgeschwindigkeit i. Abh. d. Substratkonzentration nach MONOD	5
Formel 2: Wachstumsgeschwindigkeit von Mikroorganismen nach MONOD	5
Formel 3: Produktivitätsverlust von Hefe i. Abh. d. Anstellkonzentration	56
Formel 4: Alkoholbildung i. Abh. d. Extraktabbaurate	58
Formel 5: Zeit zum Überwinden der Lag-Phase i. Abh. d. Zellzahl und Temperatur	59
Formel 6: FAN-Abbau in 24h i. Abh. d. Zellzahl und Temperatur	60

**Alle Formeln ohne Quellenangaben wurden vom Verfasser dieser Arbeit erstellt.*

Abkürzungsverzeichnis

ATM	atmosphärisch
bar _ü	Bar Überdruck
Bio	Biologisch(e/er)
BS	Belüftungsstrecke
Capex	Capital expenditure (Investitionskosten)
CIP	Cleaning in Place
CoA	Coenzym A
DLG	Deutsche Lebensmittelgesellschaft
DMS	Dimethylsulfit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	elektronischer Anhang
EBC	European Brewery Convention
EP	Europäisches Patent
FAN	freier α -Aminostickstoff
Ges. lösl. N	Gesamt-löslicher-Stickstoff
GG%	Gewichts-Gewicht-Prozent
GNPs	Gärungsnebenprodukte
GV%	Gewichts-Volumen-Prozent
HGP	Hauptgärparameter
HTS	Hefetrockensubstanz
HZ	Hefezellen
i. Abh. d.	in Abhängigkeit der
ICP	intrazellulärer pH-Wert
IU	International Units
KEG	Fass
KF	Kleinfermenter mit 2 Liter Nettovolumen
Koag. N	koagulierbarer Stickstoff
Kryo.	Kalt/Kälte
KZE	Kurzzeiterhitzer
LV(1–4)	Langzeitversuch (1–4)
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission
MRS	Medium: Man, Rogosa und Sharpe
NCIMB	National Collections of Industrial Bacteria
Opex	Operational expenditure (Betriebskosten)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
°Plato/°P	Grad Plato
R ²	Bestimmtheitsmaß
SW	Stammwürze
σ	Standardabweichung
TBZ	Thio-Barbitursäure-Zahl
Temp.	Temperatur
TF(M)50	Testfermenter (modifiziert zur kontinuierlichen Gärung) mit 50 Liter Nettovol.
TUM	Technische Universität München
VDK(s)	vicinale Diketone
VV%	Volumen-Volumen-Prozent
WO	International angemeldetes Patent (Patent Cooperation Treaty (PCT))
ZKTs	zylindrokönische(r) Tank(s)
ZZ	Zellzahl

1 EINLEITUNG

Im Zuge der Industrialisierung wurden immer mehr Prozesse und Verfahrensweisen kontinuierlich gestaltet, um Effizienzsteigerungen zu gewährleisten. Dies gilt auch für mikrobiologische Stoffumsetzungen, sprich Fermentationen. So wurden kontinuierliche Gärverfahren zur Presshefe- und Alkoholherstellung erstmals Ende des 19. Jahrhunderts erfolgreich großtechnisch implementiert und patentiert.(1, 2)

Aufgrund potenzieller Vorteile der Verfahrensanwendung folgten zahlreiche Versuche, derartige Methoden auch für die Bier- und Getränkeherstellung zu etablieren. Schnell zeigte sich jedoch, dass die kontinuierliche Prozessführung zur Genussmittelherstellung deutlich komplizierter ist, da an die Produkte hohe Qualitätsanforderungen gestellt werden und das mikrobielle Wachstum, der Stoffwechsel und die Biosynthese simultan geregelt werden müssen.

Dennoch intensivierten sich vor allem in den 1960er-Jahren die Bemühungen, Vorrichtungen und Verfahren zur kontinuierlichen Bierfertigung bereitzustellen. Trotz einiger Versuche im industriellen Maßstab scheiterte die Technologie jedoch weitestgehend, da die gewünschte Produktqualität stationär hergestellter Erzeugnisse nicht adäquat erreicht wurde. Außerdem zeichneten sich zahlreiche Probleme bei dem Betrieb der oft hoch komplexen Anlagen ab.

1968 bezeichnete THORNE die kontinuierliche Gärung daher als eine „*kuriose Episode der Brauereitechnologie*“ (3) und PORTNO schlussfolgerte 1978 (4), dass die kontinuierliche Gärung dazu tendiert, mehr Probleme zu erzeugen als zu lösen. Auch STEWART und RUSSEL sahen 1986 für eine derartige Technologie kein Zukunftspotenzial, insbesondere dann nicht, wenn die vor- und nachgeschalteten Prozesse diskontinuierlich erfolgen.(5, 6)

Trotzdem bemühten sich Wissenschaftler weiterhin, die kontinuierliche Biergärung zu perfektionieren, wobei sich die Forschung und Entwicklung seit den 1980er-Jahren auf Systeme und Verfahren mit immobilisierten Organismen konzentrierte, da diese aufgrund der höheren Biomassekonzentrationen und der kompakteren Bauweisen der Reaktoren als potenziell effizienter gelten.

Obgleich Studien zeigen, dass kontinuierliche Bierreifungsverfahren mit immobilisierten Organismen bereits heute eine Alternative zu klassischen, chargenweisen Prozessen darstellen könnten,(7-9) gestaltet sich die Hauptgärung mit trägerfixierten Organismen augenscheinlich als sehr viel schwieriger. So waren die unter diesen Bedingungen hergestellten Produkte in ihren analytischen und organoleptischen Merkmalen konventionell hergestellten Produkten meist signifikant unterlegen, oder die Kosten für geeignete Trägermaterialien, Anlagen und deren Betrieb verhinderten industrielle Realisierungen.(10)

Letztendlich führten die Miss- oder Teilerfolge der letzten Dekaden so zu einer allgemeinen Skepsis bis hin zur Ablehnung derartiger Technologien in der Getränkeindustrie.

2 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur kontinuierlichen Fermentation von Flüssigkeiten bereitzustellen, mit denen ein äquivalentes Qualitätsniveau wie bei herkömmlichen Batchverfahren langfristig und ökonomisch erreicht werden kann.

Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine Recherche konventioneller Applikationen und Bewertung vorhandener Systeme. Des Weiteren wurde evaluiert, für welche fermentierten Getränke sich derartige Technologien potenziell eignen. Basierend auf den Erkenntnissen wurde ein Prozess entwickelt, der mit geringfügigen Modifikationen in bestehenden Anlagen getestet werden kann, um mehr Informationen über die biotechnologischen Reaktionen zu erhalten und simultan das ökonomische Risiko im Falle eines Misserfolges zu reduzieren.

Bevor das Verfahren in einer speziell konstruierten Pilotanlage getestet wurde, galt es grundlegende Erkenntnisse zu generieren und Lösungen für spezifische Anforderungen bereitzustellen. So erfolgten im Rahmen dieser Abhandlung:

- Versuche zur Lagerung und Stabilisierung von Bierwürzen, einschließlich der Evaluierung des Einsatzes von Bakterizin bildenden Mikroorganismen
- Versuche im Batchmodus unter Variationen der Hefezellzahl, der Belüftungsraten und der Temperaturen
- stationäre Versuche mit Variationen des Druckprofils
- die Evaluierung der Auswirkungen von Alkohol und Zucker auf das Fermentationsverhalten und Adaptionsvermögen von Brauereihefen
- Untersuchungen zum Einfluss von Antischaummitteln

Um den kontinuierlichen Betrieb später adäquat beurteilen zu können, wurden außerdem folgende analytische Methoden weiterentwickelt und getestet:

- Konstruktion von Kleinfermentern (KF und TF50), mit deren Hilfe *Scale-up*-Einschätzungen optimiert werden können
- Entwicklung eines Standardverfahrens zur Charakterisierung von Hefestämmen
- Konzipierung alternativer Analysenmethoden zur vereinfachten Bestimmung der Hefevitalität
- Evaluierung eines Prozesses, bei dem die Verweilzeitfunktionen mittels komparativer Modellorganismen als *Bio-Tracer*, detektiert werden können

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde subsequent eine Pilotanlage mit 50 Liter Tagesdurchsatz konzipiert und konstruiert. Insgesamt folgten darin 4 Langzeitversuche, bis die idealen Anlagen- und Prozesskonfigurationen ermittelt wurden, um ein Produkt in angestrebter Qualität dauerhaft und stabil zu erzeugen.

Im Anschluss an die erfolgreichen Laborversuche wurde die Übertragbarkeit auf einen industriellen Maßstab ermittelt. Zu diesem Zwecke wurden Kooperationen vereinbart und eine Anlage mit 5.000 Liter Tagesdurchsatz entworfen und in Betrieb genommen. Durch diese Vorgehensweise sollen individuelle sowie allgemein gültige Erkenntnisse über den Prozess generiert werden und bei Bedarf Optimierungen erfolgen.

Außerdem werden zusätzlich neue Ideen zu Anlagen und Verfahren getestet, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind. Sollten die industriellen Versuche weiterhin erfolgreich sein, ist derzeit eine Kapazitätserweiterung auf 400.000 hl Jahresausstoß in der Testbrauerei geplant.

3 GRUNDLAGEN

In diesem Kapitel werden Grundlagen der kontinuierlichen Fermentation zusammengefasst.

3.1 Systematische Betriebs- und Systemeinteilungen

Bei **konventionellen diskontinuierlichen** und **beschleunigten diskontinuierlichen** Verfahren verändern sich die Betriebszustände statisch, d. h. als Funktion der Zeit und nicht des Ortes.

Als **semikontinuierliche Verfahren** werden üblicherweise Prozesse bezeichnet, die auf einer intermittierenden Zucht von Mikroorganismen basieren. Dazu wird meist ein Teil des Fermentates im Reaktor belassen, der dann als Inokulat für die nächste Charge dient. Bei sehr kurzen zyklischen Ab- und Drauflassintervallen nähert sich der Prozess einer vollkontinuierlichen Betriebsweise an. Derartige Methoden werden auch als *Feeding-* oder *Fed-batch-Prozesse* bezeichnet.(11)

In **vollkontinuierlichen Verfahren** wird dem gärenden Medium permanent frische Nährlösung zugesetzt und in gleichem Maße vergorenes Substrat abgezogen. Somit herrscht hier ein volumenkonstantes Fließsystem als Funktion des Ortes vor.

HERBERT (12, 13) differenziert die Systeme zur kontinuierlichen Fermentation in **offene Systeme**, in denen die Mikroorganismen teilweise entfernt werden, und in **geschlossene Systeme**, bei denen die Kulturstämme vollständig im System verbleiben, z. B. durch Membranretention. Weil jedoch sowohl HERBERT (13) als auch PORTNO (14) der Ansicht waren, dass geschlossene Systeme praktisch keine Bedeutung für großtechnische Einsätze haben, da in ihnen kein stabiles Fließgleichgewicht erreicht wird, ergänzte PORTNO die Einteilung um **teilgeschlossene Systeme**, in denen die ausgetragene Organismenkonzentration geringer ist als die im System verbleibende.

Alle großtechnischen Gärverfahren, die bisher für die kontinuierliche Bierherstellung eingesetzt wurden, sind dieser Klasse zuzuordnen.

Die Systeme werden weiterhin in heterogen und homogen klassifiziert. Bei **heterogenen Systemen** herrscht ein örtliches Konzentrationsgefälle von Substrat, Mikroorganismen und Stoffwechselprodukten in der Fließrichtung vor, sodass sich eine räumliche Varianz und zeitliche Konstanz ergibt. **Homogene Systeme** zeichnet hingegen eine permanente, vollständige Durchmischung aller Reaktionspartner aus.(6) Somit ergibt sich jeweils eine räumliche und zeitliche Konstanz. Zudem sind mehrstufige gemischte Kombinationen möglich, die sowohl homogene als auch heterogene Elemente enthalten. Wie Abbildung 1 illustriert werden diese mehrstufigen Systeme von PORTNO als **teilweise heterogen** bezeichnet, da sich das Fließverhalten in den Kaskaden mit zunehmender Reaktoranzahl einer heterogenen Arbeitsweise annähert.(15)

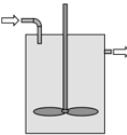
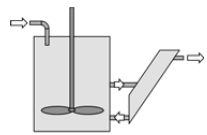
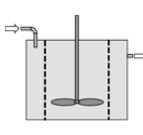
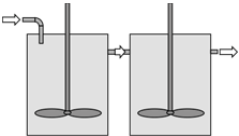
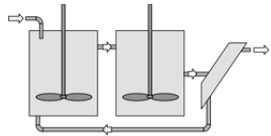
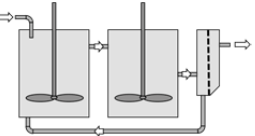
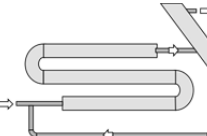
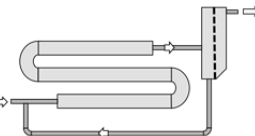
	offen	teilgeschlossen	geschlossen
homogen			
teilweise heterogen			
heterogen			

Abb. 1: Systematische Einteilung kontinuierlicher Systeme nach PORTNO

Um die Wachstumsintensität der Kulturorganismen zu steuern, werden die Reaktoren entweder turbidostat oder chemostat betrieben. Bei **turbidostatem** Betrieb erfolgt die Flusssteuerung der substratabhängigen Biomassekonzentration fotometrisch (16). Bei **chemostatem** Betrieb hingegen wird das System über die Durchflussrate eines wachstumsbegrenzenden Faktors gesteuert (17). Diese Betriebsart wird z. B. bei Einsatz von Rührkesseln bevorzugt und wurde auch für alle bisher industriell evaluierten Fermentationsverfahren zur Bierbereitung implementiert.

3.2 Grundlagen zum Anlagenbetrieb

Die mathematische Grundlagen zu kontinuierlichen Fermentationen wurden erstmals von MONOD (18) und NOVICK/SZILARD (19-21) 1950 parallel und unabhängig voneinander beschrieben und von KULOZIK (22) 1991 ergänzend zusammengefasst.

In den Publikationen wird dabei insbesondere der Zusammenhang zwischen Betriebsgeschwindigkeit und der Populationsdynamik erörtert. So wird dem System bei kontinuierlicher Operation permanent Substrat zugeführt und Fermentat abgeführt, wodurch sich eine bestimmte Durchsatzrate/Verdünnungsrate (D) ergibt. Sobald diese die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit (μ) der Organismenpopulation überschreitet, erfolgt eine Auswaschung und somit eine Reduzierung der Biomassekonzentration (X) im System. Simultan dazu steigt der Substratgehalt (S) an, weil weniger Nährstoffe metabolisiert werden.

In der Praxis wird daher eine Durchflussrate (D_M) gewählt, bei der die kritische Durchsatzrate (D_C) nicht überschritten und somit eine maximale Produktivität gewährleistet wird (vgl. Abb. 2).(23)

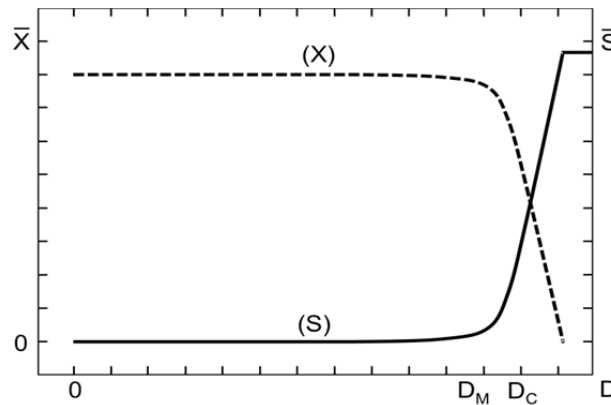


Abb. 2: Kritische Durchflussrate

Um die ideale Arbeitsweise am Punkt (D_M) zu ermöglichen, ist die Kenntnis über den Zusammenhang der substratabhängigen Wachstumsrate von Mikroorganismen unabdingbar. Dabei wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration (S) von MONOD (24) nach der Formel 1 berechnet:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Formel 1}$$

μ_{\max} stellt die spezifische, maximale Wachstumsgeschwindigkeit der Organismen dar. Weil diese von multiplen Parametern abhängt, die bspw. die Art der Organismen, die Substratzusammensetzung, die Fermentationsbedingungen: Temperatur, Druck, Belüftung etc. inkludieren, muss diese Kennzahl individuell empirisch determiniert werden. Dazu wird das Zeitintervall (t) in diskontinuierlichen Fermentationsversuchen gemessen, in der ein initialer Biomassegehalt (X_0) auf ein Niveau (X), nach der Formel 2, ansteigt:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad \text{Formel 2}$$

Ferner muss die *Monod-Konstante* (K_S) bestimmt werden. Dies erfolgt – ähnlich wie bei der Determinierung der *Michaelis-Menten-Konstanten* –, indem die Substratkonzentration bestimmt wird, bei der die Wachstumsrate (μ) halbmaximal ist (vgl. Abb. 3).

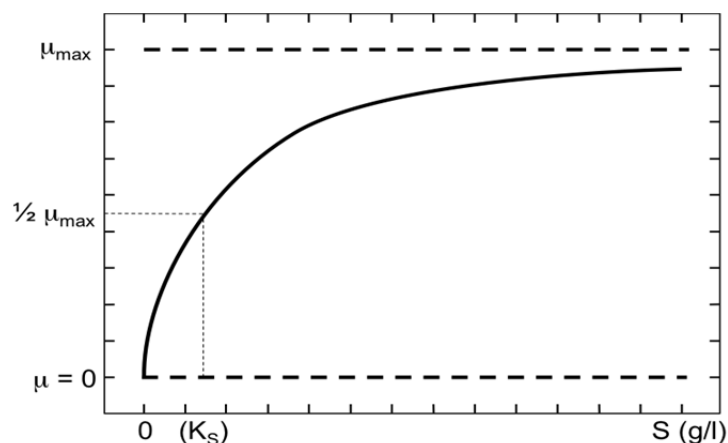


Abb. 3: Wachstum i. Abh. d. Substrates

3.3 Vor- und Nachteile kontinuierlicher Gärführungen

Im Vergleich zur absatzweisen Prozessführung kann eine signifikante Leistungssteigerung durch die Umstellung auf kontinuierliche Arbeitsweisen erreicht werden. Dabei beeinflussen jedoch die Anlagenkonfiguration, der Standort sowie die implementierte Betriebsweise die Effizienz in hohem Maße. Viele der in der Literatur beschriebenen Vorteile sind daher eher von theoretischer Natur und werden nicht zwangsweise bei jeder Umsetzung realisiert. Folgende Möglichkeiten ergeben sich jedoch potenziell durch eine kontinuierliche Arbeitsweise bei der Bier(haupt)gärung:(4, 5, 22, 25-38)

- Durch die Reduzierung von unproduktiven Rüstzeiten (Befüllen, Entleeren, Reinigen und Vorspannen) und die damit verbundene Steigerung der volumetrischen Produktivität (Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute aufgrund kleinerer Reaktoren) ist eine optimierte Anlagennutzung realisierbar.
- Es können höhere Extraktausbeuten (bspw. Reduzierung von Abfallhefe und Bierverlusten), verbesserte Rohstoffausbeuten (bspw. Hopfen und Hefe), bessere Möglichkeiten der CO₂-Aufbereitung sowie eine Reduzierung des Abwasseranfalls und des Reinigungsaufwandes erreicht werden.
- Eine optimierte, vollautomatische Steuerung, Messung und Regelung ermöglicht potenziell die Herstellung gleichmäßigerer Produktqualitäten und höherer Reinheit sowie Personalreduzierungen.
- Aufgrund von Steigerungen der Produktionsgeschwindigkeiten kann sich eine Verringerung der Kapitalkosten und Kapitalkostenbindung ergeben.
- In geschlossenen Anlagen kann potenziell ein geeigneter hygienischer Standard einfacher gewährleistet werden.
- Bei hoher Produktkonzentration und Substratlimitierung (im sogenannten *Steady-state-Zustand*) resultiert eine höhere Infektionssicherheit.
- Es ergibt sich vergleichsweise ein geringerer Energieverbrauch durch die Vermeidung von Spitzenlasten und Reinigungsreduzierungen sowie eine verbesserte Nutzungsmöglichkeit rekuperativer Energien.

Weil die Vorteile oft sehr spezifisch sind, widersprechen die Nachteile allerdings partiell den Vorteilen. So ergeben sich unter Umständen, bspw. trotz geringerem Personaleinsatz, keine personellen Ersparnisse, da das Bedienpersonal, bedingt durch den hohen Automatisierungsgrad, den umfangreichen Kontrollaufwand und die ständige Laborüberwachung höher qualifiziert sein sollte. Weitere mögliche Nachteile beinhalten:

- Komplexe Anlagen erhöhen die Investitionskosten, Wartungsaufwände und machen eine umfangreiche Ersatzteilbevorratung unabdinglich.
- Systemabhängig kann die Wirtschaftlichkeit z. B. durch hohe Kosten für Verbrauchsmaterialien wie Trägerkomplexe und Energie stark reduziert werden und zu Abhängigkeiten führen.
- Ohne einen kontinuierlichen Würzezustrom und/oder Bierabfluss treten logistische Probleme, vor allem an den Schnittstellen auf und es müssen unter Umständen Würzesammeltanks, Durchlauferhitzer sowie Bierpuffer vorgesehen werden.
- Häufig wird beschrieben, dass eine bestimmte Substratvorbehandlung, z. B. eine Kalttrubentfernung und/oder Filtration der Bierwürze, unabdinglich ist.
- Pro Linie kann nur eine Sorte hergestellt werden. Sortenwechsel während der Produktion sind somit diffiziler zu realisieren.

- Die Anlagen sind komparativ unflexibel hinsichtlich Absatzschwankungen und weisen meist eine schlechtere Anpassungsfähigkeit bei Betriebsstörungen auf.
- Die bestehenden Systeme haben teilweise lange Kommissionszeiten, bis sich ein stabiles Gleichgewicht (*Steady-state-Zustand*) einstellt.
- Oftmals bereiten Kontaminationen, die sich auch in den Anlagen festsetzen können, signifikante Probleme.
- Killerhefen (29, 39) sowie Mutationen können langfristig einfacher die Überlegenheit von Kulturhefepopulationen bedrohen.
- Eine Adaption der Mikroorganismen kann zu spezifischen Veränderungen der Stoffwechseleigenschaften führen.

Der größte Nachteil der konventionellen Technologie zur kontinuierlichen Biergärung besteht allerdings darin, dass bisher kaum ökonomische Verfahren entwickelt werden konnten, mit denen sich langfristig qualitativ hochwertige Produkte – äquivalent zu denen aus stationären Gärungen – herstellen ließen. Lediglich das modifizierte Coultts-Verfahren (siehe Kapitel 3.5.2.1, S. 15 ff.) bildet hier eine Ausnahme, wobei sich dessen Einsatz nach derzeitigem Kenntnisstand auf 4 Brauereien weltweit beschränkt.

3.4 Eignungsanalyse zur Getränkeherstellung

Aufgrund der möglichen Vor- und Nachteile der Technologie wurde im Rahmen dieser Arbeit vorab evaluiert, für welche fermentierten Getränke sich kontinuierliche Fermentationen global potenziell eignen.

Zu diesem Zweck wurden insgesamt 273 verschiedene Produkte erfasst und anhand der eingesetzten Roh- und Grundstoffe kategorisiert. Zur Eignungsanalyse wurden die Saisonalität der verfügbaren Ingredienzien, die Fermentationsdauer, die Provenienz einschließlich des durchschnittlichen Bruttoinlandprodukts sowie die Marktverbreitung und die Absatzmenge individuell gewichtet und beurteilt.

Als Resultat konnte so ermittelt werden, dass sich kontinuierliche Gärungen – und somit auch die Erforschung und Entwicklung derartiger Technologien – vor allem für milchbasierte Produkte eignen, weil der Grundstoff ganzjährig verfügbar ist, die Fermentationsdauern vergleichsweise kurz sind und Milchprodukte weltweit und in großen Mengen konsumiert werden.

Nach den in dieser Studie zugrunde gelegten Beurteilungskriterien wäre die Technologie jedoch auch potenziell für 45 % aller cerealienbasierten Getränke, einschließlich Bier, geeignet. Im Gegensatz dazu scheint die Implementierung für fruchtbasierte und andersartige fermentierte Getränke relativ uninteressant zu sein. (40-44)

3.5 Reaktoren zur kontinuierlichen Bier(haupt)gärung

Bevor ein alternatives Anlagen- und Verfahrenskonzept zur kontinuierlichen Bier(haupt)gärung ausgearbeitet werden konnte, musste eine detaillierte Recherche vorangestellt werden, um den aktuellen Stand der Technik genau zu erfassen. Dabei werden nachfolgend Verfahren und Systeme, die explizit für immobilisierte Kulturorganismen ausgelegt wurden, separat von denen mit freien Zellen betrachtet.

Insgesamt wurden so 143 Konzepte und Anlagen bewertet. Neben den dargestellten Beispielen, bei denen die Bier(haupt)gärung explizit im Fokus stand, finden sich außerdem zahlreiche weitere Ansätze zur kontinuierlichen Fermentation von Flüssigkeiten – auch aus anderen Industriezweigen. Weil sich die Konstruktionen und deren Betrieb jedoch meist nur marginal von den hier aufgeführten Beispielen unterscheiden, wird an dieser Stelle nicht gesondert auf derartige Konzepte eingegangen.

In der Literatur werden explizite Anforderungen an permanent betriebene Reaktoren gestellt. So postulierte PORTNO bereits 1978, dass Anlagen zur kontinuierlichen Fermentation eine Aufrechterhaltung hoher Zellkonzentrationen zur Anwendung von Schnellgärverfahren gewährleisten sollten. Zudem sollten die Systeme seiner Meinung nach die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme zur Produktion von vielfältigen Sorten sowie eine Kontrolle des Hefewachstums ermöglichen.(4)

Unabhängig davon werden bei allen kontinuierlichen Fermentationen stets Gärungsgefälle angestrebt, um Produktivitätsreduzierungen der Kulturorganismen durch Inhibierungseffekte zu vermeiden.(4, 45, 46) Daher eignen sich Systeme, in denen das durchströmte Fluid insgesamt einen Pfropfencharakter aufweist, besonders gut für derartige Applikationen.

Neben heterogen betriebenen Einzelmodulen, z. B. Rohr- und Festbettfermentern (47), kann dies in mehrstufigen, homogen betriebenen Kaskaden gewährleistet werden.(22, 25) So belegten ZWIETERIN (48) und DANACKWER 1959 (22) statistisch, dass in Kaskaden mit hoher Stufenzahl der Idealzustand der totalen Segregation annähernd erreicht wird. POWELL und LOWE stellten außerdem 1964 empirisch fest, dass ein Strömungssystem aus homogenen Einzelanlagen erst dann einen Rohrströmungscharakter aufweist, wenn 5 oder mehr Reaktoren verwendet werden.(49) Zudem lässt sich mathematisch belegen, dass das zulässige Rückführungsverhältnis in Kaskaden mit steigender Reaktoranzahl amplifiziert wird, wodurch sich der Aufwand zur Biomasserückführung verringert und das Substrat einfacher mit hohen Zelldichten reinokuliert werden kann.(50)

In der Praxis ist die Anzahl der eingesetzten Reaktoren in mehrstufigen Anlagen allerdings meist ein Kompromiss zwischen den Geschmacksanforderungen, den Investitions- und den Betriebskosten.(51-53)

Dennoch müssen für den adäquaten Reaktorbetrieb in jedem Fall grundlegende Zusammenhänge, die die Durchfluss-, Wachstums-, und Produktivitätsraten inkludieren, beachtet bzw. diese primär individuell empirisch determiniert werden (siehe Kapitel 3.2, S. 4 ff.).

3.5.1 Immobilisierte Fermentationsorganismen

Grundsätzlich können in praktisch allen Systemen immobilisierte Organismen anstelle von freien Kulturen eingesetzt werden. Das Binden der Fermentationskulturen auf Trägermaterialien hat jedoch komparativ den Vorteil, dass mit sehr hohen, definierten Biomassekonzentrationen gearbeitet werden kann. Dadurch beschleunigen sich die enzymatischen Prozesse und die Wirtschaftlichkeit wird potenziell gesteigert, z. B. aufgrund kleinerer Fermenter, einem geringeren Raumbedarf und einer simplifizierten Prozessüberwachung.(54)

Die möglichen Vorteile haben dazu geführt, dass sich die Forschung und Entwicklung in den letzten Dekaden intensiv mit den Reaktordesignen, den Trägermaterialien, den physiologischen und genetischen Veränderungen der Mikroorganismen sowie den entsprechenden Betriebsweisen für immobilisierte Kulturen beschäftigt hat.(3, 55-62) Die Grundlagen für die Applikationen der Technologie im Brauereibereich werden dabei bereits in zahlreichen Publikationen zusammengefasst.(63-66)

Erste systematische Versuche derartige Prozesse für die Bierhauptgärung einzusetzen, erfolgten dabei 1971 von NARZISS und HELlich (67). Sie verwendeten für das sogenannte *Bio-Brew-Verfahren* einen Schichtenfilter, der mit einer Kieselgur-Hefe-Mischung beschickt wurde.(68) Mit dieser Anlagenkonfiguration ließen sich zwar Fermentationszeiten von weniger als 3 Stunden realisieren; allerdings blockierte der Filter nach spätestens einer Woche Dauerbetrieb und es resultierten Jungbiere mit extrem hohen Gehalten an vicinalen Diketonen (VDKs), die eine verlängerte Lagerzeit oder eine Warmlagerung bei 30 °C mit Kräusengabe obligat machten. Auch zusätzliche Optimierungsversuche, die die Integration einer Belüftungszone, einem verbesserten Durchfluss durch den Reaktor sowie eine Temperierung des Reaktorinnenraums inkludierten, erbrachten nicht den gewünschten Erfolg.(69, 70)

BAKER und KIRSOP lösten 1973 das Problem zu hoher VDK-Gehalte im kontinuierlich hergestellten Jungbier, indem sie das endvergorene Produkt nach dem Austreten aus einem Kieselgurfestbettreaktor zunächst erhitzen, um das α -Acetolaktat in freies Diacetyl umzuwandeln. Nach einer anschließenden Abkühlung erfolgte dann eine kontinuierliche Konditionierung in einem nachgeschalteten Kieselgurfestbettreaktor.(71) Obwohl dieses Prinzip grundlegend auch heute noch partiell für die kontinuierliche Bierreifung eingesetzt wird,(10) scheiterten BAKER und KIRSOP seinerzeit, da die Reaktoren sehr schnell verblockten und sich die physiologischen Eigenschaften der Organismen so stark veränderten, dass rasch ungewünschte Varianzen in der Produktqualität resultierten.

1985 veröffentlichte die *Kirin Brauerei* (Japan) ein von ihr getestetes Konzept, welches ursprünglich die Implementierung von 3 Festbettreaktoren mit Alginat als Trägermaterial vorsah.(53, 72) Nachfolgend ist das Anlagenkonzept vereinfacht als Fließbild dargestellt.

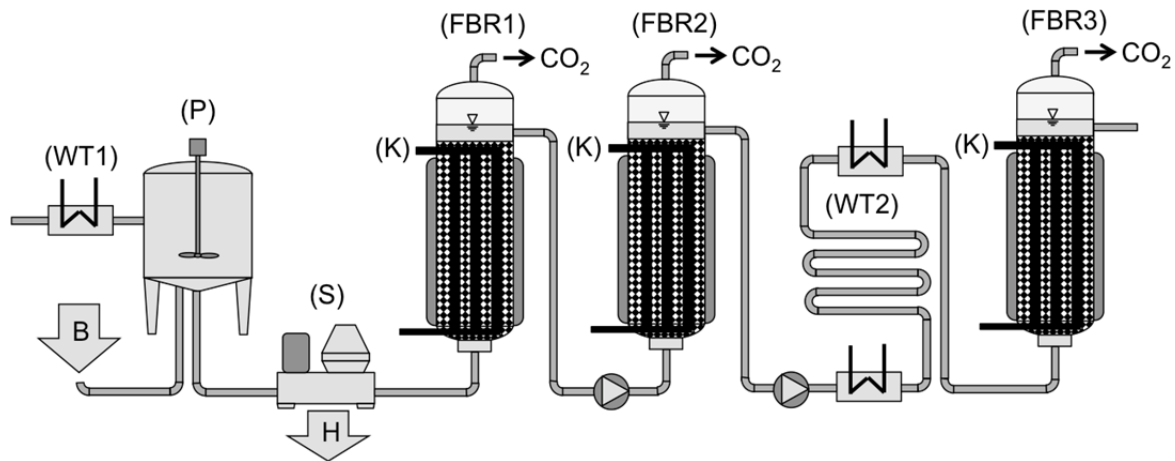


Abb. 4: Kontinuierliche Fermentation: Verfahren der Kirin Brauerei

Wie aus der Abbildung 4 hervorgeht, wurde zunächst die sterilisierte Würze (WT1) in einem Rührkessel (P) belüftet (B), um dort eine Zellteilung zu ermöglichen. Es folgte das Einstellen definierter Organismengehalte mittels einer Zentrifuge (S), bevor das Fluid kontinuierlich über 2 temperierbare (K) und in Reihe geschaltete Hauptfermenter (FBR1 und FBR2) geleitet wurde. Das vergorene Zwischenprodukt wurde anschließend zur Diacetylumwandlung nach dem Prinzip von BAKER und KIRSOP hitzebehandelt (WT2) und in den nachgeschalteten Festbettreaktor (FBR3) transferiert, um dort den Abbau der VDKs unterhalb der Geschmacksschwellenwerte zu realisieren.(71)

Weil sich jedoch die Alginatträgersubstanzen nicht sterilisieren ließen und zu Verblockungen der Reaktoren führten, wurde das Material später durch Glasware ersetzt, wodurch sich kontinuierliche Betriebsweisen von 6 Monaten bei Ausstoßmengen von 36.000 hl/a realisieren ließen.(73) Die Produktqualität wurde dabei als „sensorisch akzeptabel“ beschrieben.

Mikrobiologische Probleme, die hohen Energiekosten für die α -Acetolaktattransformation, Verluste bei der Zentrifugation, logistische Herausforderungen sowie die langen Kommissionszeiten von mehr als 2 Wochen führten jedoch letztendlich dazu, dass sich das Konzept langfristig nicht durchsetzte.(74)

Um die negativen Effekte eingeschränkter Nährstoffdiffusionen und dauerhafter Stressungen durch Gradientenbildungen auf die Kulturorganismen zu reduzieren, wurden in den folgenden Jahren vermehrt homogene Wirbelschicht-, Gaslift- und Modul- bzw. Schleifenreaktoren verwendet, die in der Abbildung 5 schematisch dargestellt sind.(56)

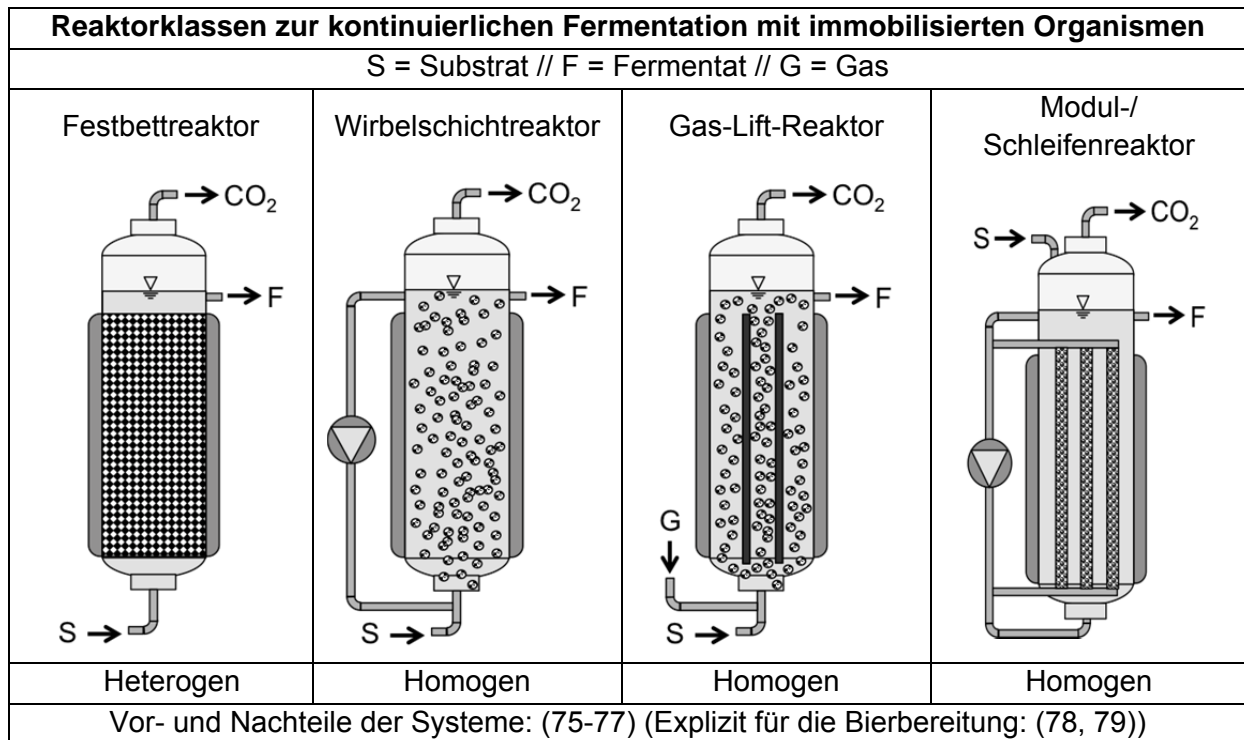


Abb. 5: Reaktorklassen für immobilisierte Organismen nach KRONLÖF

Die *Labatt Brewery* (Kanada) setzte in Kleinversuchen Gasliftreaktoren mit κ -Carrageen als Trägermaterial für die Bierhauptgärung ein und konnte durch eine Regelung der Gaszusammensetzung bei Verweilzeiten von rund 20 Stunden die Hefevermehrung so beeinflussen, dass ein Produkt mit ähnlichem Charakter wie bei Batchgärungen erzeugt werden konnte.(80-82)

Der Anlagenbauer *Meura* stellte hingegen Anfang der 1990er-Jahre ein System namens *Meura Delta* vor, welches essenziell aus 2 kaskadierten Modul-Schleifenreaktoren bestand, die bereits für die Herstellung von alkoholfreiem Bier eingesetzt wurden.(80, 83) Die Temperierung der Fermenter sowie die Belüftung erfolgten jeweils in den Umwälzleitungen.

Bei Verweilzeiten von 22 Stunden und Fermentationstemperaturen von 15 °C resultierten laut Hersteller Biere, die qualitativ denen aus Batchgärungen entsprachen.(84) Bei der industriellen Umsetzung wurde das Anlagenkonzept jedoch aufgrund wirtschaftlicher Vorteile dahingehend modifiziert, dass der 2. Schleifenreaktor durch einen ZKT mit permanenter Zirkulation ersetzt wurde. Der ZKT enthielt somit die gesprossenen Jungzellen aus dem ersten Reaktor mit immobilisierten Organismen.(85)

Obgleich die Handhabung des Systems kontrovers beschrieben wurde,(86, 87) implementierten zumindest die *Aubel Brewery* (Belgien) sowie eine Gasthausbrauerei in Kanada die Technologie temporär.(64, 88)

Weitere industrielle Applikationen auf dem Gebiet der kontinuierlichen Hauptgärungen mit immobilisierten Hefen erfolgten bspw. durch die *Sapporo Brauereigruppe* (Japan) (89-91) und in der *Hartwall Plc's Lahti Brauerei* (Finnland) (10).

Zudem seien die Arbeiten eines internationalen Forscherteams erwähnt, die einen Festbettreaktor so modifizierten, dass eine Temperierung und CO₂-Abscheidung in einer Zirkulationsleitung erfolgten, wodurch sich Verweilzeiten von 20–30 Stunden und Ausstoßleistungen von 0,5 hl qualitativ hochwertiges Bier pro Stunde, bei einem Reaktorvolumen von 10 hl realisieren ließen.(92-94)

Ein besonders erfolgsversprechendes Konzept lieferte jüngst VIRKAJÄRIVI, dem es langfristig gelang, Biere guter Qualität mit Hilfe von trägerfixierten Organismen herzustellen. In seinen Forschungsarbeiten beschrieb er außerdem die Auswirkungen unterschiedlicher Gaszusammensetzungen, Hefestämmen, Kontaminationen und Trägermaterialien auf die Produktqualität bei kontinuierlichen Hauptgärungen mit immobilisierten Kulturen.(52, 59, 60, 95-97) Die hohen Kosten für die Trägermaterialien sowie die damit verbundenen Abhängigkeiten reduzieren jedoch derzeit die wirtschaftlichen Vorteile und somit die Attraktivität der Technologie signifikant.(10)

3.5.2 Nicht trägerfixierte Fermentationsorganismen

Weil die traditionelle, chargenweise Bierbereitung jeher mit freien Zellen erfolgt, wurden kontinuierliche Fermentationsverfahren vorerst ebenfalls ausschließlich für diese Betriebsweise konzipiert.

Obwohl bei der Applikation in der Regel weniger hohe Zelldichten als bei der Immobilisierung erreicht werden, wodurch sich komparativ die Notwendigkeit größerer Reaktoren ergibt, hat auch diese Technologie zahlreiche Vorteile. So können die Organismen bspw. ohne aufwendige Verfahren direkt verwendet und nach einer definierbaren Verweilzeit einfacher entnommen werden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden und Konzepte für die kontinuierliche Bier(haupt)gärung mit freien Zellen. Nachfolgend wird deshalb eine Auswahl an detailliert beschriebenen Apparaturen für derartige Applikationen illustriert, wobei in der Abbildung 6 jeweils 18 Anlagen für eine homogene und in der Abbildung 7 18 Anlagen für eine heterogene Arbeitsweise simplifiziert illustriert werden. Um dabei eine adäquate Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden die teilweise hoch komplexen Anlagen vereinfacht als Fließbilder dargestellt, die auf ihre Funktionalität reduziert sind.

Die grau hinterlegten Bezeichnungen weisen dabei Verfahren aus, die nachweislich im industriellen Maßstab getestet wurden und folgend detailliert beschrieben werden. Außerdem werden Quellen angegeben, in denen die gezeigten Konzepte konkret beschrieben werden.

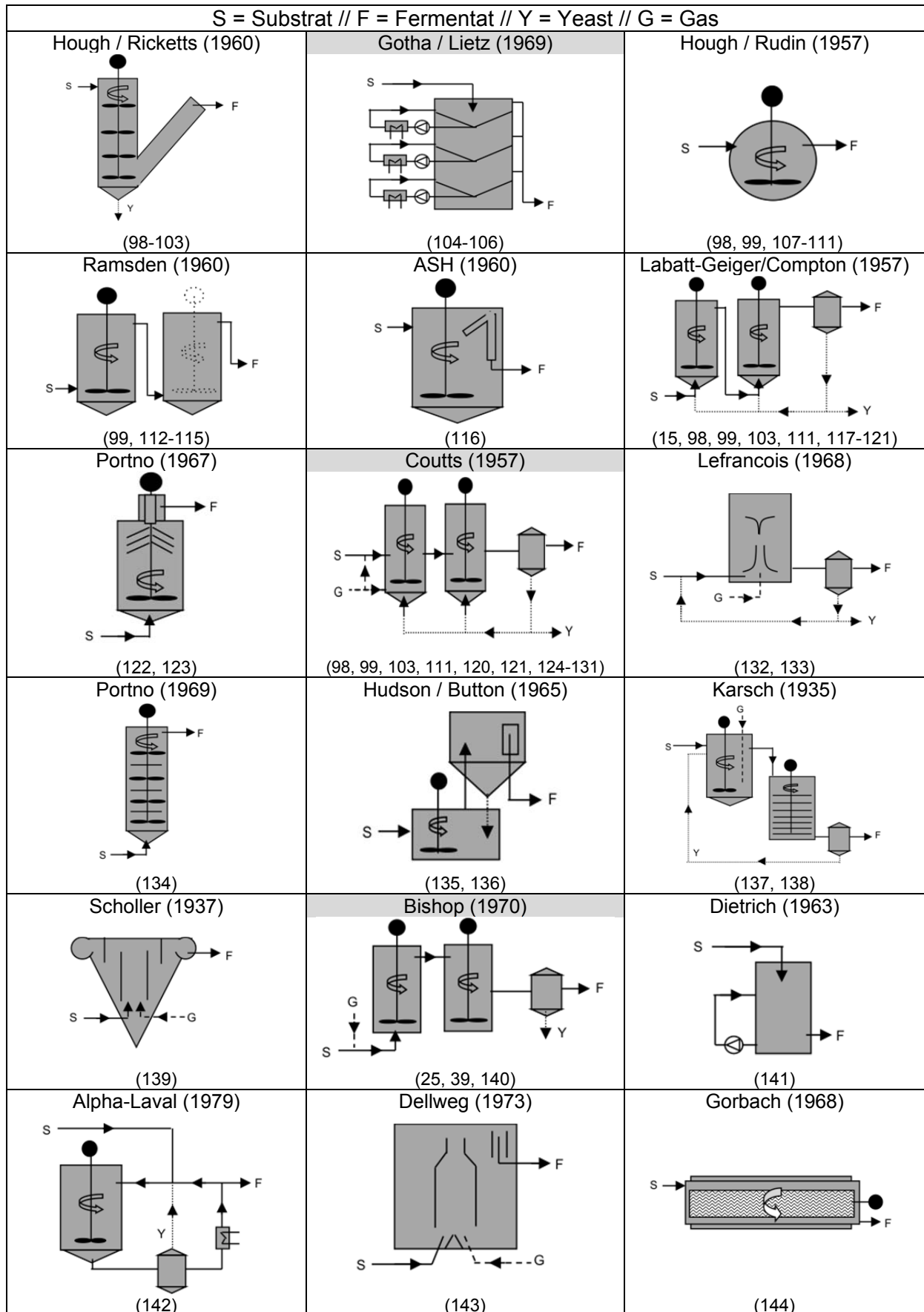


Abb. 6: 18 homogene Systeme zur kontinuierlichen Fermentation mit freien Zellen

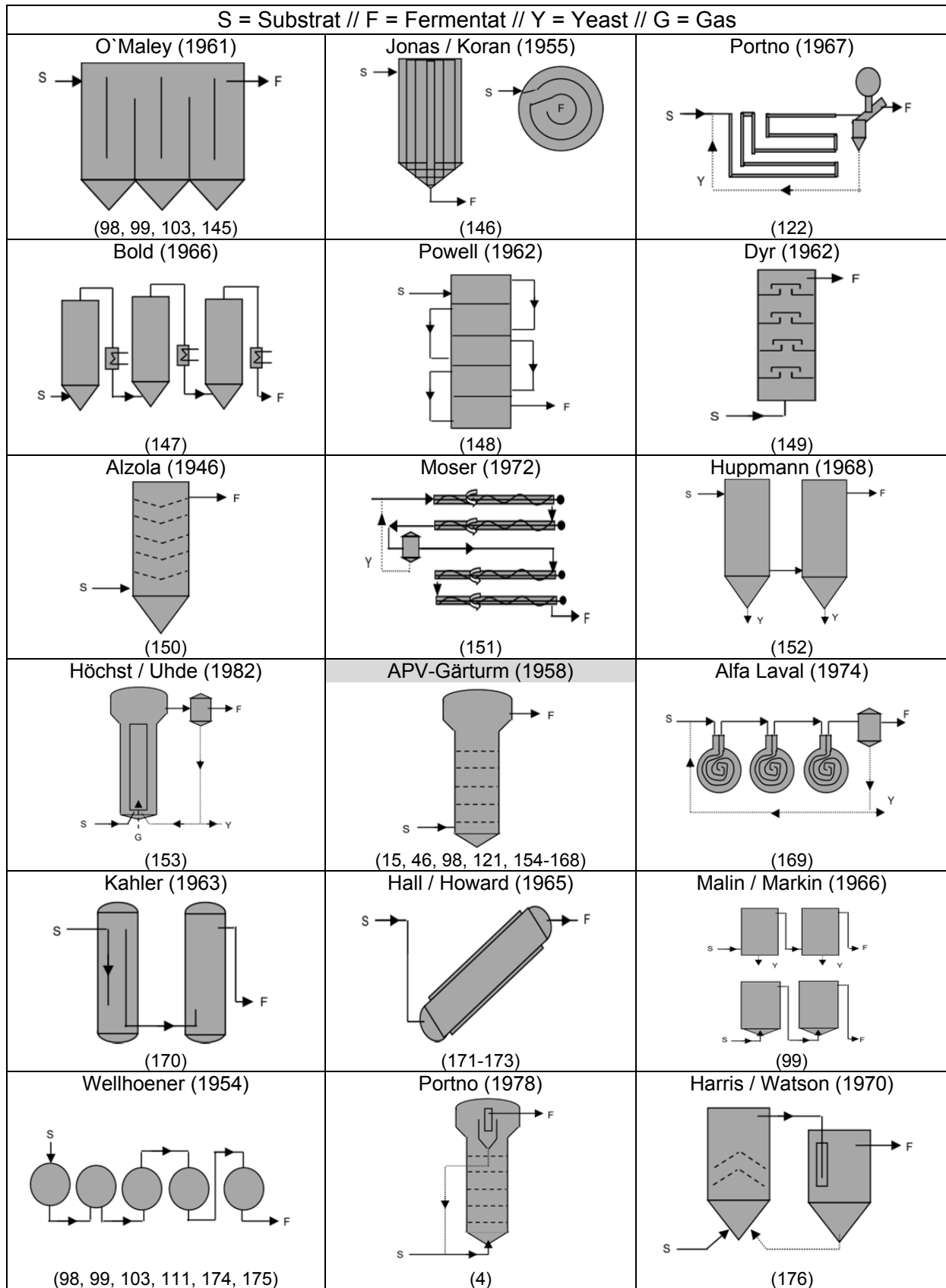


Abb. 7: 18 heterogene Systeme zur kontinuierlichen Fermentation mit freien Zellen

Wie den Darstellungen (Abb. 6, Abb. 7) entnommen werden kann, ähneln sich bestimmte Apparaturen der entsprechenden Klassifizierung und deren Betriebsweise sehr. Außerdem wird ersichtlich, dass viele Anlagen äußerst kompliziert und in der veröffentlichten Konstruktionsweise schwer zu reinigen bzw. nur unter hohem Kapitaleinsatz zu realisieren sind, weshalb die meisten in der Literatur beschriebenen Systeme zur Hauptgärung von Bier bis dato nur theoretisch geschildert oder mit mäßigem Erfolg im Labor getestet wurden.

Lediglich die folgenden Konstruktionen und Verfahren wurden nachweislich mit freien, nicht immobilisierten Organismen in industriellem Maßstab verwirklicht:

3.5.2.1 Das Coutts-Verfahren

Das in den 1950er-Jahren vorgestellte Coutts-Verfahren, welches Schutzrechte in zahlreichen Ländern erhielt (98, 99, 120, 121, 125-127, 129, 131, 177), gilt weltweit als der einzige Prozess zur kontinuierlichen Hauptgärung von Bier, der industriell noch heute vermutlich in 4, nachweislich jedoch in mindestens 2 Brauereien eingesetzt wird.

Ursprünglich wurde der Prozess aus ökonomischen Gründen entwickelt, da Gesetzesreformen in Neuseeland nicht mehr die Versteuerung von produziertem Alkohol, sondern von Bierwürze vorsahen und somit Verluste dringlich reduziert werden mussten. Außerdem wurden simultan die Auflagen und Abgaben für Neubauten im Land erhöht, weshalb nur platzsparende Erweiterungen bzw. Substitutionen effizienzsteigernd waren.

Wie im Fließbild (Abb. 8) dargestellt, sah das ursprüngliche Verfahren eine Substratbehandlung vor, um den Nährstoffgehalt für die Hefe zu erhöhen. Dazu wurde der Hopfen nach der Kochung (K) über einen Dekanter (D) separiert und die Würze auf 0 °C abgekühlt (WT1), bevor eine Kaltlagerung (KL) für 48 Stunden erfolgte. Zur vollständigen Entfernung des Koch- und Kalttrubes (T) wurde anschließend eine Kieselgurfiltration (F) der Würze vorgenommen. Das Filtrat wurde dabei in einem Puffer (SP) zwischengelagert, um einen kontinuierlichen Zustrom in die Gäranlage zu gewährleisten.

Anschließend erfolgte die Erwärmung (WT2) des Substrates auf Gärtemperatur sowie die Belüftung (B) und Inokulation (I), wobei letztere – wie schematisch angedeutet – vorzugsweise in einem als Propagator (P) bezeichneten Behälter vorgenommen wurden.

Der kontinuierliche Gärprozess fand anschließend in Ein- oder Mehrgefäßen statt. Die Reaktoren waren dabei mit Rührwerken ausgestattet, wobei die Fluidführung jeweils etwa auf mittlerer Füllstandshöhe erfolgte. Zudem konnte von unten zusätzlich Hefe (H) dosiert werden.

Diesem System wurden wahlweise ein Absetztank oder Separator (A/S) sowie ein Kohlensäurewäscher (KW) und ein Wärmetauscher (WT3) zum Abkühlen nachgeschaltet.

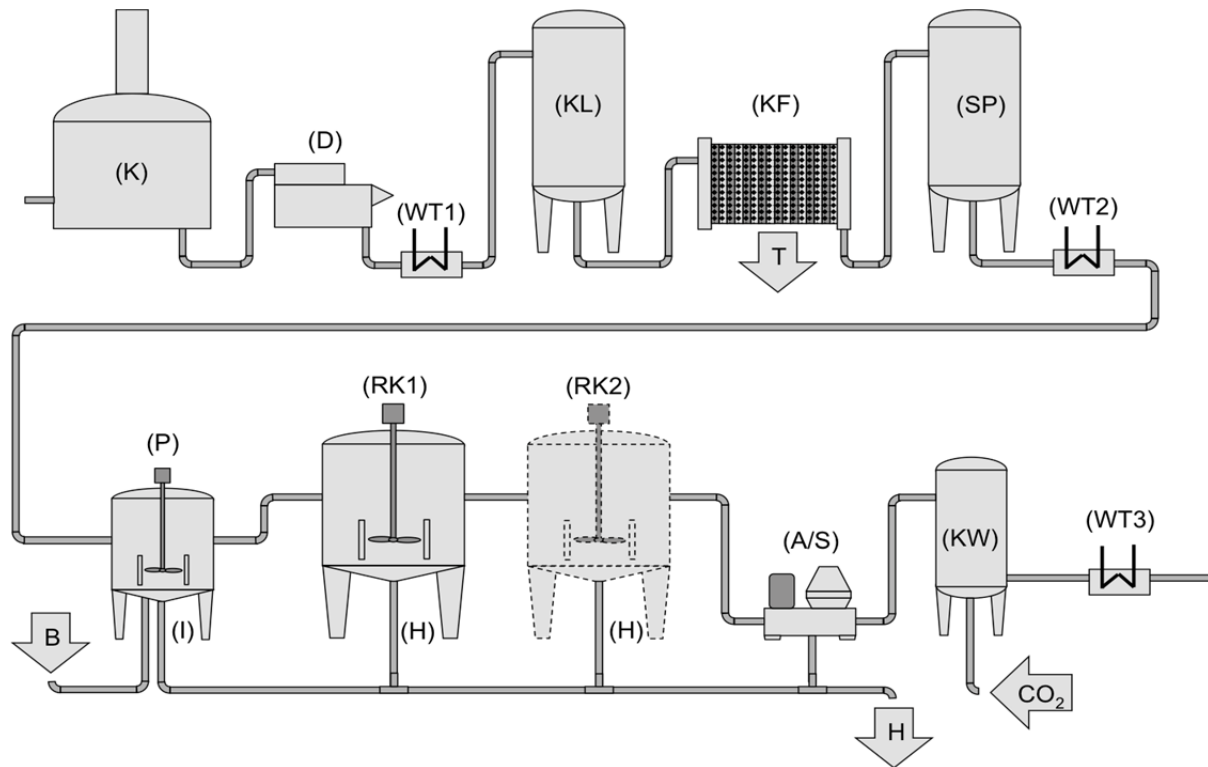


Abb. 8: Kontinuierliche Fermentation: Coutts-Verfahren

Weitere veröffentlichte Prozessparameter inkludieren eine verwendete Anstellhefemenge von etwa 5 l/hl; eine Hefemenge während der Fermentation von 12 bis 100 g/l (20 Gew.-% TRS) bei variablen Gärtemperaturen; einem stündlichen Würzedurchsatz von 1/60 bis 1/10 des Gesambehältervolumens; einem Volumen des Kohlensäurewäschers (KW) von 16-facher Größe, bezogen auf den stündlichen Durchsatz sowie einer anschließenden Lagerungszeit von mindestens 24 Stunden bei 4,5 bis $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (178).

Aus den Prozessbeschreibungen der *Dominion*- sowie der *New Zealand*-Brauereigruppe geht hervor, dass das beschriebene Coutts-Verfahren bereits frühzeitig individuell modifiziert wurde. So wurde dem Propagator (P) in der *New Zealand*-Brauerei nur ein Rührkessel (RK1) von identischem Volumen nachgeschaltet, wohingegen in der *Dominion*-Brauerei mit 2 Reaktoren (RK1 und RK2) gearbeitet wurde, bei denen der vorgeschaltete Behälter (RK1) das 3-fache Volumen des nachgeschalteten Fermenters (RK2) aufwies. Verfahrenstechnisch einheitlich werden hingegen Fermentationstemperaturen in der Praxis von 15–17 $^{\circ}\text{C}$ angegeben, wodurch sich in beiden Brauereien bei Hefekonzentrationen von 20–30 g/l Gesamtherstellungszeiten von 35 Stunden ergaben. Dabei wurden die Anlagen 3 Monate lang ununterbrochen betrieben, bevor jeweils ein 3-tägiger Reinigungs- und Wartungszyklus erfolgte.

Nachweislich wurde das Verfahren zumindest temporär in der *New Zealand Breweries Ltd.* und *Dominion Breweries Ltd.* in Neuseeland sowie in der *Canadian Brewery Ltd.* in Kanada und der *San Miguel Brewery Co.* in Manila/Philippinen getestet.

Nach STEWART wurden in den späten 1950er-Jahren mehr als 90 % des Gesamtbiausstoßes von Neuseeland nach dem Coutts-Verfahren hergestellt. Zudem gibt er an, dass der Prozess auch in Taiwan erprobt wurde.(131)

Laut WACKERBAUER und WARREN war die *Dominion*-Brauerei 1988 die einzige Brauerei weltweit, die ihre Hauptbiersorte kontinuierlich herstellte.

Unbestätigten Quellen nach wurde der Prozess weiter modifiziert und kürzlich in mehreren afrikanischen Brauereien implementiert.

3.5.2.2 Das Fort-Worth-Verfahren

Das Fort-Worth-Verfahren basiert auf einer Modifizierung des Coutts-Verfahrens (121, 179, 180) und wurde 1965 in der *Carling Brewing Company* (Fort Worth, Texas/USA) zur kontinuierlichen Bierhauptgärung eingesetzt.

Wie das Fließbild (Abb. 9) exemplarisch zeigt, wurde hier die belüftete Würze zunächst in einem ungerührten Hefevermehrungstank (P) zudosiert, der durch Umlenkleche in 3 Zonen unterteilt war, um eine angestrebte Verweilzeit zu gewährleisten.

Es folgte die Einleitung in einen Rührkessel (RK1), der ebenfalls durch ein Strömungselement in 2 Teilbereiche untergliedert war und der das doppelte Volumen des nachgeschalteten, ebenfalls gerührten Reaktors (RK2) aufwies.

Die Fermentatklärung wurde in einem zylindrokonischen Sedimentationstank (ST) vorgenommen, aus dem die Hefe abgezogen und in einem weiteren Behälter aufkonzentriert (AK) wurde. Wohingegen die Hefe (H) teilweise rückgeführt wurde, erfolgte eine klassische Kühlung (WT) des Bieres zur Lagerung.

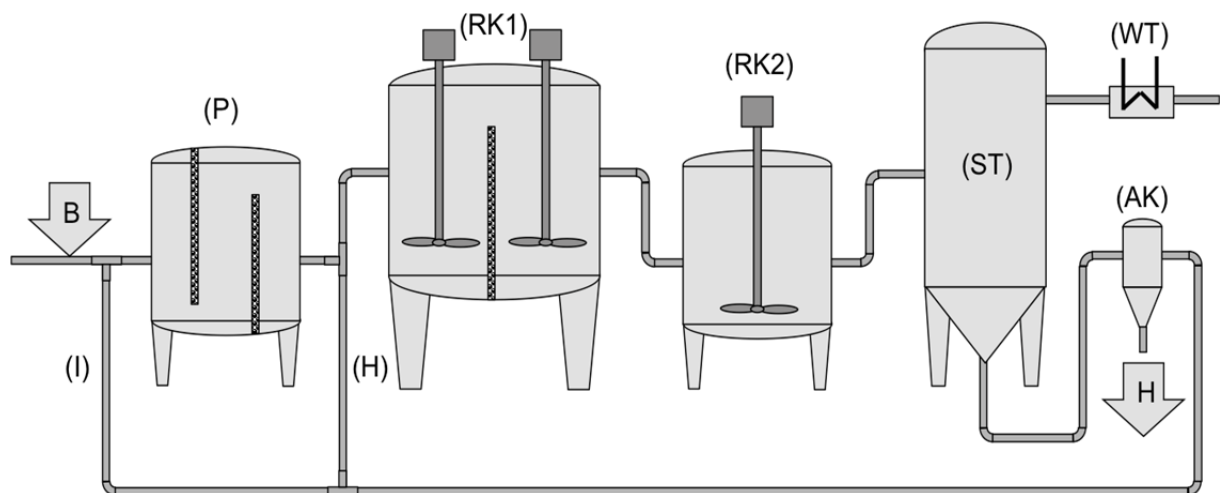


Abb. 9: Kontinuierliche Fermentation: Fort-Worth-Verfahren

In der Praxis erfolgte die Fermentation bei etwa 18 °C und die resultierende Produktqualität wurde als „zufriedenstellend“ beschrieben.(6)

3.5.2.3 Das Watney / Bishop-Verfahren

Wie das Fließbild in der Abbildung 10 schematisch illustriert, wurde die Würze bei diesem, in der englischen Brauereigruppe *Watney Man implementierten* Verfahren auf 2–4 °C abgekühlt (WT1) und filtriert (F), bevor eine Zwischenlagerung (SP) erfolgte. Im Anschluss wurde das Substrat über einen weiteren Wärmetauscher (WT2) auf Gärtemperatur erwärmt und in einem U-Rohr (U) belüftet (B). Im ersten Fermenter (RK1) fand die Hefevermehrung sowie die Hauptgärung unter permanentem Rühren statt. Der Fluidtransfer in den 2. Rührkessel (RK2) und der Abfluss des Bieres in den Absetztank (ST) erfolgten jeweils über die im Niveau versetzten Behälterüberläufe.

Im kühlbaren (KM) Absetztank (ST) sedimentierte die Hefe (H), sodass der geklärte Überstand abgezogen werden konnte. Eine Hefewiederverwendung war nicht vorgesehen. Es folgte eine Kaltlagerung des Jungbieres.

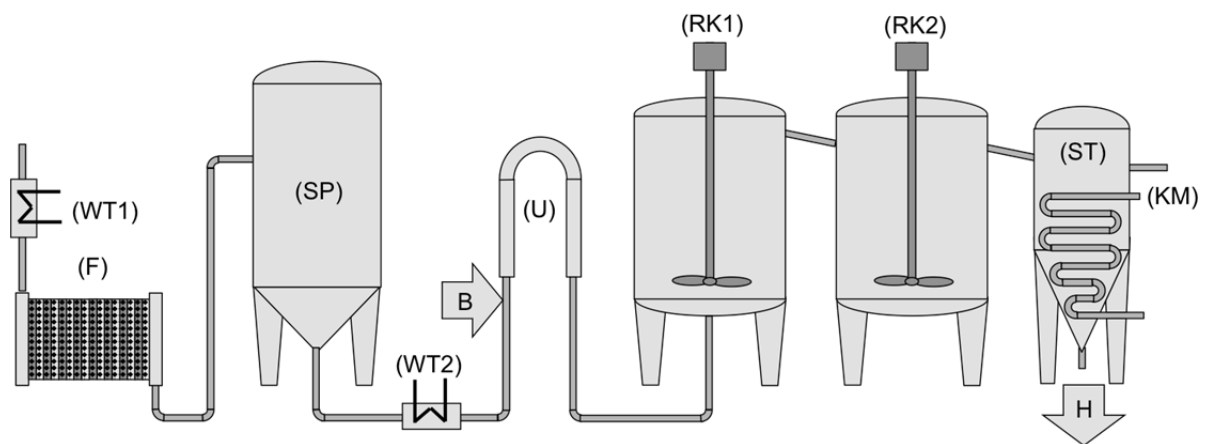


Abb. 10: Kontinuierliche Fermentation: Watney-/Bishop-Verfahren

BISHOP gibt an, dass die Hefekonzentration im 1. Rührkessel idealerweise 15 g/l und im 2. Rührkessel 19 g/l betragen sollte. Dadurch resultierten nach der Sedimentation etwa 1,4 g Hefe/l im geklärten Überstand. Bei entsprechenden Verfahrenseinstellungen sollten so etwa 2/3 des vergärbaren Extraktes im ersten Reaktor abgebaut werden, sodass sich Fermentationszeiten von etwa 15 Stunden bei Durchflussraten von 20–25 hl/h ergaben. (25, 181)

Ogleich der Prozess erfolgreich in diversen Brauereien implementiert wurde und kontinuierliche Laufzeiten von bis zu 12 Monaten angegeben werden, traten insbesondere biologische Probleme auf, die mutmaßlich auch das Durchsetzen von Killerhefen über die Kulturorganismen inkludieren. Daher konnte sich das Verfahren in keiner Brauerei langfristig durchsetzen. (179, 181, 182)

3.5.2.4 Die APV-Turmfermentation

Bei dem in der Abbildung 11 dargestellten Verfahren, welches 1958 durch die *A.P.V. Company Ltd.* in Großbritannien zum Patent angemeldet wurde, (25, 39, 154-159) erfolgte die Zwischenlagerung der vorgeklärten, sterilisierten (KZE) Würze in einem Speichertank (SP). Von dort aus wurde das Substrat in den unteren Teil eines zylindrischen Turmreaktors (TR) geleitet, der so ausgelegt war, dass sich – abhängig von der Fließgeschwindigkeit – eine heterogene Strömung ergab. Die Würzebelüftung (B) erfolgte wahlweise im Substratzustrom oder direkt im unteren Teil des Fermenters (TR). Weil dieser mit einer stark flokkulierenden Bruchhefe befüllt war, bildete sich ein Hefe-, Substrat-, Temperatur- und Produktgradient in Fließrichtung aus. Perforierte Leitbleche (LB) im Reaktorinnenraum sollten für eine Gewährleistung der angestrebten Strömungsvorgänge Sorge tragen und die sich nach unten hin verdichtende Biomassekonzentration lokal binden. Die Erweiterung (E) des oberen Fermentationsbereiches bewirkte eine Reduzierung der Fließgeschwindigkeit, sodass Sedimentationsvorgänge begünstigt wurden. Das vorgeklärte Bier wurde anschließend abgekühlt (WT2), optional die enthaltene Hefe (H) separiert (S) und das Produkt in einem Sammel tank (SP) zwischengelagert.

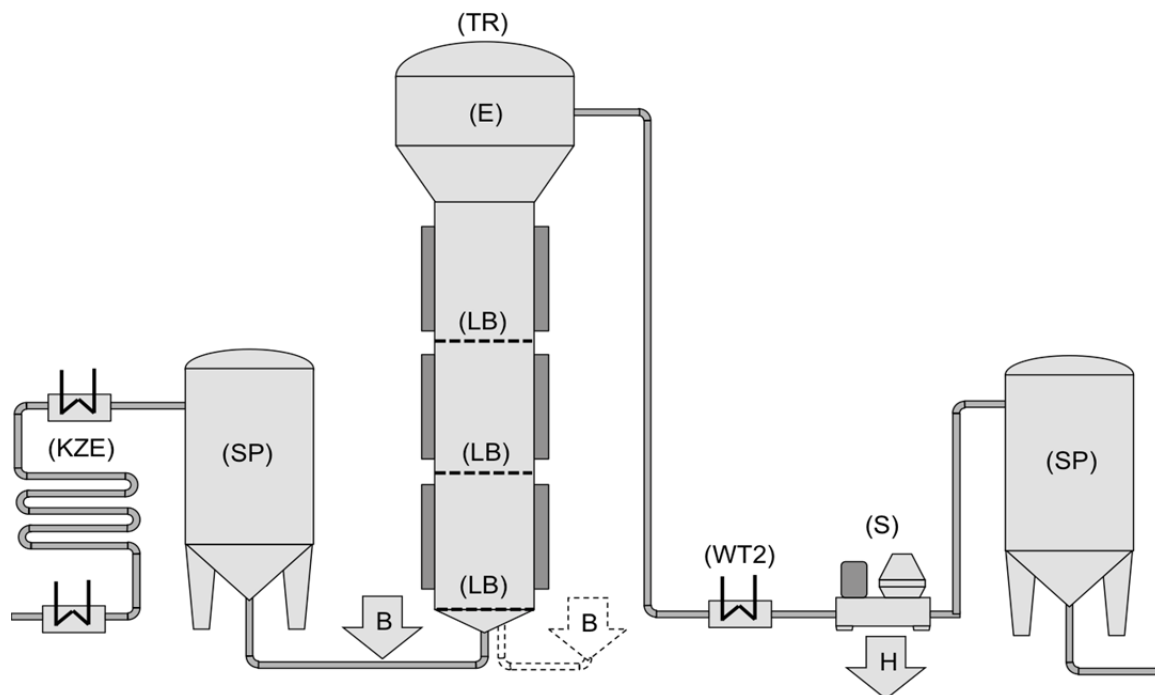


Abb. 11: Kontinuierliche Fermentation: APV Gärturm

Basierend auf den Erkenntnissen aus Pilotversuchen wurden die Fermenter – unabhängig von ihrer Ausstoßleistung und somit ihrem Reaktorvolumen – in einem Höhen- zu Durchmesser Verhältnis von 1:7 gefertigt.

In der Praxis dauerte es etwa 3 Wochen lang bis sich ein stabiles Gleichgewicht (*Steady-state-Zustand*) innerhalb der Reaktoren eingestellt wurde. Sobald dieser Zustand erreicht wurde, betrug die Hefekonzentration an der Zylinderbasis etwa 250 bis 300 g Hefezentrifugat/l und nahm bis zur Zylinderspitze auf 30–60 g Hefezentrifugat/l ab. Das geklärte Jungbier, das aus der Erweiterung (E) abfloss, enthielt etwa 10 g Hefezentrifugat/l. Je nach Anlagendesign und ausgewählten Prozessparametern erfolgte die Fermentation innerhalb von 4–8 Stunden, sodass eine mittlere Verweilzeit der Hefe von etwa 200–400 Stunden resultierte. Die

Fermentationstemperatur am Reaktoreinlauf wurde auf etwa 15 °C eingestellt und betrug am Auslauf etwa 20–24 °C.(15, 46, 167, 168, 183)

Der Prozess wurde nachweislich temporär in England in der *Brewery Burton-upon-Trent*, in der *Cape Hill Brewery*, in der Brauerei von *Runcon* und *Warrington*, in der spanischen Brauerei *Cervecera del Norte* und in der *Oranjeboom-Brauerei* in Rotterdam/Niederlande implementiert.

3.5.2.5 Das Gotha-Gärverfahren

Die *Gotha*-Fermentationsanlage, die kurz nach der Inbetriebnahme stillgelegt wurde, basierte vermutlich auf einem Patent von LIETZ et al. (105) und wurde 1973 in der Brauerei *Gotha* (VEB Braukombinat Erfurt/DDR) in Betrieb genommen.(104-106)

Das System bestand aus 3 je 22 Meter hohen Reaktoren mit 8 Meter Durchmesser (R1–R3), die wiederum in 5 übereinanderliegende Segmente gegliedert waren. Wie vereinfacht in der Abbildung 12 dargestellt, wurden 8 dieser Kammern für die Hauptgärung (HG), 2 für die Reifung (RE) und 2 bis 5 für die Unfiltratpufferung (UF) vorgesehen.

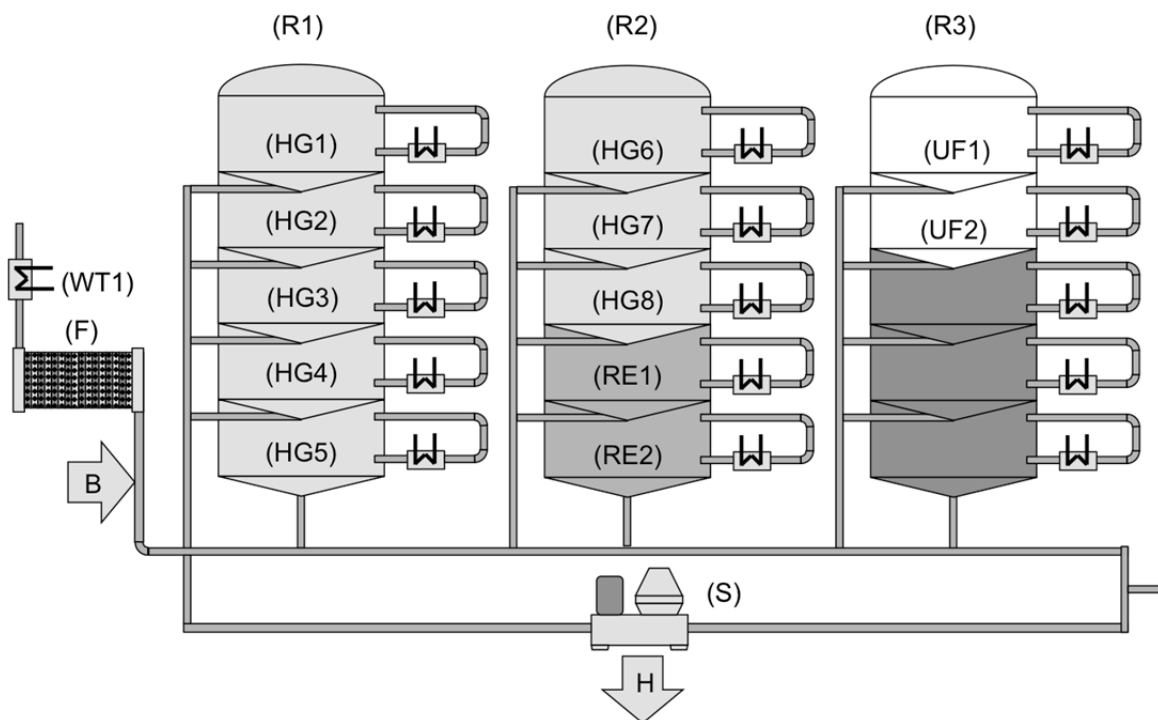


Abb. 12: Kontinuierliche Fermentation: Gotha-Verfahren

Das gekühlte (WT1), filtrierte (F) und belüftete (B) Substrat wurde in die kaskadierten Gärkammern eingeleitet, in denen eine individuelle Zwangsumwälzung und Temperierung vorgenommen wurde. Dabei wurde der Inhalt jedes Segmentes einmal pro Stunde vollständig umgewälzt und innerhalb von 24 Stunden in einen folgenden Reaktorteilabschnitt transferiert. Weil die Gärung bei einem Überdruck von etwa 1,5 bar erfolgte und die Fermentationstemperatur lediglich etwa 10 °C betrug, dauerte die Hauptgärung ca. 6 Tage. Dadurch ergab sich eine mittlere Verweilzeit von etwa 20 Stunden pro Segment.

Nach der Hauptgärung wurde das Unfiltrat über einen Separator (S) vorgeklärt und zur Reifung bei etwa 0 °C für mindestens einen Tag gelagert.(104)

3.6 Grundlagen der Fermentationstechnologie

Die Hefe beeinflusst maßgeblich den Produktcharakter. Fundierte Kenntnisse über die Organismen sind somit ein Schlüssel zum erfolgreichen Betrieb kontinuierlicher Reaktoren.

3.6.1 Klassische Stressbedingungen für Brauereihefen

Üblicherweise ist Brauereihefe in stationären Fermentationen zyklischen Stressbedingungen ausgesetzt, die in der Abbildung 13 illustriert werden.(184)

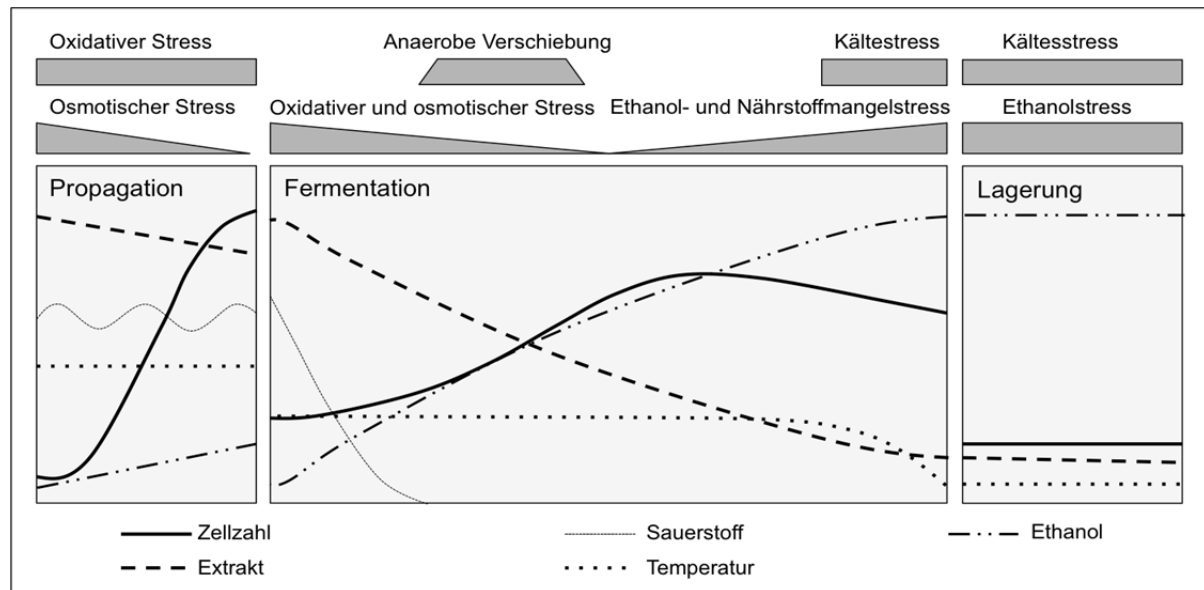


Abb. 13: Modifiziertes Diagramm zur Hefestressung nach GIBSON

Nach 4–6 Wiederverwendungen werden Lagerbierhefepopulationen in der Regel verworfen, weil mit steigender Anzahl der Führungen die Gefahr zunimmt, dass sich die Kulturen unerwünscht verändern und/oder sich Kontaminationen durchsetzen. Handelsübliche Stämme, die teilweise schon mehr als ein Jahrhundert lang industriell genutzt werden, haben ihren Metabolismus an die dargestellten Gegebenheiten angepasst und bilden dabei ihre charakteristischen Fermentationseigenschaften aus.

Obleich die zyklische Organismensubstitution bei der chargenweisen Prozessführung dem Stand der Technik entspricht, wurde und wird sie oftmals in herkömmlichen kontinuierlichen Fermentationsverfahren nicht- oder nur unzureichend beachtet,(185) um Verluste zu reduzieren und dadurch weitere Effizienzsteigerungen zu gewährleisten. So existieren eine Vielzahl an Verfahren und Vorrichtungen, die explizit darauf ausgelegt sind, dass die Kulturorganismen möglichst lange in den Systemen verweilen. Versuche im Labor- sowie im industriellen Maßstab mit freien und mit immobilisierten Zellen ergaben jedoch, dass diese Arbeitsweise häufig zu einer zeitlichen Varianz der Populationscharakteristik und Produktqualität führt (vgl. Kapitel 5.3.3, S. 73 ff.).

Aus diesem Grund wurde bei der Prozess- und Verfahrensentwicklung der in dieser Arbeit zugrunde gelegten Vorrichtung darauf geachtet, dass die sedimentierten Mikroorganismen abgezogen, wahlweise klassisch behandelt (z. B. entgast, gekühlt, gewaschen und/oder mit Säure behandelt) und gezielt – vorzugsweise begrenzt häufig – wiederverwendet werden können.

3.6.2 Auswirkungen technologischer Stellglieder auf die Fermentation

Durch Standardisierung der Versuchsbedingungen (siehe Kapitel 5) wurden Einflüsse wie Substratzusammensetzung, Hefestamm, Vitalität, Viabilität und weitere Populationscharakteristika in Batchfermentationen möglichst konstant gehalten, sodass die Auswirkungen variierender Anstellzellzahlen, Fermentationstemperaturen, Belüftungsraten und Spundungsdrücke experimentell ermittelt und mathematisch approximiert werden konnten, um anschließend den kontinuierlichen Betrieb sowie das Reaktordesign besser planen und beurteilen zu können.

Nachfolgend werden die allgemein bekannten Grundlagen dieser Einflussgrößen sowie Besonderheiten kontinuierlicher Verfahrensweisen beschrieben.

3.6.2.1 Variationen der Biomassegehalte

Die Hefegabemenge sollte individuell auf die eingestellten Prozessparameter abgestimmt werden. Bei der konventionellen chargenweisen Biergärung werden untergärige Vollbierwürzen üblicherweise mit 10–30 Mio. HZ/ml angestellt, wohingegen obergärige Sorten mit 8–15 Mio. HZ/ml inokuliert werden.

Diese Konzentrationen ergeben sich klassisch, insbesondere durch die angestrebten Fermentationsgeschwindigkeiten, die Gärtemperaturen, die Vermehrungsraten der Organismen, die zur Verfügung stehende Biomasse, die maximal möglichen Abkühlraten, dem Absetzverhalten der Hefen und teilweise aufgrund traditioneller Betriebsphilosophien.

Bekanntermaßen kann die Angär- und Fermentationsgeschwindigkeit durch eine Erhöhung der Biomasse- und somit Enzymkonzentration im System weiter gesteigert werden.(186) Bei konstanten Bedingungen ist die Beschleunigungsrate dabei laut Literatur zunächst proportional zur Konzentrationserhöhung,(187) nimmt jedoch mit zunehmendem Organismengehalt ab, bis ein Maximalwert annähernd erreicht wird (188).

Eine Steigerung der Anstellkonzentration bewirkt simultan eine Reduzierung der Hefevermehrung (189) und eine Lag-Zeit-Verkürzung.

Obwohl zahlreiche Reaktionsprodukte bei der Fermentation an das Zellwachstum gekoppelt sind, werden die sensorischen und organoleptischen Auswirkungen einer Biomasseerhöhung – bei sonst statischen Bedingungen – allgemein als vergleichsweise geringfügig beschrieben.(190, 191) Somit scheint die Erhöhung üblicher Organismenkonzentrationen eine attraktive Möglichkeit zu sein, um Effizienzsteigerungen bei Gärungen – auch unter Beachtung qualitativer Aspekte – mit geringem Aufwand zu realisieren.

Insbesondere im diskontinuierlichen Modus werden durch derartige Maßnahmen extrem hohe Produktivitäten erreicht, da sich erst gegen Ende der Fermentation Milieubedingungen einstellen, aus denen eine Produktinhibierung resultiert.

Im Gegensatz zu kontinuierlich arbeitenden Fermentationsanlagen, in denen diese Anforderung in der Regel bei der konstruktiven Gestaltung berücksichtigt wird, lässt sich eine Steigerung der Biomasse im klassischen Batchverfahren technologisch jedoch nur begrenzt sinnvoll realisieren. Dies liegt unter anderem daran, dass eine signifikante Prozessbeschleunigung eine adäquate Steuer- Mess- und Regeltechnik unabdingbar macht. So muss bspw. bei einer stark erhöhten Biomassekonzentration eine entsprechend schnellere

Abkühlung erfolgen können, um die potenziell verstärkten Effekte einer Hefeautolyse auszuschließen. Die derzeit eingesetzten großvolumigen Reaktoren (ZKTs) sind für derartige Anforderungen in der Regel nicht ausgelegt. Die verhältnismäßig langen Befüll-, Entleer- und Reinigungszeiten (sogenannte Rüstzeiten) reduzieren zudem die Effizienz bei Fermentationsbeschleunigungen im Batchmodus. Außerdem erhöht sich komparativ der Aufwand für die Kulturzucht und Pflege bei chargenweisem Betrieb mit hohen Zelldichten.

Systemunabhängig muss beachtet werden, dass Filtrationsprobleme, die bspw. aufgrund höherer Biomassekonzentrationen im Unfiltrat resultieren, die angestrebte Steigerung der Wirtschaftlichkeit reduzieren.

Die in der Literatur publizierten Angaben zu den bisher eingesetzten Biomassekonzentrationen für kontinuierliche Bier(haupt)gärungen konnten für diese Abhandlung nur eingeschränkt herangezogen werden, weil deren Auswertung aufgrund unterschiedlicher Maßangaben erschwert wird. So wurden überwiegend Mengenangaben in Gewicht/Gewicht, Gewicht/Volumen, Volumen/Gewicht und Volumen/Volumen, anstelle von Zellzahlen veröffentlicht, sodass sich diese nur grob abschätzen lassen. Außerdem wird oftmals nicht angegeben, mit welchen Hefestämmen gearbeitet wurde. Prinzipiell kann jedoch festgestellt werden, dass die Biomassekonzentrationen für kontinuierliche Prozesse komparativ deutlich höher sind (etwa 2–10-mal höher) als bei Batchgärungen.

Um den Einfluss der Zellzahlen auf die Fermentationsverläufe besser abschätzen zu können, erfolgten in Kapitel 5.2, S 52 ff. Versuche mit Anstellkonzentrationen von 10, 30, 50, und 100 Mio. HZ/ml.

3.6.2.2 Variationen der Gärtemperaturen

Der biokinetische Temperaturbereich für das Hefewachstum und die Reproduktion liegt zwischen 0 und 45 °C und variiert geringfügig stammabhängig.(6)

Wie alle biochemischen Prozesse sind auch Assimilationen, Gärungen und Reifungen stark temperaturabhängig. So bewirkt eine Erwärmung allgemein eine Wachstums-, Vermehrungs- und Stoffwechsellkatalyse. Diese wiederum resultieren bei sonst konstanten Bedingungen in Fermentationsbeschleunigungen, stärkeren Turbulenzen und Konvektionen in den Reaktoren, erhöhten Biomasse- und reduzierten Stickstoffgehalten, einer vermehrten Bildung von höheren Alkoholen und Estern, einem amplifiziertem Diketon- Auf und Abbau, einem rascheren und tieferen pH-Wert-Sturz, einer verstärkten Eiweißausscheidung sowie einer geringeren H₂S-Konzentration im Produkt.

Simultan werden jedoch höhere DMS-Gehalte, erhöhte Extrakt- und Bitterstoffverluste, ein Anstieg der Schaumdecke während der Gärung, eine Verringerung der Schaumhaltbarkeit, eine Zunahme von Alterungsindikatoren (192) eine sensorisch ungünstige Verschiebung des Verhältnis von Alkoholen zu Estern (leerere, weniger aromatische Biere) sowie einer Verringerung von flüchtigen Säuren, bei kongruenter Erhöhung von fixen Säuren beschrieben.(193)

Technologisch wird daher bei Temperaturerhöhungen oftmals auch der Spunddruck im System erhöht, um derartige Effekte zu reduzieren/kompensieren und die Gärungsteuerung zu erleichtern (siehe Kapitel 3.6.2.4, S. 25).

Klassischerweise erfolgt die untergärige Hauptbierfermentation bei Temperaturen von 10–12 °C,(194) wohingegen obergärige Biere zwischen 18–22 °C vergoren werden. Bei beschleunigten- und kontinuierlichen Fermentationen werden allerdings meist deutlich wärmere Temperaturen angestrebt: etwa 15–25 °C für Lagerbiere und 20–28 °C für obergärige Biertypen. Weil die Gesetzmäßigkeiten von Temperaturerhöhungen in der Literatur teilweise widersprüchlich sind und einige Autoren schildern, dass sich Erwärmungen bei kalten Temperaturen stärker auswirken,(187) wohingegen andere Autoren lineare Aktivitätssteigerungen in Temperaturbereichen von 6–30 °C schildern,(109) wurden hierzu in Kapitel 5.2 komparative Experimente mit 10, 15 und 20 °C durchgeführt.

Die Recherche zu kontinuierlichen Fermentationsprozessen ergab, dass einige Systeme isotherm (99) einige mit stufenweisen Temperaturabsenkungen (113, 176, 195, 196) und einige mit Temperaturerhöhungen (46, 67, 68) betrieben wurden.

3.6.2.3 Variationen der Belüftungsraten

Bekanntermaßen fungiert gelöster Sauerstoff im Substrat als limitierender Wachstumsfaktor für Hefen, da die benötigten Fettsäuren zum Aufbau der Plasmamembran nur in dessen Anwesenheit synthetisiert werden können.(197, 198) Außerdem wirkt sich Sauerstoff regulierend auf die Funktion des Hefegenoms aus.(199)

Bei klassischen diskontinuierlichen Fermentationen sollten zwischen 5–10, idealerweise zwischen 6–8 mg O₂/Liter Würze gelöst sein.(200) Dies wird normalerweise – je nach Belüftungssystem – durch die Einleitung von 3–10 Liter Sterilluft/hl erreicht.(193) Nach SCHÖNENBERG ist die Sauerstoffaufnahme dabei vom physiologischen Zustand der Hefe abhängig und beträgt durchschnittlich 13 mg O₂/(g HTS*h) in komplexen Medien wie Vollbierwürze bei 15–16 °C.(199)

Als Auswirkungen einer zunehmenden Würzebelüftung (zwischen 4–9 mg O₂/l Würze bei sonst konstanten Parametern) gelten:(201) eine erhöhte Vermehrungsrate, eine erhöhte Gärgeschwindigkeit (bei einer Steigerung um 1 mg/l im genannten Bereich um je etwa 4–5 % (202)), eine Reduzierung des Stickstoffgehalts im Fertigprodukt,(203) eine raschere pH-Wert-Absenkung, eine verstärkte Bildung der Jungbierbukettstoffe Ethanal und 2-Acetolaktat, eine verstärkte Bildung von Bukettstoffen sowie eine verringerte Bildung von Schwefelwasserstoff, freien und niedrigen Fettsäuren sowie SO₂ (204, 205)

Weil die Sauerstoffkonzentration Einfluss auf die Oxidation von Acetoin und die Hefevitalität nimmt, führen eine langfristige Unterversorgung und/oder erhöhte Gehalte während der Fermentation zu erhöhten Diketongehalten im Bier.(206)

Die Signifikanz des Einflusses der Belüftungsrate hinsichtlich der Esterbildung und der Bildung höherer Alkohole wird hingegen kontrovers beschrieben. Wohingegen viele Autoren beschreiben, dass eine Intensivierung der Belüftungsraten eine deutlich verringerte Esterbildung zur Folge hat und zu mehr höheren Alkoholen im Fertigprodukt führt,(160, 203, 207, 208) beschreibt THIELE diese Auswirkungen als eher marginal.(205)

Bei beschleunigten und kontinuierlichen Fermentationen, bei denen oft hohe Hefekonzentrationen eingesetzt werden, wird die Belüftungsrate meist stark reduziert, um Verluste durch die Bildung von Biomasse zu verringern.(122, 209) Außerdem bewirkt die Reduzierung des Sauerstoffgehaltes in der Würze eine zügigere Angärung, da der Metabolismus beschleunigt zur alkoholischen Gärung übergeht.

Ein Sauerstoffmangel macht sich dabei laut Literatur kaum in den ersten Führungen bemerkbar,(199, 210) kann jedoch rasch zu einer vorzeitigen, unvollständigen Flokkulation führen.(211) Langfristig wird bei einem Sauerstoffmangel neben der Zellteilung auch die genetische Expression bestimmter Enzyme und die Vitalität der Population verändert, wodurch sich das Geschmacks- und Aromaprofil des Fertigproduktes zunehmend verändern kann.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten – wie in Kapitel 5.2 dargestellt – Basisexperimente im Batchmodus, um zu ermitteln, ob und inwiefern sich unterschiedliche Belüftungsraten im Kleinmaßstab auswirken. Anhand dieser Erkenntnisse sollte anschließend entschieden werden, wie eine Belüftung im kontinuierlichen Betrieb realisiert werden sollte.

3.6.2.4 Variationen der Gärdrücke

Physikalisch betrachtet ist CO₂ leicht in wässrigen Medien löslich, wobei der Gehalt an gelöstem CO₂ bei konstanten Spunddrücken von der Fermentationstemperatur, der Größe und Geometrie der Reaktoren, den Umwälzraten sowie dem pH-Wert des Mediums (212, 213) und der Menge an bereits gelösten Stoffen in der Flüssigkeit abhängig ist (214).

Dass erhöhte Spunddrücke während der Fermentation die Gärgeschwindigkeit und die Hefevermehrung reduzieren, wurde bereits vor dem 19. Jahrhundert beschrieben.(215-218) Dabei beeinflusst der CO₂-Partialdruck im Medium die Stoffwechselaktivitäten deutlich mehr als der physikalische Druck.(219-221)

Neben einer Reduzierung der Reproduktionsraten und Fermentationsgeschwindigkeiten, die hauptsächlich durch eine Veränderung der unpolaren Fettsäureacylenden der Zellmembran resultieren, welche die Permeasenaktivität hemmt, wodurch der Stofftransfer; insbesondere die Aufnahme von α -Aminostickstoff reduziert wird (214, 215, 222-224), bewirkt ein erhöhter Spundungsdruck:

- einen verlangsamten pH-Wert-Sturz
- eine Verringerung der Esterbildung aufgrund der Inhibierung von Pyruvatdecarboxylasen, wodurch weniger Acetyl-CoA zur Verfügung steht, welches mit Alkoholen zu Acetatestern weiterreagiert (220, 225)
- eine verringerte Bildung von Gärungsnebenprodukten, insbesondere die von höheren Alkoholen, da weniger α -Aminostickstoff für den Ehrlich-Abbau zur Verfügung steht (226), mit Ausnahme von 2-Phenylethanol, dessen Gehalt um das 2–3-Fache erhöht wird (198),
- aufgrund der reduzierten Biomassebildung geringere Diketongehalte während der Gärung, jedoch erhöhte Diketonmengen im Fertigprodukt (226-228)
- eine Reduzierung des Glycogengehalts der Erntehefe (224)
- erhöhte Acetaldehydgehalte
- eine Verringerung der Turbulenzen und Reduzierung der Schaumdeckenhöhe während der Fermentation.(201)

Der Gärungsüberdruck wirkt sich dabei stammspezifisch unterschiedlich stark aus und kann bei erhöhter Stressung außerdem zu einer verstärkten Ausscheidung von Fettsäuren und basischen Aminosäuren führen. Des Weiteren kann ein hefiger und hefebitterer Produktgeschmack resultieren.(193) Aus diesem Grund ist eine frühzeitige Hefeernte und sachgemäße Erntehefebehandlung bei derartigen Prozessführungen besonders empfehlenswert.(192)

Der Zeitpunkt, wann die Druckerhöhung erfolgt, spielt dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle.(229) Wenn ein erhöhter Druck vor der Sprossung eingestellt wird, verdoppelt sich die DNA zwar und die Zelle wächst,(230) jedoch verzögert sich der Sprossbeginn (219). Wird der Überdruck hingegen erst während der eingetretenen Sprossbildung erhöht, so findet diese unverändert statt.(198)

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass sich ein CO₂-Partialdruck von bis zu 0,2 bar_ü sogar stimulierend auf das Zellwachstum auswirken kann, 0,3–0,5 bar_ü inhibitiv wirkt und ab ca. 2,5 bar_ü die Zellteilung – nicht die Fermentation – fast vollständig unterdrückt wird.(227)

Weil die beschriebenen Auswirkungen von Druckgärungen partiell komplementär zu denen von Temperaturerhöhungen sind (vgl. Kapitel 3.6.2.2, S. 23 ff.), werden in der Praxis meist beide simultan zu gegenseitiger Kompensation implementiert.(223, 227, 231)

Die Literaturrecherche für Schnellgär- und kontinuierliche Fermentationsverfahren ergab, dass bei warmen Prozessführungen (16–20 °C) häufig konstante Spundungsdrücke zu Gärbeginn von bis zu 2 bar eingestellt wurden, um einer übermäßigen Biomasse- und Gärungsnebenproduktbildung entgegen zu wirken.(219, 229, 232-236) Zudem werden Verfahren beschrieben, bei denen fallende Druckgradienten implementiert werden.(174, 237, 238) Bei diesen Verfahren wird eine Kohlensäureentbindung angestrebt, die eine Wäsche des Fluides bewirkt und somit einer beschleunigten Reifung dient.

Nur in Sonderfällen erfolgte eine Druckerhöhung bei kontinuierlichem Betrieb über die Fermentationszeit bzw. die Reaktionsstrecke.(104)

4 ALTERNATIVES VERFAHRENSKONZEPT

Weil die bestehenden Verfahren zur kontinuierlichen Bierhauptgärung entweder nicht wirtschaftlich realisierbar waren und/oder die resultierenden Produktqualitäten nicht den Anforderungen der Produzenten und Konsumenten entsprachen, wurde im Rahmen dieser Abhandlung ein alternatives Verfahren entworfen, welches in diesem Kapitel vorgestellt wird.

4.1 Beurteilung des Standes der Technik

Bevor ein Anlagen- und Betriebskonzept zur kontinuierlichen Bierhauptgärung ausgearbeitet werden konnte, musste entschieden werden, ob eine Fixierung der Mikroorganismen erfolgen sollte.

Obwohl der Einsatz immobilisierter Fermentationskulturen Vorteile gegenüber der herkömmlichen Verwendung von freien Zellen bieten kann, und sich – wie in Kapitel 3.5.1, S. 9 ff. beschrieben – mittlerweile laut Literatur kontinuierlich Biere im Labormaßstab in akzeptabler Qualität mit dieser Technologie herstellen lassen, wurde sich in dieser Arbeit gegen die Implementierung derartiger Prozesse entschieden.

Dies lässt sich wie folgt begründen:

- Derzeit sind die verwendeten Trägermaterialien sehr teuer und reduzieren die Wirtschaftlichkeit der Verfahren.(10, 59) Außerdem wird die Attraktivität der Prozesse durch die Abhängigkeiten zu Lieferanten von Verbrauchsmaterialien stark reduziert.
- Weil sich sowohl die Trägermaterialien als auch die Art der Fixierung stamm-spezifisch auf den Produktcharakter auswirken,(60) erschweren zusätzliche Variablen die Allgemeingültigkeit von experimentell ermittelten Gesetzmäßigkeiten.
- Im Vergleich zu der Verwendung freier Zellen besteht bei fixierten Kulturen eine erhöhte Gefahr, dass sich Kontaminationen festsetzen und nicht aus dem System ausgespült werden können.
Wohingegen der Alkoholgehalt, das reduzierte Nährstoffangebot und der geringe pH-Wert bei der Reifung/Lagerung eine verbesserte Infektionssicherheit bieten, ist diese bei der (Bier)Hauptgärung nicht gegeben.(239, 240)
- Das Herunterfahren der Aggregate kann – abhängig vom Anlagenvolumen und verwendetem Trägermaterial – zu höheren Produktverlusten führen.
- Das Anfahren der Anlagen (Immobilisierung) kann sehr aufwendig sein und einen hohen Zeitaufwand bis zum Erreichen eines hygienegerechten und stabilen Gleichgewichtszustands (*Steady-state-Zustand*) bedingen.(241)
- Die erhöhte Dichte in den Reaktoren steigert vergleichsweise den benötigten Energieaufwand zum Durchströmen der Reaktoren; außerdem resultieren höhere Druckverluste.
- Das Binden der Zellen verlängert unter Umständen die individuelle Verweilzeit der Organismen und verändert somit die Populationsdynamik im System. So besteht das Risiko, dass junge Sprossen vermehrt ausgewaschen werden und die gebundenen Zellen im System altern. Dies wiederum kann potenziell dazu führen, dass Adaptationen im Metabolismus resultieren und die Viabilität der Kultur abnimmt, wodurch sich der Produktcharakter über die Zeit verändert.

- Trotz der immer weiter verbesserten Anlagenkonfigurationen besteht vergleichsweise ein erhöhtes Risiko, dass Verblockungen und Inhomogenitäten den Prozess negativ beeinflussen.
- Auch bei Verwendung dieser Technologie sollte stets ein Gärungsgefälle angestrebt werden. Somit empfiehlt es sich, alternativ einzelne heterogene Festbettreaktoren einzusetzen oder mehrere in Reihe geschaltete, homogene Systeme zu verwenden. Bei der Wahl von Festbettreaktoren gilt es zu beachten, dass Gradienten, z. B. von Wuchs- und Nährstoffen sowie von Stoffwechselprodukten, die Mikroorganismen dauerhaft ungewünscht beeinflussen können; wohingegen multiple, kaskadierte Anlagen die Wirtschaftlichkeit verringern.
- Nach derzeitigem Stand der Technik werden global vorwiegend ZKTs zur batchweisen Bierbereitung verwendet. Bei einer durchschnittlichen Tankgröße von etwa 4.000 hl/ZKT, Kosten von rund 160.000 Euro/ZKT für derartige Fermenter, einer mittleren Gesamtbelegzeit von 18 Tagen/ZKT sowie einem Weltbierausstoß von 1,3 Milliarden hl/a errechnet VIRKAJÄRIVI (2001) eine Kapitalkostenbindung von rund 3 Milliarden Euro für die bis dato verwendete, konventionelle Kellertechnologie. Da er von einer durchschnittlichen Applikationsdauer von 25–30 Jahren/ZKT ausgeht, stellt er selbst die Erfolgsaussichten für eine Umstellung der herkömmlichen Reaktortechnologie auf die mit immobilisierten Organismen – trotz seiner erfolgsversprechenden Forschungsarbeiten – infrage.(10)

Wenngleich daher die Verwendung von freien Zellen für das Forschungsvorhaben als vorteilhaft erscheint, ergeben sich auch hier große Herausforderungen.

So konnte sich in der Praxis bisher lediglich das modifizierte Coutts-Verfahren, welches auf einer Rührkesselkaskade mit Heferückführung basiert (vgl. Kapitel 3.5.2.1, S. 15 ff.), in vereinzelt Fällen durchsetzen. Bei der Beurteilung der Technologie wurde daher ein besonderer Fokus auf diesen Prozess gelegt.

Subjektiv ergeben sich aus der Evaluierung der offenbarten Konstruktion sowie den verfahrenstechnischen Beschreibungen folgende Fragen und potenzielle Probleme:

- Es ist bekannt, dass die Anlagen- und Verfahrensoptimierungen des Coutts-Verfahrens mehrere Jahrzehnte lang dauerten, bis eine angestrebte Produktqualität hergestellt werden konnte. Dennoch wird weder offengelegt, mit welchen Hefestämmen die Fermentationen erfolgten noch welche sensorischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften komparativ resultierten.
- Das beschriebene Verfahren beinhaltet eine obligate, aufwendige Kalttrubentfernung.
- Die Apparatur ist nicht für Überdrücke ausgelegt, sodass dieser nicht gezielt zur Steuerung der Biomasse- bzw. Gärungsnebenproduktbildung und/oder für den Flüssigkeitstransfer genutzt werden kann.
- Durch das permanente Rühren, den Fluidtransfer mittels Pumpen und das Abzentrifugieren der Mikroorganismen muss dem System fortwährend Primärenergie zugeführt werden. Außerdem sind diese beweglichen, dauerbeanspruchten Teile meist investitionsaufwendig, relativ wartungsintensiv und unter Umständen schwierig zu reinigen.
- Die Rührkesselkaskade und Hefeseperation ermöglichen keine differenzierte Partikel- und Organismenabscheidung.
- Das System kann nicht ohne erheblichen Mehraufwand in bestehenden Anlagen nachgerüstet und so bei Bedarf individuell getestet werden.(49)

- Weil weniger als 5 Rührkessel in Reihe geschaltet werden, ist nicht davon auszugehen, dass sich ein idealer Rohrströmungscharakter ausbildet. Dadurch erhöht sich wiederum die Gefahr der Produktinhibierung, z. B. durch erhöhte Ethanolgehalte, insbesondere im 1. Reaktor. Zudem werden auf diese Weise langfristig Veränderungen im Hefemetabolismus begünstigt.
- Darüber hinaus fällt auf, dass nicht beschrieben wird, wie, wann und ob die Erntehefe behandelt und/oder verworfen wird.
- Des Weiteren werden nur wenige bis keine technologischen Details wie Belüftungs-raten, Fermentationstemperaturen, Zellzahlen der aktuellen, erfolgreichsten Betriebsweisen preisgegeben.
- Wie hoch die tatsächlichen, aktuellen wirtschaftlichen Vorteile der Konfiguration sind, ist nicht bekannt.

Letztendlich bleibt es daher spekulativ, wie gut sich diese modifizierte Vorrichtung und das zugehörige Verfahren allgemein für Hauptbieregärungen unter variierenden Bedingungen eignen.

Prinzipiell scheint der Prozess partiell erfolgreich zu sein, allerdings stellt sich die Frage, warum weltweit erst nachweislich 2 bis vermutlich 4 Brauereien nach diesem über 50 Jahre alten Verfahren arbeiten.

Aus heutiger Sicht kann ergänzt werden, dass in den 1960er-Jahren, in denen die Anlagen großtechnisch realisiert wurden, die Kenntnisse über die biochemischen Prozesse während der Fermentation nicht ausreichen bzw. nicht adäquat in den Anlagenkonzepten beachtet wurden und das die damals zur Verfügung stehende Mess- und Regeltechnik teilweise nicht den Anforderungen an derartige Verfahren entsprach.

4.2 Alternative Prozesstechnologie

Basierend auf den Erkenntnissen aus der Literaturrecherche wurden folgende Prämissen ergänzt, um ein ökonomisches, alternatives Anlagen- und Verfahrenskonzept in dieser Abhandlung zu entwickeln:

1. Um eine äquivalente Produktqualität erreichen zu können, muss der Hefestoffwechsel in hohem Maße berücksichtigt werden. Weil selektierte Brauereihefe jeher zyklischen Stresssituationen ausgesetzt wird, sollte es daher idealerweise möglich sein, die Organismen so zu behandeln, wie es bei traditioneller, diskontinuierlicher Arbeitsweise der Fall ist. Dies schließt auch ein, dass insbesondere untergärige Populationen zyklisch ersetzt werden können (vgl. Kapitel 3.6.1, S. 21)
2. Das Anlagenkonzept sollte möglichst einfach sein, da komplizierte Anlagen den Kapitaleinsatz erhöhen, intensivere Instandhaltungs- und Wartungsarbeiten bedingen und meist aufwendiger zu reinigen sind.
3. Um das Risikopotenzial zu verringern, sollte idealerweise mit konventionellen Anlagenkomponenten gearbeitet werden, die im Fall eines Miss- oder Teilerfolges weiterhin andersartig (z. B. klassisch diskontinuierlich) genutzt werden können. Dies gilt vor allem für die konstruktive Gestaltung der Reaktoren, schließt jedoch auch das Verrohrungs- und Ventilkonzept sowie die Mess- und Regeltechnik ein.

Unter Beachtung der genannten Bedingungen und dem Stand der Technik, wurde entschieden, dass als Basis, wie in der Abbildung 14 simplifiziert illustriert, **konventionelle zylindrokonusche Tanks (ZKTs)** als Hauptreaktoren verwendet werden sollten. ZKTs haben dabei den Vorteil, dass sie weltweit im Brauereibereich verbreitet und dort seit Jahrzehnten etabliert sind. Ihre konstruktive Gestaltung ermöglicht eine einfache, automatisierbare Reinigung (CIP-Reinigung) und eine effektive Entfernung der sedimentierten Partikel und Organismen aus dem Konusbereich. In der Regel lassen sich zudem Überdrücke in den Behältern einstellen und standardisierte Armaturen sind in multiplen Variationen verfügbar.

Die Entscheidung, ob im hier vorgeschlagenen alternativen Anlagen- und Verfahrenskonzept eine Zwangsumwälzung in jedem Reaktor vorgenommen werden muss, wie es z. B. beim Coutts-Verfahren der Fall ist (siehe Kapitel 3.5.2.1, S. 15 ff.), wurde anhand der bekannten Strömungsvorgänge von konventionell betriebenen ZKTs gefällt. Dort ergeben sich bei adäquatem Betrieb und konstruktiver Gestaltung aufgrund der Fermentationsenthalpie sowie des Kühlvorgangs und der Gasbildung turbulente Konvektionsströmungen innerhalb der Reaktoren, die mit zunehmendem Extraktabbau geringer werden und in der Lagerung ihre Richtung verändern können.(242) Zu Fermentationsbeginn resultiert demnach bei klassischer chargenweiser Prozessführung zunächst eine natürliche homogene Tankdurchmischung, die jedoch im Gärverlauf lokal einen zunehmend heterogenen Charakter annimmt.

Moderne Tankdurchmischungssysteme, z. B. der *ECO-FERM™* der Firma *GEA* oder der *ISO MIX* der Firma *Alpha Laval*, die eine Gärungsbeschleunigung bewirken sollen, werden daher üblicherweise erst nach der Hochkräusenphase zugeschaltet, um energieeffizienter zu arbeiten und ein übermäßiges Aufschäumen des Produktes zu vermeiden.(243)

Basierend auf dieser Kenntnis wurde daher entschieden, dass zumindest in den Tanks der Kaskade, in denen zu Gärbeginn ein annähernd linearer Extraktabbau erfolgt, **keine Rührung oder Umwälzung zur Homogenisierung** in den ZKTs **obligat**, sondern lediglich fakultativ vorgesehen wird (siehe Kapitel 4.3, S. 34). Dies wiederum bewirkt eine Reduzierung von Fix- und laufenden Kosten und Partikel sowie Komplexe, z. B. Hefen, Trub und Kristalle, können sich effizienter absetzen und klassisch aus dem Konusbereich abgezogen werden, wodurch idealerweise, die aufwendige, oft durchgeführte Würzelfiltration und/oder eine Hefeseperation (siehe Kapitel 3.5, S. 8 ff.) obsolet werden sollten.

Neben der Wahl des Reaktordesigns und der bevorzugten Betriebsart (Natur/Zwangsumwälzung) musste anschließend entschieden werden, wie die kontinuierliche Durchströmung der Reaktoren erfolgen sollte. Prinzipiell gilt es dabei, insbesondere das Risiko von Kurzschlüssen zwischen zugeführtem Substrat und abgeführtem Fermentat zu reduzieren. Dies kann bei Naturumwälzungen allgemein am einfachsten durch eine gleichmäßige Ein- und Auslagerung der Fluide sowie einer möglichst großen räumlichen Distanz zwischen der Zu- und Ablaufleitung im Reaktorinnenraum – unter Beachtung des angestrebten Strömungs- und Absetzverhaltens – gewährleistet werden.

Beispiele für derartige Anlagenkonzepte finden sich unter anderem bei BOLD 1966 (147), HUPPMANN 1968 (152) und MALIN/MARKIN 1966 (99) (vgl. Kapitel 3.5.2, S. 12 ff., Abb. 6, Abb. 7).

Außerdem können – alternativ oder zusätzlich – Einbauten wie Leitbleche und/oder statische Mischer in die Fermenter eingebracht werden, die eine gezielte Fluidlenkung und Sedimentationsbeeinflussung bewirken und somit das Risiko von variierenden Verweilzeiten bzw. von Inhomogenitäten reduzieren (vgl. KÄHLER 1963 (170) und O`MALLEY 1961 (196); Kapitel 3.5.2, S. 12 ff., Abb. 6, Abb. 7).

Derartige Installationen werden bei Batchverfahren üblicherweise vermieden, da sie den Reinigungsaufwand und den Kapitalkosteneinsatz erhöhen. Bei kontinuierlich betriebenen Fermentern in anderen Industrien gehören sie hingegen zum Stand der Technik, weil durch sie die Prozesssicherheit und Reproduzierbarkeit erhöht wird und Reinigungen allgemein seltener nötig sind. Ferner können durch Einbauten Reaktionsbereiche innerhalb der Fermenter gezielt voneinander separiert werden. Dadurch reduziert sich entsprechend die benötigte Gesamtanzahl, wodurch eine Prozesseffektivierung, insbesondere von großvolumigen Reaktoren, erreicht wird.

Bei der Konzeption des Anlagen- und Verfahrenskonzepts wurde daher auch hier entschieden, dass, anders als aus dem Stand der Technik bekannt, der **zentrale Einbau eines nach unten geöffneten Elementes (L)** in die Fermenter eine sinnvolle und einfache Möglichkeit darstellt, **um eine gezielte Strömunglenkung und Partikelabscheidung zu ermöglichen, Kurzschlüsse zwischen zugeführtem Substrat und abgeführtem Fermentat zu vermeiden sowie einen zusätzlichen Reaktionsraum innerhalb der Fermenter zu kreieren.**

Die Abbildung 14 zeigt simplifiziert eine vorgeschlagene Konstruktionsweise. Das vorzugsweise bereits inokulierte Substrat wird dabei kontinuierlich über die Einlaufleitung (EIN) in den befüllten Außen- bzw. Mantelbereich (M) des ZKTs geleitet. Dieser stellt den ersten Reaktorbereich dar. Die Wärmeableitung erfolgt konventionell, das heißt über Kühlzonen (K) oder Raumkühlungen, wobei auch andersartige, alternative Temperierungskonzepte wie Zwischenkühler vorgesehen wurden.(244) Das gärende Substrat wird nun stochastisch, kontinuierlich in das nach unten geöffnete Leitrohr (L) abgezogen, welches den 2. Reaktorbereich repräsentiert. Von dort aus erfolgt im oberen Teil die Fluidableitung, sodass permanent ein schaumoptimierter Füllstand im System eingestellt und aufrechterhalten werden kann. Sedimentierte Partikel und/oder Organismen (P) können klassisch über den Konus – kontinuierlich oder chargenweise – abgezogen und anschließend optional behandelt werden.

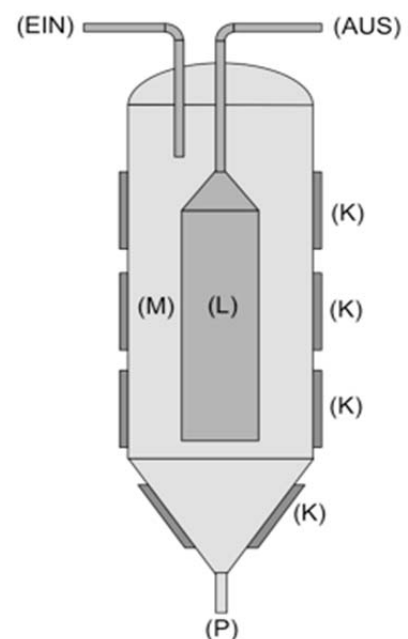


Abb. 14: Modifizierter Tank

Mehrere derartige Fermenter, die sich wahlweise auch in entgegengesetzter Richtung betreiben lassen (siehe Tank 4, Abb. 15), können nun in Reihe geschaltet werden.

Die Abbildung 15 veranschaulicht dabei eine derartige Reaktorkaskade exemplarisch.

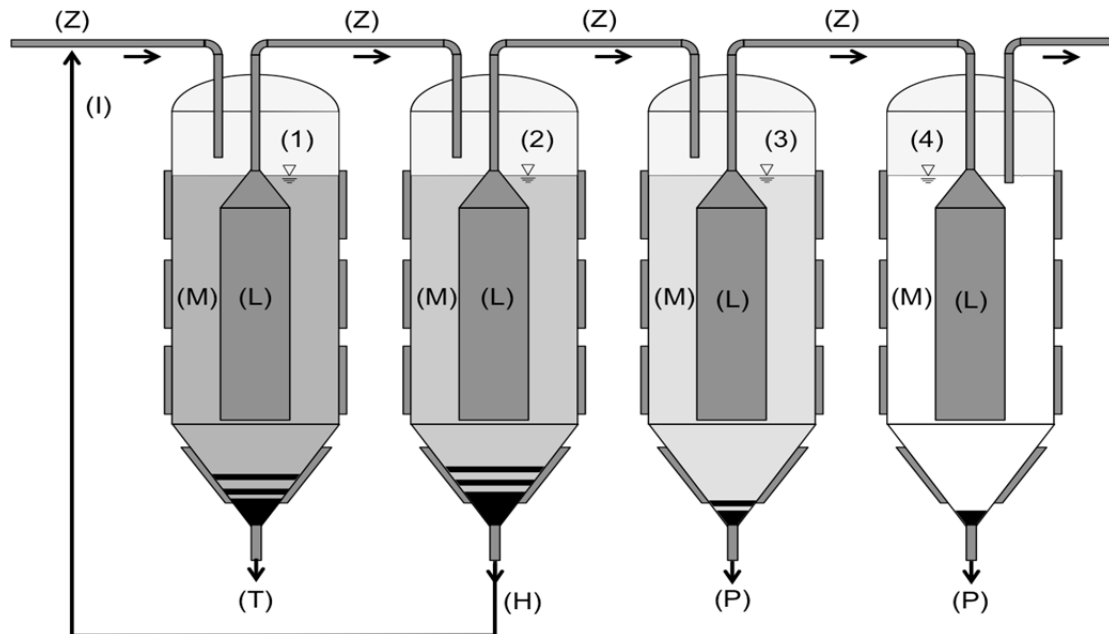


Abb. 15: Tankkaskade zur kontinuierlichen Fermentation

Durch die räumliche Trennung der einzelnen Fermentationsstadien in der Kaskade soll – wie in der Abbildung 15 angedeutet – eine Fraktionierung der Reaktionsprodukte erreicht werden.⁽²⁴⁵⁾ Idealerweise erfolgt dann die Sedimentierung von erhöhten Anteilen an Kalttrub (T) (hier im Tank 1), vitaler Erntehefe (H) (hier im Tank 2) und Hopfenharzen, Kristallen sowie Eiweißkomplexen (P) (hier in den Tanks 3–4), bei entsprechendem Betrieb und konstruktiver Gestaltung, lokal getrennt und nicht konventionell, zeitlich nacheinander. Folglich könnte wiederum die Partikel/Organismenverwertung effektiver gestaltet werden, weil gewünschte und unerwünschte Partien einfacher voneinander separiert werden könnten. Vitale Organismen (H) könnten dann bspw. gezielt behandelt und – vorzugsweise begrenzt oft – als gärraktives Inokulum (I) an unterschiedlichen Prozessstellen (Z) wiederverwendet (zudosiert) werden; wohingegen der Trub (T) und die restlichen unerwünschten Partikel (P) direkt verworfen werden könnten. Des Weiteren entstehen in den Reaktoren nun potenziell Gase unterschiedlicher Reinheit, wodurch sich auch deren Aufbereitung und Weiterverarbeitung optimieren und effektivieren ließe.

Durch die Einbauten (L) wird jeder Reaktor in 2 separate, direkt miteinander in Verbindung stehende Systeme unterteilt: das System Tank bzw. Mantelbereich (M) und das System Einbau bzw. Leitrohr (L).

Um den potenziellen Vorteil dieser Anlagenkonfiguration herauszuarbeiten, sind in der Abbildung 16 exemplarisch die typischen Extraktverläufe einer Batchgärung (durchgängig graue Kurve), einer Fermentation in einer vierstufigen Rührkesselkaskade (RKK) (unterbrochene graue Stufen) und einer angestrebten Fermentation in einer ebenfalls 4-stufigen, hier vorgestellten Reaktorkaskade (schwarze Stufen) unter annähernd gleichen Bedingungen vergleichend dargestellt.

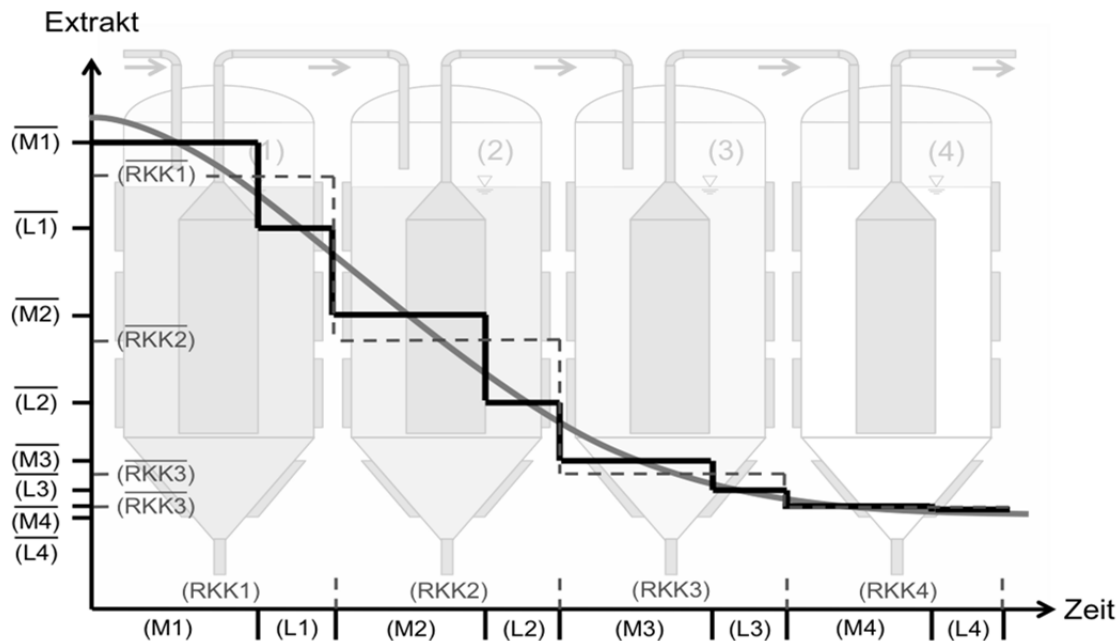


Abb. 16: Approximierter Extraktabbau in unterschiedlichen Systemen

Wie illustriert, verläuft der Extraktabbau bei Batchgärungen (durchgängig grau) typischerweise zunächst verlangsamt (Adaptionsphase der Hefe und Lag-Vermehrungsphase), dann annähernd linear beschleunigt (Hauptgärphase und Log-Phase der Hefevermehrung), bevor erneut eine Prozessverlangsamung eintritt (stationäre Vermehrungsphase und Reduzierung der Gärgeschwindigkeit aufgrund zunehmender Produktinhibition, Nährstoffmangel, Hefesedimentationen und geringer werdenden Konvektionen). Bei ideal durchmischten, kontinuierlich betriebenen Rührkesselkaskaden (RKK) (unterbrochen grau) stellt sich hingegen in jedem Fermenter ein mittlerer Extraktgehalt ein, wodurch ein treppenförmiger Extraktverlauf über die Kaskade resultiert. Wohingegen die Stufenanzahl bei Rührkesselkaskaden jedoch äquivalent zu der Reaktoranzahl ist (hier 4 unterbrochen grau dargestellte Plateaus), ergeben sich – bei dem alternativ vorgeschlagenen Konzept (durchgängig, schwarz) – idealerweise 2 Gradienten pro Fermenter, weil diese, durch den Einbau (L), nun jeweils 2 separate, jedoch miteinander verbundene Zonen aufweisen.

Durch eine derartige Vervielfältigung der Einzelsysteme in der Kaskade wird der Stress für die Organismen reduziert, die Anlageneffizienz gesteigert und ein höheres Rückführungsverhältnis ermöglicht. Die Steigung der einzelnen Stufen sowie deren Niveauhöhe (mittlerer Extraktgehalt) und deren Länge (mittlere Verweilzeit) hängen dabei von dem real vorherrschenden Strömungsprofil ab, wobei dieses auch durch das Anlagendesign und die Betriebsart beeinflusst wird.

Basierend auf den Erkenntnissen der Batchgärungen sollten sich auch in diesem System, insbesondere in der linearen Phase der Extraktreduktion, turbulente, natürliche Strömungen in den Mantelbereichen (M) und in den Einbauten (L) ergeben, die zu einer homogenen Durchmischung der Systeminhalte führen, was in der Abbildung 17 für die Tanks 1 und 2 illustriert ist. Mit zunehmender Fermentationsverlangsamung ist jedoch anzunehmen, dass sich die natürliche Strömungsintensität progressiv verringert (Tank 3) und sich einer heterogenen (Pfropfen-)Strömung annähert. Dies gilt insbesondere für die Lagerungsphase (hier exemplarisch in Tank 4 angedeutet), in der die Extraktreduktion und somit die Wärme- und CO₂-Bildung fast vollständig abgeschlossen sind.

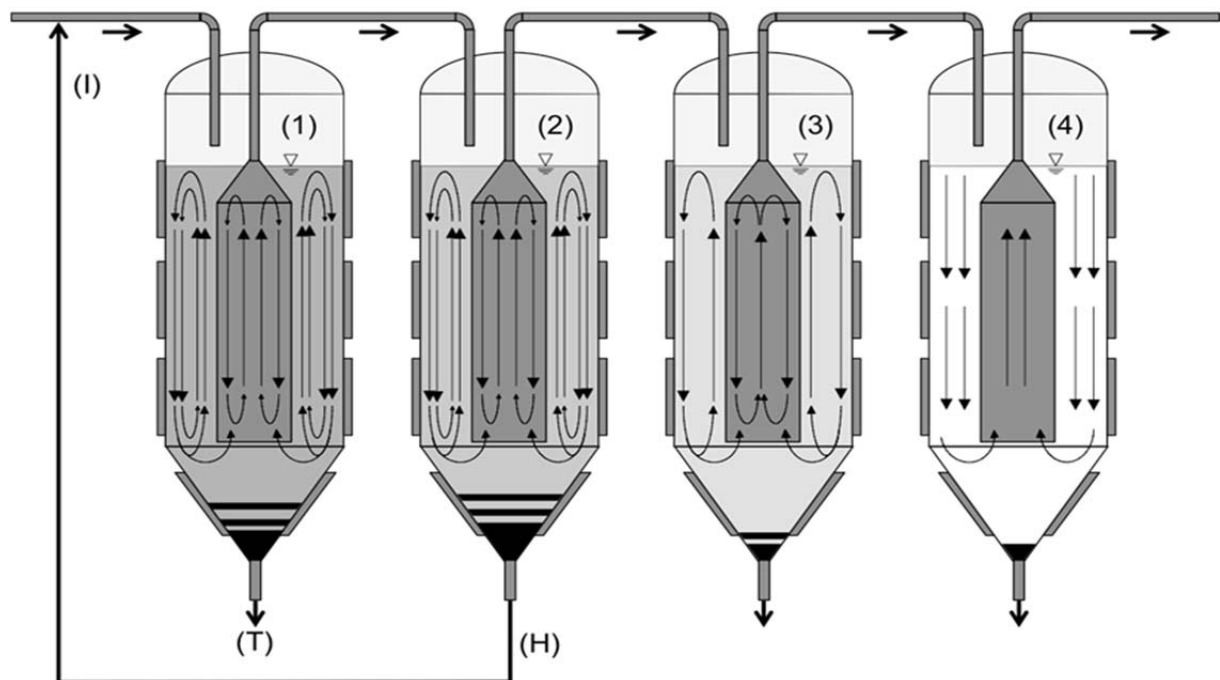


Abb. 17: Angenommenes Strömungsprofil in der Kaskade

Ein weiterer angestrebter technologischer Vorteil dieser Anlagenkonfiguration besteht darin, dass der Fluidtransfer wahlweise klassisch über Pumpen, vorzugsweise jedoch über einen fallenden Druckgradienten erfolgen kann.

Ein erhöhter Spundungsdruck zu Gärbeginn bzw. am Kaskadenanfang bewirkt dabei, dass die Biomassebildung komparativ reduziert wird (vgl. Kapitel 3.6.2.4, S. 25 ff.), wodurch Verluste verringert und höhere Fermentationstemperaturen implementiert werden können.

Ferner resultiert eine graduierte Druckreduzierung über den Kaskadenverlauf in einer zunehmenden Entgasung des karbonisierten Produktes, wodurch unerwünschte Jungbieraromen ausgetrieben werden können.

4.3 Patentanmeldung zum Verfahren und Vorrichtung

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte alternative Verfahren und die Vorrichtung zur kontinuierlichen Fermentation von Flüssigkeiten wurde am 12.08.2009 durch die Technische Universität München (TUM), aufgrund der Empfehlung der Bayerischen Patentallianz (BayPat), zum Patent angemeldet (Deutschland, EP, WO und China) und beinhaltet weitere konstruktive sowie verfahrenstechnische Details.(244)

Im Rahmen eines gemeinschaftlichen Forschungsprojektes zwischen dem Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmitteltechnologie erwarb die Krones AG 2014 die Schutzrechanträge der TUM und sicherte sich die Rechte auf weitere Ideen die nachfolgend in der Projektbearbeitung entstanden.

5 BASISEXPERIMENTE

Bevor eine auf dem entwickelten Konzept basierte Pilotanlage konstruiert und getestet werden konnte, mussten zahlreiche Grundlagenversuche erfolgen, um die Kenntnisse der biochemischen Prozessabläufe zu vertiefen und Lösungsansätze für potenzielle Hürden bereitzustellen. Nachfolgend werden daher die wichtigsten Basisversuchsergebnisse zusammengefasst, wobei im Anhang bzw. im elektronischen Anhang (EA) weitere, ausgewählte Ergebnisse sowie die Rohdaten entsprechend strukturiert dargestellt werden.

5.1 Rahmenbedingungen für Fermentationen im Versuchsmaßstab

Für die Erstellung wissenschaftlicher Arbeiten ist die Definierung von Standardversuchsparametern, die eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der generierten Ergebnisse ermöglichen sollen, unabdinglich.

Obgleich für viele der durchgeführten Experimente individuelle Bedingungen determiniert werden mussten, werden in diesem Kapitel einige ausgewählte Prozessparameter primär erläutert, die für eine Vielzahl der Studien von entscheidender Bedeutung waren. So erfolgten Basisversuche zu Fermentationssubstraten, Gärungsorganismen und Laborreaktoren, um zu eruieren welche Parameter idealerweise gewählt werden sollten, damit später ein stabiler Anlagenbetrieb und eine Komparation zu industriellen Prozessen gewährleistet werden konnte.

5.1.1 Fermentationssubstrat

Um eine adäquate Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten wissenschaftliche Versuche idealerweise immer mit exakt definierten Parametern vorgenommen werden. Aus diesem Grund erfolgten Versuche, in denen eruiert wurde, ob sich Sekundärwürzprodukte bzw. artifizielle Würze besser als industrielle, untergärrige Bierwürze für die angestrebten Untersuchungen eignen.

Neben der künstlich hergestellten Würze nach SACHER (246), deren Ingredienzien in der Tabelle 1 aufgelistet sind, wurden 9 kommerziell erhältliche Produkte hinsichtlich ihrer Tauglichkeit geprüft.

Tabelle 1: Zusammensetzung der künstlichen Würze nach SACHER

Zucker (g/l)		unpolare Aminosäuren (g/l)		polare Aminosäuren (g/l)	
Glukose	12	Alanin	0,12	Arginin	0,15
Maltose	74	Isoleucin	0,08	Asparagin	0,16
Maltotriose	17	Leucin	0,17	Asparaginsäure	0,90
Fruktose	2,5	Glycin	0,04	Cystein	0,01
Saccharose	4,0	Phenylalanin	0,15	Glutamin	0,11
		Prolin	0,36	Glutaminsäure	0,10
sonstige Zusätze (g/l)		Methionin	0,02	Histidin	0,05
K ₂ HPO ₄	1,3	Tryptophan	0,02	Lysin	0,14
Difco-Hefepräparat	6,7	Valin	0,13	Serin	0,07
Milchsäure (20 %), um pH-Wert auf 5,4 einzustellen				Threonin	0,08
				Tyrosin	0,12

Damit die Präparate mit der „frischen“, untergärigen, großtechnisch hergestellten Bierwürze (W) verglichen werden konnten (Probenahme: siehe Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff.), wurden die Pulver (P), Extrakte (E) und Granulate (G) in 80 °C heißem, bidestillierten Wasser gelöst und jeweils ein Stammwürzegehalt von 11,5 °Plato eingestellt. Im Anschluss wurde die Bittere mittels ISO-Extrakt (30 %) der Firma Hopsteiner auf ein äquivalentes Niveau von 20 Bittereinheiten (BE) eingestellt (Formel zur Berechnung: EA9) und alle Produkte auf 20 °C abgekühlt, bevor eine Analyse erfolgte.

Die Würzezusammensetzungen, berechnet auf 12 °P Stammwürzegehalt, können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Charakteristika von Sekundärwürzeprodukten

Parameter	Einheit	Normwerte Richtwerte	W	E1	E2	E3	E4	E5	E6	G1	P1	P2
FAN	mg/l	200–400	208	153,8	101,7	42,9	89,1	23,2	49,2	170,5	133,2	89,8
Summe AS	mg/l	1600–2000	1694	1249	826	348	723	188	399	1384	1082	729
pH-Wert		5,2	5,2	5,07	5,28	5,53	5,71	4,77	5,5	5,33	5,26	5,75
Ges. lösl. N	mg/l	900–1100	1056	1303	1071	450	721	875	544	980	1302	651
noch koag. N	mg/l	< 25	21	34	43	15	57	36	19	9	53	64
Farbe	EBC	5–15	12	13	15	19	25	77,5	19	55	31,3	11,25
TBZ		< 45	29,5	119,5	116,8	283	66,6	1239	94,9	82,7	280	47,5
Fruktose	g/l	1–2	1,52	1,9	1,68	0,71	0,1	0,51	0,1	0,5	0,49	0,02
Glukose	g/l	10–12	10,86	13,09	12,41	8,31	2	10	2	3,51	3,03	1,5
Saccharose	g/l	2–4	3,01	3,08	2,55	0,88	1,5	0,25	1	2,5	0,41	1,7
Maltose	g/l	56–80	70,61	61,04	66,19	57,45	4,92	12,3	18,03	18,87	16,4	5,73
Maltotriose	g/l	14–17	15	13,75	18,58	22,89	4,02	2,5	6	7,51	6	5,01

Wie aus den Einzelwerten der Tabelle 2 hervorgeht, entsprachen die ausgemischten Sekundärprodukte in multiplen Parametern (grau hinterlegt) nicht den Anforderungen, die üblicherweise an konventionelle Allmalzbierwürzen gestellt werden. So enthielten sie teilweise signifikant weniger Aminosäuren (AS) und FAN, was insbesondere bei mehreren Führungen zu einer Unterversorgung der Organismen und somit zu einem veränderten Metabolismus und Reproduktionsverhalten führen kann. Auch die teilweise stark veränderte Zuckerszusammensetzung beeinflusst potenziell die Bildung von Gärungsnebenprodukten und somit den Produktcharakter.

Lediglich die „frische“ Würze (W), die Präparate (E1), (E2), (G1) sowie die artifiziell hergestellte Würze (AW) kamen anhand ihrer chemisch-, physikalischen Eigenschaften für weitere Versuche infrage.

Da das übergeordnete Ziel dieser Arbeit die kontinuierliche Herstellung (Fermentation) von Bier war, dessen Charakter stationär hergestellten Produkten entsprechen sollte, war die organoleptische Qualitätskontrolle des Jungbieres ein signifikantes Kriterium, dessen Gewichtung ähnlich hoch wie die analytische Produktbeurteilung einzustufen war. Aus diesem Grund erfolgten anschließend Standardfermentationen der genannten, potenziell geeigneten Substrate ((W), (E1), (E2), (G1), (AW)), um die sensorische Qualität der Biere zu evaluieren.

Zu diesem Zweck wurden die Produkte nach beschriebener Herstellung mit Sterilluft definiert begast (180 Sekunden, 50 mg Sterilluft/min über eine Fritte mit 50 µm Porenweite) und je 3 x 2 Liter mit je 15 Mio. HZ/ml (Propagationshefe siehe: Kapitel 5.1.2.1, S. 38 ff., TUM 34/70) in den Kleingärbehältern (KF), (vgl. Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff.) angestellt. Die Fermentationen erfolgten parallel, isotherm bei 15 °C (Umluftkühlung) und isobar bei 0,5 bar_ü (vgl. Kapitel 5.1.3.3, S. 46 ff.).

Nach 7 Tagen folgte eine 3-Glas-Verkostung gegen die Würze (W) sowie eine qualitative Produktbeurteilung der unfiltrierten Proben durch 10 DLG-Verkoster/innen. Dabei zeigte sich, dass alle Panelteilnehmer/innen signifikante sensorische Unterschiede zu der frischen Würze detektierten. Die aus Sekundärprodukten hergestellten Halbwaren wurden teilweise als fehlerhaft und/oder als nicht mit dem Frischeprodukt vergleichbar beschrieben, weshalb auf weitere Analysen und Versuche mit diesen Produkten verzichtet wurde.

Weil nur mit der großtechnisch hergestellten „frischen“ Würze (W) eine adäquate Produktqualität hergestellt werden konnte, erfolgten anschließende Untersuchungen zu Variationen einzelner Merkmale des Substrates.

Dazu wurden Würzeproben in 8 aufeinanderfolgenden Wochen heiß vor dem Plattentauscher während des Würzetransfers vom Whirlpool in den Keller entnommen (vgl. Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff.), abgekühlt und die in der Tabelle 3 beschriebenen Charakteristika evaluiert. Das restliche Probenmaterial wurde eingefroren und für weitere Versuche eingelagert.

Tabelle 3: Würzeschwankungen in 8 aufeinanderfolgenden Produktionswochen

Parameter	IU	1	2	3	4	5	6	7	8	MW	STDEV
Extrakt	G/V%	12,31	12,24	12,56	12,39	12,19	12,24	12,41	12,2	12,32	0,128
FAN	mg/l	198,6	201,7	193,2	203,2	205,5	196,3	200,3	198,9	199,71	3,890
Summe AS	mg/l	1598	1580	1572	1624	1609	1576	1568	1597	1590,50	19,756
pH-Wert		5,2	5,19	5,23	5,19	5,2	5,12	5,09	5,21	5,18	0,048
Ges. lösl. N	mg/l	1042	1008	988	1022	1046	992	1061	1035	1024,25	26,397
noch koag. N	mg/l	21	23	20	23	21	21	22	20	21,38	1,188
Farbe	EBC	12	13	12	12	12	12	13	12	12,25	0,463
TBZ		26,4	29,2	27,2	25,9	27	28,3	28,9	29,4	27,79	1,339
Fruktose	g/l	1,28	1,31	1,34	1,46	1,43	1,35	1,44	1,37	1,37	0,065
Glukose	g/l	8,93	9,11	9,56	9,89	10,04	10,12	9,88	9,89	9,68	0,440
Saccharose	g/l	3,02	3,06	3,12	3,08	3,03	3,05	3,05	3,08	3,06	0,032
Maltose	g/l	66,24	67,44	71,29	69,9	70,21	68,56	67,37	68,72	68,72	1,684
Maltotriose	g/l	14,98	15,04	14,91	15,03	14,95	15,01	14,64	14,74	14,91	0,146

Die geringen Standardabweichungen (STDEV) der Parameter verdeutlichen, dass die untergärige „Originalbierwürze“ der *Weihenstephener Staatsbrauerei* im dargestellten Untersuchungszeitraum nur unwesentlich variierte.

Um zu eruieren, wie stark sich die ermittelten Varianzen auf Fermentationen und den Produktcharakter auswirken, wurden die eingefrorenen Proben nach dem 8-wöchigen Versuchszeitraum simultan aufgetaut, erneut analysiert und komparativ – wie oben beschrieben – behandelt und vergoren.

Die analytische Beurteilung der Proben zeigte, dass der Einfrier- und Auftauprozess die Würzen dabei nicht signifikant in den gemessenen chemisch-physikalischen Charakteristika veränderte, da alle Messwertabweichungen vor und nach der Behandlung innerhalb der Labortoleranzen lagen, weshalb an dieser Stelle auf eine tabellarische Darstellung verzichtet und auf den elektronischen Anhang (EA9) verwiesen wird.

Die vergleichenden 3-Glas-Verkostungen der unfiltrierten Proben ergaben, dass trotz kleineren Variationen der Würzezusammensetzungen (siehe Tabelle 3) keine signifikanten organoleptischen Unterschiede zwischen den 8 Würzen feststellbar waren.

Daraufhin wurde entschieden, dass sich industriell hergestellte untergärige Bierwürzen, deren analytische Abweichungen innerhalb der gezeigten Standardabweichungen liegen, für zahlreiche der hier angestrebten Versuche verwenden lassen.

In einer zusätzlichen Versuchsserie wurden die analytischen Veränderungen von Weißbier- (WB) und untergäriger Originalbierwürze (O) untersucht, die bei variierenden Lager-temperaturen (4 °C, 20 °C), innerhalb von 12 Wochen resultierten.

Dabei zeigte sich, dass der FAN-Gehalt beider Substrate erst nach etwa 8 Wochen geringfügig reduziert wurde. So verringerten sich die FAN-Gehalte sortenunabhängig bei der 20 °C Lagerung durchschnittlich um etwa 7 % und bei der 4 °C Lagerung durchschnittlich um etwa 3 %. Die Extraktgehalte und pH-Werte der Proben änderten sich hingegen kaum (durchschnittliche Reduzierungen ca. 0,3 %).

Da die Bitterstoffe analytisch stark variierten konnte keine klare Aussage über deren zeitliche und temperaturabhängige Entwicklung getroffen werden.

Die Auswertung der Zuckerprofile ergab hingegen, dass sich eine stetige, temperaturabhängige Reduzierung der gemessenen Zuckergehalte vollzog. Im Gegensatz zu Glukose, Saccharose und Fructose, deren Gehalte sich sortenunabhängig bei 4 °C Lagerungstemperatur um rund 20 % und bei 20 °C Lagerungstemperatur um ca. 30 % verringerten, nahm der Gehalt an Maltose und Maltotriose bei der 4 °C Lagerung um rund 5 % und bei 20 °C Lagerung um etwa 10 % ab. Außerdem wurden zunehmend kristalline Ablagerungen an den Gefäßwandungen der Glasbehälter während der Lagerung ersichtlich.

5.1.2 Fermentationsorganismen

Der physiologische Zustand der Hefepopulation beeinflusst maßgeblich den Fermentationsverlauf und die Produkteigenschaften. Eine exakt definierte Organismenbehandlung ist somit für wissenschaftliche Versuche unabdinglich.

Weil der untergärige Hefestamm mit der allgemeinen Bezeichnung 34/70 weltweit am häufigsten für industrielle- und wissenschaftliche Bierfermentationen eingesetzt wird, wurde dieser als Referenz und somit als Hauptuntersuchungsgegenstand in dieser Arbeit ausgewählt. Seine allgemein bekannten Eigenschaften sowie komparativen Charakteristika sind in Kapitel 5.3.2, S. 72 ff., bzw. in Veröffentlichung (247) beschrieben.

5.1.2.1 Hefepropagation

Der nachfolgende Prozessablauf beschreibt die standardisierte Vorgehensweise zur Hefepropagation der akkreditierten Abteilung *Hefezentrum* des *Forschungszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität*. Das Propagationsverfahren sieht dabei folgende Prozessschritte vor:

Einmal jährlich werden die relevantesten, handelsüblichen Reinkulturen, aus dem Kryospeicher, der eine konstante Temperatur von -80 °C ($\pm 3\text{ °C}$) aufweist, entnommen und einige Glasperlen, auf denen die Organismen gebunden vorliegen, in 100 ml sterile, doppelt autoklavierte Würze (durchschnittliche Substratcharakteristika vor Behandlung: vgl. Tabelle 3) überführt. Es folgt eine drucklose Aktivierung der Population bei 22 °C ($\pm 1\text{ °C}$), unter ständigem, automatisiertem Schütteln (80 rpm).

Nach 24 Stunden wird eine Hefeprobe aus den Erlenmeyerkolben entnommen und die Reinheit der Kultur mit dem PCR System IGS2-314-rDNA (modifizierte Methode nach Hutzler et al. (248)) sowie den folgenden, klassischen molekularbiologischen Methoden überprüft:

Tabelle 4: Molekularbiologische Untersuchungsmethoden zur Hefereinheit

Untersuchung	Beschreibung und Aufgabe
Mikroskopieren	visuelle Detektion von Mikroorganismen/Fremdorganismen
Anreicherung, 37 °C-Test	Bei dieser Temperatur bilden fast ausschließlich obergährige Brauereihefen (OG) und Wildhefen (WH) Kolonien in Universalmedien wie Würze oder Yeast-Media (YM) aus. Untergährige Hefe (UG) wird hingegen gehemmt.
NBB-Bouillon	In diesem Medium werden bierschädliche Bakterien (gram-positive Bakterien und gramnegative Aerobier) angereichert.
Anreicherung Hefewasser	In diesem Medium werden Bakterien (falls vorhanden) angereichert.
Anreicherung YM + CuSO ₄	Brauereihefe kann im Gegensatz zu Wildhefe (WH) ab 200 ppm CuSO ₄ nicht mehr wachsen. Somit wird Wildhefe (WH) mit diesem Test nachgewiesen.

Sobald bestätigt ist, dass die Kultur in purer Form genetisch unverändert vorliegt, erfolgt die erneute Präparation der Kryo-Kultur (siehe Standardarbeitsanleitung im elektronischen Anhang EA9).

Parallel dazu werden Würze-Schrägaggarkulturen angelegt und diese bei 25 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden inkubiert. Die Schrägaggarkulturen dienen nun als Starterkulturen für die Propagationsversuche, werden bei 7 °C zwischengelagert und nach Verwendung, bzw. spätestens nach 8 Wochen, standardisiert überimpft, wobei die Kulturreinheit immer primär – wie oben beschrieben – überprüft wird.

Bei Bedarf wird dann jeweils eine Probe des entsprechenden Stammes mittels Impföse unter sterilen Bedingungen aus dem Schrägaggar entnommen und damit 100 ml 2-fach autoklavierte und filtrierte, untergährige Originalbierwürze inokuliert, die nach der Behandlung üblicherweise folgende Charakteristika aufweist:

Tabelle 5: Durchschnittliche Eigenschaften d. hitzebehandelten Propagationswürze

Parameter	Einheit	Ø Gehalt	Parameter	Einheit	Ø Gehalt
Fruktose	g/l	1,9	Threonin	mg/100 ml	6,5
Glukose	g/l	9,1	Alanin	mg/100 ml	4,6
Saccharose	g/l	2,2	Argenin	mg/100 ml	19,3
Maltose	g/l	52,5	Tyrosin	mg/100 ml	8,4
Maltotriose	g/l	11,5	Valin	mg/100 ml	10,3
Asparaginsäure	mg/100 ml	6,9	Methionin	mg/100 ml	1,9
Glutaminsäure	mg/100 ml	6,0	Tryptophan	mg/100 ml	4,2
Asparagin	mg/100 ml	9,8	Isoleucin	mg/100 ml	6,9
Serin	mg/100 ml	6,4	Phenylalanin	mg/100 ml	9,3
Histidin	mg/100 ml	3,1	Leucin	mg/100 ml	18,8
Glutamin	mg/100 ml	0,6	Lysin	mg/100 ml	8,0
Glycin	mg/100 ml	3,3	Summe AS	mg/100 ml	140,4
			Summe FAN	mg/100 ml	17,3

Nach 48 Stunden bei 22 °C (+/-1 °C) und konstantem Schütteln (80 rpm) werden die mit Watte versehenen Erlenmeyerkolben (Bruttovolumen: 250 ml) entnommen und steril in 2,5 Liter Würze (durchschnittliche Zusammensetzung des Nährmediums siehe Tabelle 5) überführt.

Es erfolgt die erneute Überprüfung der Kulturreinheit mithilfe der beschriebenen molekularbiologischen und genetischen Untersuchungsmethoden (vgl. Tabelle 4).

Anschließend werden die 2,5 Liter geteilt und damit weitere 5 Liter (je 2 x 2,5 Liter) angestellt. Nach 48 Stunden bei oben genannten Bedingungen ist die Würze (2 x 3,75 Liter) endvergoren und das Schütteln wird beendet, um ein Absetzen der Organismen zu ermöglichen.

24 Stunden später wird der Überstand abgeschüttet, die Sedimente zusammengeführt und die Zellzahl (mikroskopisch via Thoma-Zellkammer; MEBAK III, 10.11.4.4), die Viabilität (mikroskopisch mittels Methylenblau; MEBAK III, 10.4.4.1) sowie die Menge der Erntehefe (gravimetrisch) bestimmt.

Falls für einzelne Versuche mehr Hefen zum Anstellen benötigt wurden, erfolgten mehrere beschriebene Propagationen parallel.

5.1.2.2 Erntehefe

Bei komparativen Experimenten, in denen die Versuchsreihen nur gegeneinander, jedoch nicht mit anderen Versuchsreihen verglichen werden mussten, konnte hingegen auf untergärrige Erntehefe (TUM 34/70) aus der *Staatsbrauerei Weihenstephan* – vorzugsweise der 3. Führung zurückgegriffen werden, wobei hier ebenfalls der Zustand und die Reinheit der Kulturen vorangehend bestimmt wurden.

Zu diesem Zweck wurde das in einer Wanne (mit Deckel) gesammelte, gekühlte (3 °C +/- 2 °C) Hefesediment zunächst manuell homogenisiert und in sterilisierte, verschließbare Edelstahlbehälter (20 Liter Bruttovolumen) überführt, in denen primär grobe Trubpartikel über einen Feinsiebeinsatz entfernt wurden.

Anschließend wurden die befüllten, verschlossenen Edelstahlbehälter bei 4 °C (+/-2 °C) eingelagert und vor der Verwendung die Zellzahl der homogenisierten Masse (MEBAK III, 10.11.4.4) sowie die Viabilität der Population (MEBAK III, 10.4.4.1) überprüft.

5.1.3 Reaktoren für Laborfermentationen

Experimentelle Fermentationen im Versuchsmaßstab lassen nur bedingt Rückschlüsse auf Gärungen im industriellen Maßstab (*Scale-up*) zu. Dies liegt unter anderem daran, dass die konstruktive Gestaltung der Reaktoren und die vorherrschenden Verhältnisse nicht äquivalent sind.

Weil in dieser Arbeit Gärungen mit unterschiedlichen Spundungsdrücken getestet werden mussten und unterschiedliche Reaktorgrößen von Nöten waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit 2 unterschiedliche Laborfermentertypen (KF und TF50) konstruiert und deren Tauglichkeit und Vergleichbarkeit –, wie nachfolgend beschrieben – eruiert.

5.1.3.1 Kleinfermenter (KF)

Kleinversuche, in diesem Fall Fermentationen von möglichst geringen Mengen, sind aus logistischen, statistischen und ökologischen Gründen für wissenschaftliche Versuche zu präferieren. Aus diesem Grund wurden alternative Kleinfermenter (KF) mit 2 Liter Nutzvolumen konzipiert, in denen auch Druckgärungen realisiert werden können.

In vorangegangenen brauereirelevanten Abhandlungen wurden zunächst Glasfermenter nach LIEZ und WEINFURTNER verwendet (vgl. Abb. 18). Weil diese jedoch sehr bruchanfällig, teuer und schwer zu reinigen waren, wurden sie ab den 1990er-Jahren zunehmend durch die sogenannten EBC-Fermenter aus Edelstahl substituiert. Durch ihre schlanke Geometrie sollten primär Sedimentationen reduziert werden. Ferner waren die Behälter durch ihre konstruktive Gestaltung kostengünstiger, stabiler und ermöglichten nachträgliche Installationen, z. B. von Probenahmehähnen (vgl. Abb. 18). In der Regel wurden die EBC-Gärröhren nach dem Anstellen von oben mit permeablen Watte- oder Gummistopfen verschlossen, durch die wahlweise Gäraufsätze geführt werden konnten. Somit waren konventionell nur Fermentationen unter atmosphärischen Bedingungen möglich.

Als äußerst unpraktikabel gestalteten sich die Temperierung und die Reinigung der langen schlanken Röhren, die kaum in handelsübliche Kühlschränke eingebracht und aus denen Sedimente und Ablagerungen nur aufwendig manuell entfernt werden konnten.

Aus diesem Grund modifizierten Wissenschaftler der VLB in Zusammenarbeit mit dem Anlagenbauer GEA in jüngerer Vergangenheit EBC-Gärröhren so, dass Kühlmäntel außen angebracht wurden, eine individuelle Systemspundung erfolgen kann und sich variabel Messgeräte oder Probenahmehähne integrieren lassen. Außerdem können die Systeme durch Reihenschaltungen und Umpumpverfahren einfacher gereinigt werden.(249, 250)

Eine Alternative dazu stellen die für diese Abhandlung entwickelten Kleingärbehälter (KF) dar. Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, sind diese Behälter aus DN 100 Rohrleitungen mit Clampverschlüssen und planen Bodenplatten zur Erleichterung der Laborhandhabung gefertigt. Die kompakte Bauart ermöglicht eine simple Temperierung, z. B. durch das Einbringen in konventionelle Brut- oder Kühlschränke und/oder Wasserbäder. In die Deckel lassen sich außerdem einfach Anschlüsse wie Stechdegen zur Probenahme und/oder Steckkupplungen für die Druckregulierungen installieren (vgl. Abb. 18). Zudem können andersartig modifizierte Deckel variabel verwendet und Erweiterungen bei Bedarf angeflanscht werden.

Die Dimensionierung der Behälter (KF) ergibt sich aus dem benötigten Füllvolumen von 2 Liter, was die Durchführung aller praxisrelevanter Analysen einschließlich einer sensorischen Beurteilung des Fermentates ermöglicht sowie dem angestrebten Füllhöhen- zu Durchmesser Verhältnis von 1:2, welches idealerweise in industriellen zylindrokonuschen Tanks vorherrschen sollte.(243) Außerdem wurde ein Steigraumvolumen von rund 35 % integriert, um Gärungen jedweder Art, z. B. auch Rührgärungen bei warmen Temperaturen mit obergärigen Hefen, durchführen zu können. Neben den angeführten Vorteilen kann ergänzt werden, dass die Tanks vergleichsweise kostengünstig und vielseitig einsetzbar sind, problemlos in üblichen Spülmaschinen gereinigt werden können und sich bei Bedarf auch autoklavieren lassen. Pumpen zur Reinigung sowie Kälteanlagen werden somit auch bei einem Parallelbetrieb multipler, hier vorgestellter KF nicht benötigt. Die Abbildung 18 veranschaulicht den Reaktoraufbau verschiedener Laborfermenter komparativ.

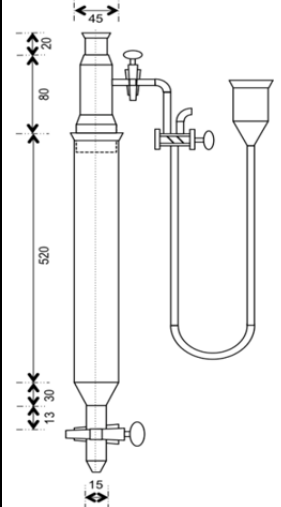
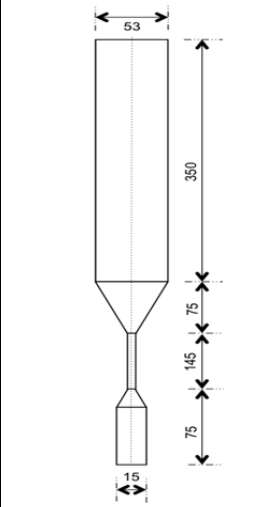
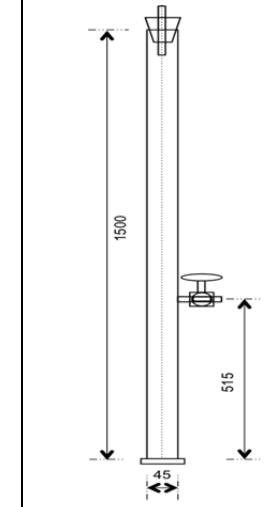
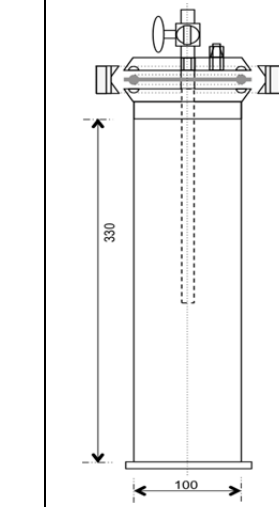
Liez-Fermenter	Weinfurtnner-, Wullinger- und Piendl-Fermenter	EBC-Fermenter	Kleinf fermenter (KF)
			
Nettovol.: 600 ml (251)	Nettovol.: 600 ml (252)	Nettovol.: 1.750 ml (253)	Nettovol.: 2.000 ml (254)

Abb. 18: Ausführungsbeispiele von Laborfermentern

Bevor die für diese Abhandlung entwickelten Reaktoren eingesetzt und weiter gefertigt wurden, erfolgten wissenschaftliche Vergleiche zu den EBC-Gärröhren mit unterschiedlichen Hefestämmen.

Zu diesem Zweck wurde in einer ersten Versuchsreihe untergärige, helle Originalbierwürze (Tabelle 3) mit der Bruchhefe TUM 34/70 angestellt (15 Mio. HZ/ml; Propagationsverfahren siehe Kapitel 5.1.2.1, S. 38 ff.) und das Substrat gleichermaßen auf 12 EBC-Gärröhren und 12 KF aufgeteilt. Die Gärungen erfolgten offen, isotherm bei 15 °C, wobei täglich drei Reaktoren der beiden Systeme entnommen und beprobt wurden. Somit konnte gewährleistet werden, dass die verbleibenden Systeme nicht durch die Probenahmen beeinflusst wurden. Neben der täglichen Bestimmung der Extraktgehalte und pH-Werte wurde abschließend eine 3-Glas-Blindverkostung mit 10 DLG-Verkoster/innen vorgenommen. Gleichermäßen folgten anschließend Versuche mit der staubigeren Hefe TUM 34/78 und der obergärigen Hefe TUM 68, um den Einfluss unterschiedlicher Flokkulationsverhalten zu ermitteln.

Die Analysen der Hauptgärparameter ergaben dabei, dass die offenen Gärungen in den unterschiedlichen Fermentern fast kongruent zueinander – unabhängig von den verwendeten Hefestämmen und Reaktoren verliefen. Ferner wurden auch bei den jeweiligen Verkostungen der unfiltrierten Proben keine signifikanten sensorischen Unterschiede festgestellt (vgl. elektronischer Anhang: EA11).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich bei der Implementierung von identischen Bedingungen mit den KF äquivalente Fermentationen ergeben wie in den EBC-Gärröhren. Vergleiche zu bisherigen und aktuell durchgeführten wissenschaftlichen Arbeiten sind somit möglich.

Da die Handhabung (insbesondere die Temperierung, die Reinigung, die Sterilisierung und die Probenentnahme) durch das entwickelte Reaktordesign jedoch deutlich verbessert werden konnte und sich individuelle Überdrücke sowie Modifikationen einfacher realisieren ließen als in den EBC-Gärröhren, wurden 15 weitere baugleiche Module (KF) sowie eine flexible Temperierungs- und Spundungsvorrichtung für weitere Experimente gefertigt (Abb. 20, S. 44).

5.1.3.2 Versuche in Kleinfermentern (KF)

Der nachfolgende Prozessablauf beschreibt die Standardvorgehensweise für Versuche in den Kleinfermentern (KF), um eine optimierte, vergleichbare und statistisch signifikante Versuchsdurchführung zu gewährleisten:

- A. 10 Minuten nach dem Transferbeginn der Würze aus dem Whirlpool wurde die untergärige Originalbierwürze der *Weihenstephaner Staatsbrauerei* drucklos und heiß vor dem Plattenwärmetauscher in *Cornelius-KEGs* (mit je 19,5 Liter Bruttovolumen) entnommen, diese verschlossen, mit Stickstoff auf 0,5 bar_ü beaufschlagt, für 120 Sekunden auf die Ventil/Öffnungsseite (verkehrtherum) gestellt und anschließend mit kaltem Prozesswasser in einer Wanne abgekühlt.
Im Falle der Notwendigkeit einer Einlagerung wurde diese anschließend bei 4 °C realisiert (vgl. Kapitel 5.4.1.1, S. 79 ff.).
- B. Vor der Verwendung des Substrates erfolgte eine Würzeanalyse hinsichtlich der in der Tabelle 6 beschriebenen Merkmale. Dabei wurde darauf geachtet, dass die im Kapitel 5.1.1, S. 35 ff. beschriebenen Standardabweichungen der Einzelparameter pro Versuchsreihe nicht überschritten wurden.
- C. Zur Inokulation wurde je nach Anforderung entweder Propagationshefe (siehe Kapitel 5.1.2.1, S. 38 ff.) oder Erntehefe (siehe Kapitel 5.1.2.2, S. 40) verwendet, wobei primär deren Reinheit, die enthaltene Zellzahl sowie die Viabilität der Population determiniert wurden (vgl. Tabelle 4). Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Ansätze vor dem Anstellen immer in etwa die gleiche Zellzahl aufwiesen, um Variationen durch unterschiedliche Verdünnungsfaktoren zu reduzieren.
- D. Anschließend wurde die benötigte Substrat(teil)menge und die verwendete Hefe auf die initiale Fermentationstemperatur (innerhalb von 90 Minuten) temperiert und beide zusammengeführt (angestellt). Danach erfolgten die Homogenisierung der Behälterinhalte (wahlweise mithilfe von Rührern, Umpumpvorrichtungen oder Inertgas-einleitungen) und die Verifizierung der Zellzahlen, die bei Bedarf korrigiert wurden.
- E. Je nach Versuchsziel folgte optional eine definierte Belüftung der Suspension durch das Einleiten von Sterilluft am Mischbehälterboden über eine Fritte mit 50 µm Porenweite und unter Verwendung eines Schwebekörper-Durchflussmessers (Marke: *Aalborg*; Messbereich 0–300 ml/min). Nach 10 Minuten wurden so Sauerstoffgehalte von ca. 6,5–7,5 mg O₂/l realisiert, die mithilfe eines portablen Sauerstoffmessgerätes (Marke: *Orbisphere*) gemessen wurden.
- F. Während permanenter Homogenisierung wurden anschließend je 2 Liter Jungbier nacheinander entnommen und damit die gereinigten, ggf. sterilisierten, mit Rührfischen versehenen KF befüllt.



Abb. 19: Präparation der Kleinfermenter (KF)

Außerdem wurde je eine Probe des Fermentats entnommen und diese hinsichtlich des vorliegenden Extraktgehalts, FAN-Gehalts, pH-Wertes, und vorliegendem

Zuckerspektrums analysiert. Weiterhin wurde je nach Versuchsanforderung das Gesamtgewicht der Behälter bestimmt (Waage: *Sartorius type 1403*).

- G. Nach der Befüllung wurden die Tanks umgehend verschlossen und mit Stickstoff auf 1 bar_ü vorgespannt.
- H. Es folgte die direkte Einbringung der Reaktoren (KF) in einen vortemperierten, modifizierten Kühlschrank (*LKB Bromma – 2023 Minicoldlab*), der auf 2 Ebenen bis zu 30 Behälter fasste und eine individuelle Systemspundung ermöglichte. Zur Druckeinstellung wurden die Steckkopplungen (NC/CO₂), die ihrerseits mit voreingestellten Spundeinheiten (Typ *Handtmann: 0062*; Druckbereich: 0,0 bis 2,0 bar) außerhalb des Temperaturschranks verbunden waren, an die Tankdeckel angeschlossen, wodurch sich der gewählte Initialdruck zu Versuchsbeginn einstellte. Die Temperaturkontrolle erfolgte mittels eines manuellen Quecksilberthermometers im Kühlschrank, welches permanent in Wasser (100 ml Messzylinder) eingetaucht war sowie einer zusätzlichen digitalen Langzeitaufzeichnung (Datenlogger Typ: *Ahlborn: ALMEMO 5690-ZM*).

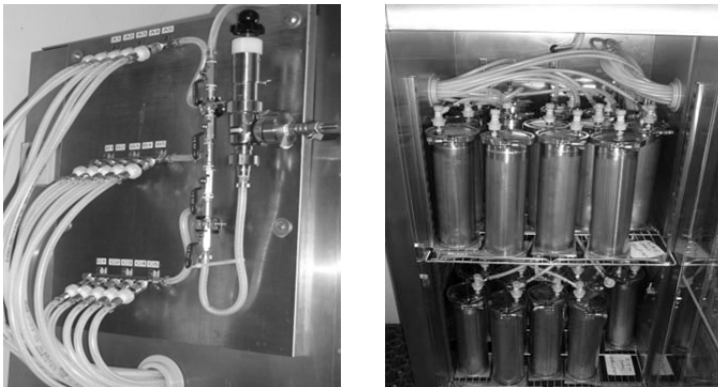


Abb. 20: Spundung und Kühlung der Kleinfermenter (KF)

- I. Die Probenahme wurde üblicherweise, wenn nicht explizit anders beschrieben, immer in 24-Stunden-Intervallen nach der Systemanstellung vorgenommen. Dazu wurde lediglich die benötigte Anzahl an Fermentern aus dem Temperaturschrank entnommen, sodass die verbleibenden Tanks nicht durch die Beprobungen beeinflusst wurden. Um eine statistisch signifikante Arbeitsweise zu ermöglichen, erfolgten immer entweder Mehrfachversuche und/oder Wiederholungen der Versuchsreihen.
- J. Wenn die Hefezellzahl/Biomassegehalt und die Oberflächenladung der Organismen in Schwebenicht mitbestimmt werden mussten, wurden die Kleintanks (KF) nach der Entnahme umgehend in Eisbädern für 30 Minuten auf etwa 0 °C abgekühlt, um die Gäraktivität drastisch zu reduzieren. Anschließend wurden die Behälter über die zuvor eingebrachten Rührfische mittels Magnetrührer (*IKA – Combimag RCT*; 100 rpm; 180 Sekunden) homogenisiert.
- K. Es folgte eine graduelle Druckentspannung, indem die Gasventile der KF an ein Nadelventil angeschlossen und der Druck langsam abgelassen wurde. Im Anschluss an dieses Verfahren konnten die Behälter (KF) geöffnet und beprobt werden.
- L. Falls die Hefe in Schwebenicht untersucht werden sollte, wurden die noch ungekühlten Fermenter zuerst – wie in Verfahrensschritt K beschrieben – geöffnet und dann Proben zentral aus mittlerer Füllhöhe über eine an einem Stativ befestigte 100 ml Pipette entnommen, bevor die Behälterabkühlung im Eisbad (siehe Verfahrensschritt J), die Homogenisierung und die Beprobungen erfolgten.

- M. Das gesamte Analysenmaterial wurde kalt für die verschiedenen Tests aufgeteilt und entsprechend der unten beschriebenen Methoden (Tabelle 6) umgehend weiterverarbeitet oder aus logistischen Gründen primär eingefroren ($-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$).



Abb. 21: Probenbehandlung bei Kleinf fermentationen

Nach jeder Beprobung wurden die Einzelsysteme (KF) manuell vorgereinigt und anschließend in einer Spülmaschine (*Gilowy Typ 25--03* und *Typ 2507*) nachgereinigt. Bei Bedarf konnte zusätzlich eine Autoklavierung der Edelstahl(druck-)behälter, d. h. der (KF), vorgenommen werden.

Die Tabelle 6 illustriert, wann welche Zwischen- und Fertigprodukte analysiert wurden. Die grau hinterlegten Parameter stellen dabei Experimente dar, die nur in Einzelfällen, nicht jedoch bei Standardversuchsreihen durchgeführt wurden.

Tabelle 6: Analysen für Standard-Laborfermentationen

Parameter	Anstellhefe	Würze vor Inokulation	angestellte Würze	während Hauptgärung	nach Hauptgärung	nach Lagerung	Methode
CO ₂ -Bildung			X		X	X	Gravimetrische (Differenz)Bestimmung
Extrakt/Stammwürze		X	X	X	X	X	MEBAK II 2.10.6.3
FAN		X	X	X	X	X	MEBAK III 3.3
pH-Wert			X	X	X	X	MEBAK II 2.14
Zuckerspektrum			X		X	X	MEBAK III 3.2.1
TBZ		X					MEBAK II 2.4
Endvergärungsgrad		X					MEBAK II 2.9.1.
Hefezellzahl (gesamt)	X		X		X	X	MEBAK 10.11.4.4
Biomasse (Zentrifugat)			X		X	X	gravimetrische Zentrifugatbestimmung 5000 rpm; 10 min; 4 °C; Rotor: 47, F10S
Viabilität der Hefe	X						MEBAK III 10.4.4.1
Zellen in Schwebe				X	X	X	MEBAK III 10.11.4.4
Ladungsmenge	X				X	X	Beschrieben in 5.3.1.1
Trübung					X	X	MEBAK II 2.15.1.2
VDK; (Gesamt)				X	X	X	WBBM 2.21.5.1
VDK: Diacetyl frei						X	MEBAK III 1.2.1
VDK: 2,3-Pentandion-frei						X	MEBAK III 1.2.1
GNP: Acetaldehyd				X	X	X	MEBAK III 1.1.1
GNP: Ethylacetat				X	X	X	MEBAK III 1.1.1
GNP: n-Propanol				X	X	X	MEBAK III 1.1.1
GNP: i-Butanol				X	X	X	MEBAK III 1.1.1
GNP: i-Amylacetat				X	X	X	MEBAK III 1.1.1
GNP: Amylalkohole				X	X	X	MEBAK III 1.1.1
SO ₂					X	X	WBBM 2.21.8.1
Schaum						X	WBMM 2.18.4
Sedimentation			X	X	X	X	Immhoffrichter
Verkostungen					X	X	3-Glas- // DLG- // beschreibende Verkostungen: Je 10 Verkoster/innen

5.1.3.3 Scale-up-Verhalten der Kleinfermenter (KF)

Ergebnisse aus Laborversuchen lassen sich oftmals nur bedingt auf industrielle Maßstäbe übertragen. Daher erfolgten komparative, parallele Versuche, in denen die Produkte, hergestellt unter variierenden Druckniveaus in KF, mit denen aus großtechnischen Gärungen in ZKTs verglichen wurden, um die bestmöglichen Prozessbedingungen für die Fermentationen im Labormaßstab zu determinieren.

Damit eine Vergleichbarkeit hinsichtlich der Anfangszellzahl, der Belüftungsraten und der Würzezusammensetzung für die Experimente gewährleistet werden konnte, wurden die industriellen Reaktoren (ZKTs) nach vollständiger Befüllung (8 Meter Füllhöhe) zunächst homogenisiert, indem mehrere CO₂-Stöße über die Befüllleitungen (an der Konusspitze) eingeblasen wurden. Anschließend erfolgte die Fermentatentnahme über die Probenahmeleitung nach großzügigem Vorschießen direkt in die KF, die umgehend nach der Befüllung mit jeweils 2 Liter verschlossen und zur Spundung und Temperierung in die Fermentationsanlage (siehe Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff.) am Institut eingebracht wurden. Zusätzlich wurde simultan das benötigte Probenmaterial entnommen und sofort auf 0 °C zur adäquaten Weiterverarbeitung abgekühlt. Die Analysen erfolgten nach den in der Tabelle 6 beschriebenen Methoden.

In einer ersten Versuchsreihe wurden so 21 KF befüllt und die Charakteristik des Ausgangsmaterials primär eruiert. Je 7 Behälter (KF) wurden dann auf 1,0 bar, 0,5 bar und 0,0 bar_ü gespundet, bevor Parallelfementationen bei identischen Temperaturführungen zu den Großtanks (9 °C für ca. 30 Stunden, 10 °C für etwa 96 Stunden, Abkühlung auf 4 °C innerhalb von 24 Stunden), vorgenommen wurden. Die Beprobung der ZKTs und der KF erfolgte simultan, jeweils in Intervallen von 24 Stunden. Insgesamt wurde der Versuch dreimal in aufeinanderfolgenden Wochen wiederholt.

Die im elektronischen Anhang EA11 dargestellten Analysen ergaben dabei, dass sich sowohl die Fermentationsverläufe, als auch die Gärungsnebenprodukte der Unfiltrate nach der Hauptgärung, unabhängig von den implementierten Überdrücken in den KF, nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Lediglich die Ergebnisse der 3-Glas-Blindverkostungen, bei denen die Proben aus den KF nach 7 Fermentationstagen gegen die Proben aus den zylindrokonischen Tanks verglichen wurden, wiesen darauf hin, dass die größte organoleptische Ähnlichkeit bei 0,5 bar_ü erreicht wurde. So konnten hier durchschnittlich mehr als 5 Panelteilnehmer/innen keine sensorischen Unterschiede erkennen. Hingegen wurden die Proben, die ohne Überdruck, sowie die Proben, die mit 1,0 bar_ü vergoren wurden, von durchschnittlich je 8 der 10 Verkoster/innen als andersartig beschrieben.

Basierend auf dieser Kenntnis erfolgte ein weiteres Experiment (3-Fach-Versuch), in dem zunächst das Fermentat – wie oben beschrieben – nach dem Anstellen und Homogenisieren aus dem Tank entnommen und damit 18 Module (KF) mit je 2 Liter befüllt wurden. Die Einheiten (KF) wurden anschließend mit Stickstoff vorgespannt und je 3 auf 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 bar_ü gespundet. Die Fermentationstemperatur wurde erneut identisch zu der in den Großtanks (ZKTs) gewählt.

Nach 7 Tagen erfolgten vergleichende 3-Glas-Blindverkostungen der unfiltrierten Proben aus den KF gegen die ZKT-Proben. Dabei wurde das Analysenmaterial aus beiden Systemen – wie bei den Versuchen zuvor – etwa 30 Minuten vor der Verkostung eingeschenkt, um einen vergleichbaren Karbonisierungsgrad zu erreichen.

Die komparativen Degustationen ergaben, dass die Proben, die bei 0,4 bar_ü in den KF vergoren wurden, organoleptisch denen aus den Großtanks (ZKTs) am ähnlichsten waren. So konnten durchschnittlich lediglich 40 % aller Panelteilnehmer/innen diese Proben richtig unterscheiden.

Weil die Füllhöhe in den atmosphärischen Großtanks 8 Meter entsprach und 0,4 bar_ü dem mittleren hydrostatischen Druck bei diesen Bedingungen entspricht, wurde im Anschluss entschieden einen Großteil der folgenden Versuche bei einem isobaren Spundungsdruck von 0,5 bar_ü durchzuführen, um Fermentationen in ZKTs mit 10 Meter Füllhöhe zu simulieren und dadurch eine verbesserte Vergleichbarkeit zu industriellen Gärungen (*Scale-up*) zu gewährleisten.

5.1.3.4 Testfermenter (TF50)

Neben den Versuchen in den KF mussten partiell auch Versuche in größeren Reaktoren erfolgen, die später für einen kontinuierlichen Betrieb beliebig modifiziert werden sollten. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 9 druckfeste, zylindrokönischen Testfermenter (TF50) mit 50 Liter Netto(Füll)volumen konstruiert .

Dabei wurden die in der Literatur als ideal angesehenen Auslegungsparameter bei der Gestaltung berücksichtigt, um ein möglichst praxisnahes Arbeiten zu ermöglichen.(198, 255)

Wie die Abbildung 22 verdeutlicht, bestehen die Tanks aus einem konischen Bodenteil mit 60° Neigungswinkel, der eine separate Kühlzone sowie einen Ein- und Auslauf in Nennweite DN 25 aufweist. Die Zarge ist in Höhe und Durchmesser derart ausgelegt, dass sich bei einer Befüllung mit 50 Liter Flüssigkeit ein Höhen- zu Durchmesser Verhältnis von 2:1 ergibt. Ferner wurde ein Steigraumvolumen von 35 % einbezogen.

Die 2 separaten und in der Höhe versetzten Zargenkühlungen sind so ausgeführt, dass eine Kühlung an der Flüssigkeits-Gas-Grenzfläche sowohl bei einer Befüllung mit 25 Liter als auch bei einer Befüllung mit 50 Liter gewährleistet werden kann. Außerdem befindet sich ein DN-25-Ein- und Auslauf mit Bajonettverschluss im oberen Tankbereich.

Zur Prozessüberwachung und Steuerung wurde sowohl ein Probenahmehahn als auch eine Hülse für ein Temperaturelement vorgesehen. Ferner erfolgte die Installation einer Isolierung für Konus und Zarge.

Der Tankdom wurde durch einen Klöpperboden realisiert, der in eine 14,5 cm breite, mit Spannverschlüssen versehene Öffnung mündet, die wahlweise mit Plexiglas oder Edelstahlelementen mittels Sternschrauben verschlossen werden kann. Dabei werden die Deckel wahlweise mit Spundungs- und/oder Reinigungselementen modifiziert.

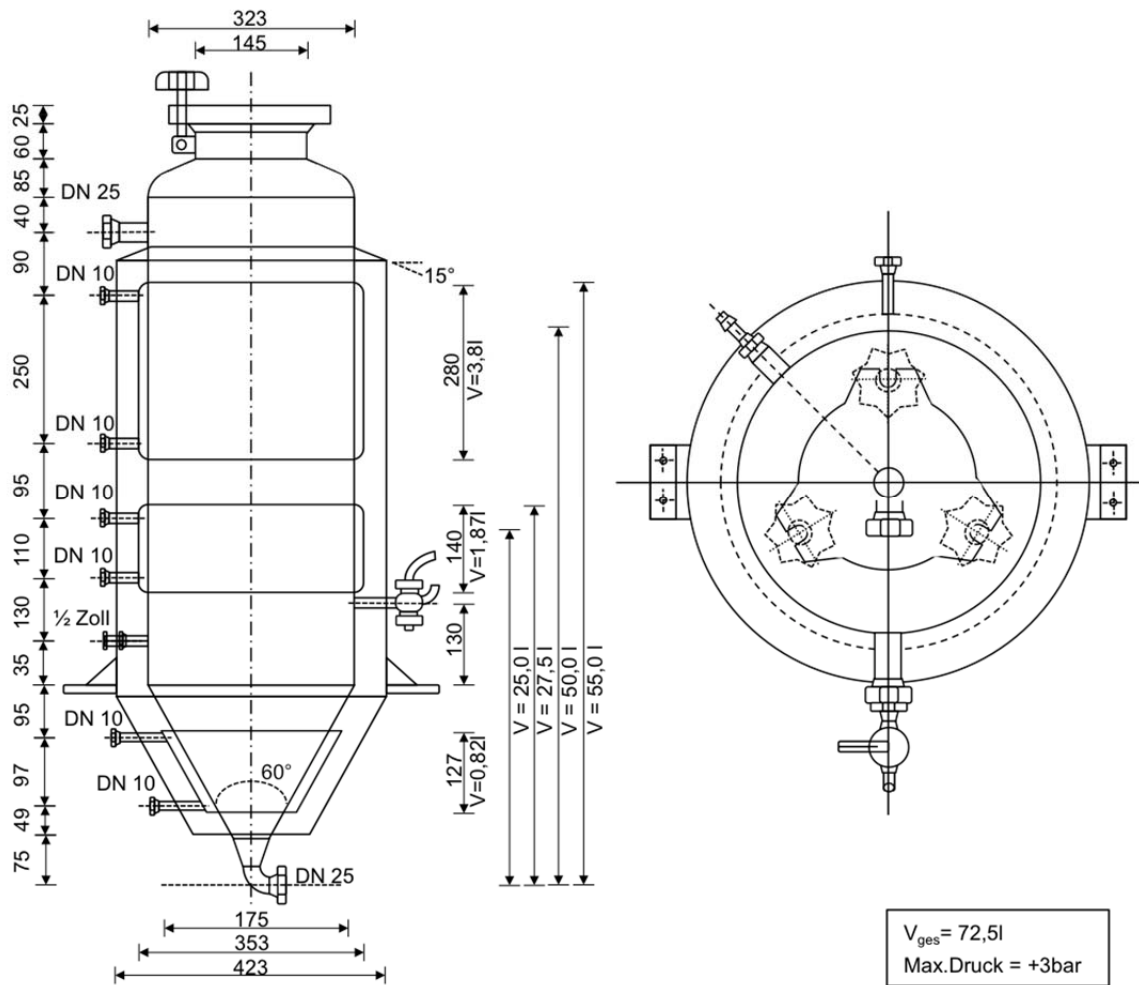


Abb. 22: Konstruktionsdetails des Testfermenters (TF50)

Um Kältemittel für die individuelle Temperierung der Tanks bereitzustellen, wurde eine Glycolkreislaufleitung vorgesehen, wobei der Vorlauf (VL) ein höheres Druckniveau als der Rücklauf (RL) aufweist (realisiert durch Drosselventil (DV)). Jeder Tank wurde so an das Kreislaufsystem angebunden, dass separate Konus- und Zargenkühlungen ermöglicht wurden.

Weil die Konuskühlung in der Praxis in der Regel erst nach der Hauptgärung zugeschaltet wird, um die angestrebten Abkühlraten zu realisieren und eine Hefeautolyse zu verhindern, erfolgte die Anbindung dieser Zonen jeweils so, dass eine Steuerung nur durch die manuelle Betätigung eines Kugelhahns möglich ist.

Der Kältemittelfluss in den Zargenkühlzonen hingegen wird mithilfe eines Magnetventils (MV) geregelt. Bei Überschreitung einer wählbaren Zieltemperatur, die in der tankinternen, mittels Kreiselpumpe (KL) betriebenen Zirkulationsleitung gemessen wird (Temp. KL), erfolgt eine Ventilöffnung (MV) für eine individuell definierbare Zeiteinheit. Durch den höheren Druck in der Glycolvorlaufleitung (VL) wird so wärmeres Glycol im internen Kreislauf durch kälteres verdrängt und über die Rücklaufleitung (RL) ausgeschleust, die zudem mit Rückschlagventilen (RSV) ausgestattet ist.

Ob lediglich die untere Zargenkühlzone betrieben wird oder beide, kann manuell bedarfsorientiert entschieden werden. Die Temperatur im Tankinneren (Temp. (I)) dient lediglich der Prozessüberwachung (vgl. Abb. 23).

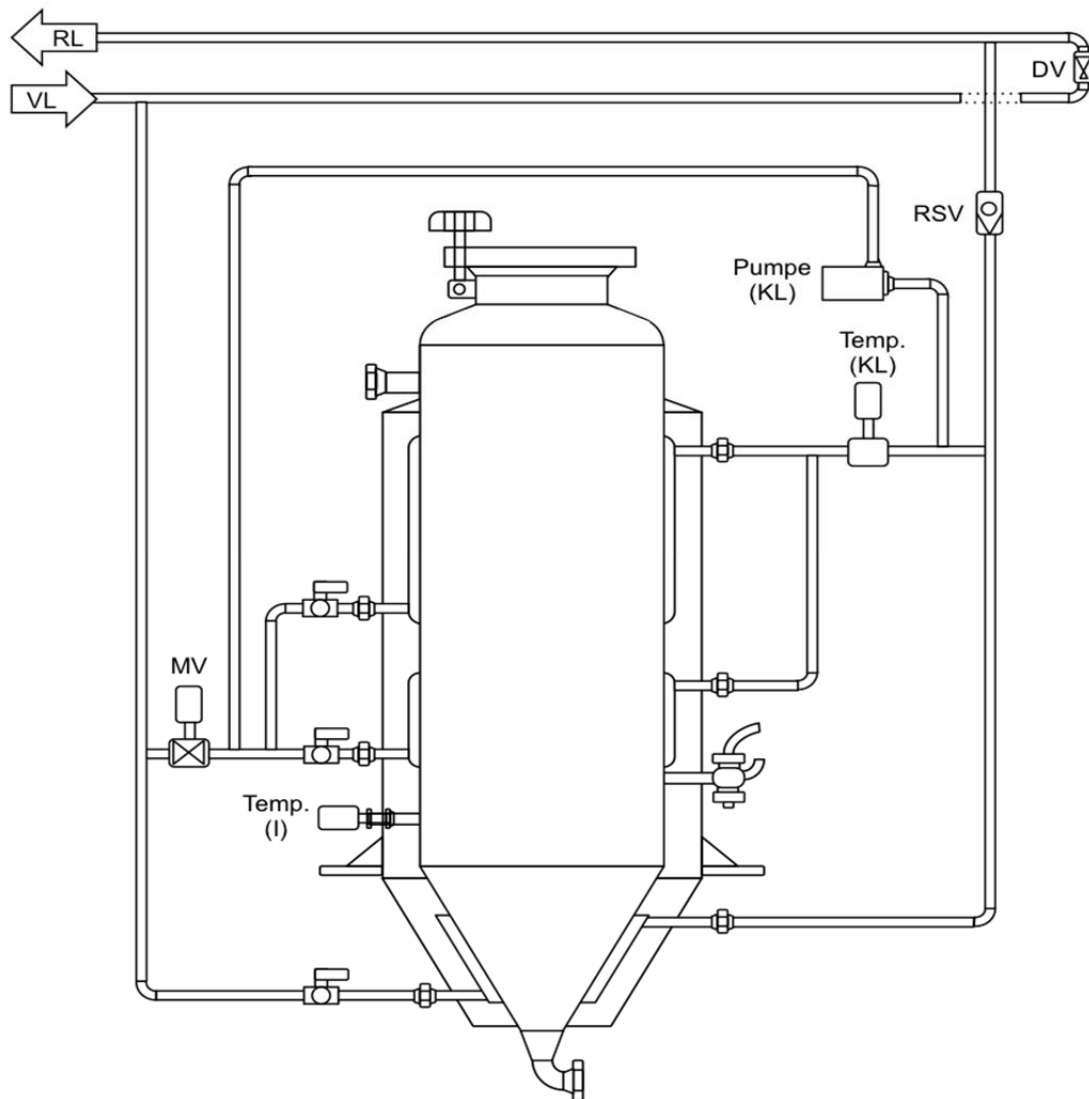


Abb. 23: Prozessanbindung des Testfermenters (TF50)

Die Systemsteuerung erfolgt durch eine *Allen Bradley, Rockwell* Automatisierung, wobei für Gärungen, wenn nicht anders vorgegeben, folgende Systemkonfigurationen primär eingestellt wurden:

Magnetventil (MV) 10 Sekunden lang öffnen, sobald die Zieltemperatur im Kreislauf (Temp. KL) um 1 K überschritten wird, dann 30 Sekunden pausieren und den Vorgang ggf. wiederholen.

Durch die beschriebene Konfiguration konnten unterschiedlichste Fermentationsszenarien variabel eingestellt und überprüft werden. Die Abbildung 24 veranschaulicht die Realisierung und Integration der hier entwickelten Anlage in die Forschungsbrauerei.



Abb. 24: Installation der Testfermenter (TF50) in der Forschungsbrauerei

5.1.3.5 (Batch-)Versuche in Testfermentern (TF50)

Um die Tauglichkeit und Vergleichbarkeit dieser Behälter (TF50) zu den KF und zu industriellen Tanks (ZKTs) zu evaluieren, wurden anschließend vergleichende Experimente durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine ähnliche Standardarbeitsweise zur Befüllung, Inokulation und Fermentationssteuerung gewählt, wie sie bereits in Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff. detailliert für die Versuche in den KF beschrieben wurde.

Allerdings erfolgte bei Gärungen in den Testfermentern (TF50) die Befüllungen der Tanks mit 50 Liter vortemperiertem Substrat von unten (über den am Konus befindlichen DN-25-Ein- und Auslaufstutzen), indem die zuvor mit Würze befüllten, abgewogenen KEGs mit Stickstoff (1,5 bar_ü) beaufschlagt wurden, sodass ein Fluidtransfer aufgrund der Druckdifferenz resultierte.

Zum Anstellen wurde die Hefe (siehe Kapitel 5.1.2.1, S. 38 ff. / 5.1.2.2, S. 40) nun von oben in die Reaktoren gegeben, bevor die Tanks mit Deckeln verschlossen und ein Spunddruck von 0,5 bar eingestellt wurde. Anschließend wurde von unten 300 Sekunden lang Sterilluft eingeleitet (100 ml/min), sodass ein Sauerstoffgehalt von 6,5–7,5 mg O₂/l (getestet mithilfe eines portablen Sauerstoffmessgerätes Marke: *Orbisphere*) und eine angestrebte Homogenisierung gewährleistet werden konnten. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Zellzahl und ggf. eine Korrektur der selbigen mit Hefe oder Würze.

Ab diesem Zeitpunkt erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, Probenahmen in Intervallen von 24 Stunden, wobei dazu das benötigte Volumen über den an der Zarge angebrachten Probenahmehahn abgelassen und entsprechend gekühlt weiterverarbeitet wurde.

Weitere Parameter wie Standard- und Sonderanalysen können der Tabelle 6, S. 45, entnommen werden.

5.1.3.6 Scale-up-Verhalten der Testfermenter (TF50)

Um sowohl die Vergleichbarkeit der Testfermenter (TF50) zu den KF, als auch deren *Scale-up*-Verhalten zu evaluieren, erfolgte nach der Installation und Inbetriebnahme der Anlage eine Versuchsreihe mit vergleichenden Fermentationen. Dazu wurden – wie im Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff. beschrieben – 200 Liter angestelltes Fermentat aus einem zuvor homogenisierten, industriellen Reaktor entnommen und dieses bei identischer Temperaturführung in den unterschiedlichen Laborsystemen (21 KF und 3 Testfermenter (TF50)), aufgrund der in Kapitel 5.1.3.3, S. 46 ff. beschriebenen Erkenntnisse, simultan und isobar, bei 0,5 bar Spunddruck, vergoren.

Wohingegen die Tankbeprobungen des industriellen Reaktors und der Testfermenter (TF50) klassisch über die dazu vorgesehenen Installationen (Probenahmehähne) erfolgten, wurden täglich – wie im Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff. beschrieben – drei KF aus der Temperiereinheit entnommen und deren Inhalte vollständig individuell analysiert, um eine Beeinflussung der in der Anlage verbleibenden Behälter auszuschließen.

Obgleich Schwankungen der pH-Werte aus den ZKTs keine sinnvolle Beurteilung dieses Parameters zuließen, verdeutlichen die im elektronischen Anhang (EA13) dargestellten Analysenergebnisse, dass sowohl der Extraktabbau, als auch die Aufnahme des FAN-Gehaltes in dem industriellen Tank marginal schneller bzw. weitreichender waren als in den sich praktisch kongruent zueinander verhaltenden Laborfermentern (KF und TF50).

Auch die Unfiltratproben, die 168 Stunden nach dem Anstellen entnommen wurden, wiesen analytisch geringfügige, systemspezifische Abweichungen auf. So enthielten die Proben aus dem industriellen Tank tendenziell etwas weniger höhere Alkohole, Acetate und Ester.

Für den degustativen Vergleich wurden zunächst alle unfiltrierten Fermentate auf 20 °C temperiert und 30 Minuten vor der Verkostung eingeschenkt, um einen vergleichbaren Karbonisierungsgrad zu erreichen. Die 3-Glas-Blindverkostung gegen die Probe aus dem industriellen Tank ergab, dass lediglich je 4 der 10 geschulten DLG-Verkoster/innen die Produkte aus den Laborfermentern – sowohl die aus den Kleinfementern (KF) als auch die aus den Testfermentern (TF50) – als andersartig detektierten.

Trotz der geringfügigen analytischen Unterschiede, die möglicherweise auf eine unzureichende Homogenisierung des Großtanks, die zeitlich leicht versetzte Probenahme und/oder den Probentransport zurückzuführen sind, konnte somit in dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass sich in beiden hier entwickelten Laborsystemen (KF und TF50) – bei Implementierung identischer Bedingungen und dem Einstellen eines Spundungsdrucks, der dem mittleren hydrostatischen Druck eines industriellen Fermenters entspricht – vergleichbare Produkte herstellen lassen und *Scale-up*-Einschätzungen hinreichend genau ermöglicht werden.

5.2 Auswirkung technologischer Stellglieder

Bekanntermaßen gibt es technologische Variablen, die einen direkten Einfluss auf den Metabolismus von Hefen und somit auf die Fermentation haben. Dazu gehören bspw. die Substratzusammensetzung, die Substratbelüftung, die Fermentationstemperatur, der Spunddruck, der Hefestamm und der Zustand der Kulturen (inklusive Vitalität, Viabilität, Alter, Zellgröße, genetische Stabilität etc.).

Obwohl die Auswirkungen dieser Faktoren bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen allgemein beschrieben wurden, mussten im Rahmen dieser Arbeit exakte Daten und Kennzahlen für die hier implementierten Prozessparameter in diskontinuierlichen Modellfermentationen experimentell generiert werden, insbesondere um systematische Abhängigkeiten zu detektieren und den Einfluss der kontinuierlich betriebenen Reaktoren bzw. des Kaskadendesigns sowie das der gewählten Einstellungsparameter adäquat beurteilen und ggf. optimieren zu können.

In Kapitel 3.6.2, S. 22 ff. werden die jeweiligen Grundlagen zu den hier getesteten technologischen Stellglieder zusammengefasst und auf spezifische Besonderheiten bei kontinuierlichem Betrieb eingegangen.

5.2.1 Variationen der Anstellzellzahl, Gärtemperatur und Belüftungsraten

Wie in Kapitel 3.6.2, S. 22 ff. beschrieben, haben sowohl die initiale Biomassekonzentration zu Fermentationsbeginn (Kapitel 3.6.2.1, S. 22 ff), die gewählten Fermentationstemperaturen (Kapitel 3.6.2.2, S. 23 ff.) sowie die Würzebelüftungsraten (Kapitel 3.6.2.3, S. 24 ff.) einen entscheidenden Einfluss auf die biokinetischen Prozessabläufe während der Gärung.

Aus diesem Grund erfolgten zunächst isobare Modellfermentationen mit 0,5 bar_ü unter standardisierten Bedingungen in KF bei 10, 15 und 20 °C, wobei jeweils Anstellzellzahlen von 10, 30, 50, und 100 Mio. HZ/ml verwendet und die Belüftungsraten so variiert wurden, dass Substrate mit 2–4 mg O₂/l (unbelüftet) und 6–8 mg O₂/l (belüftet) resultierten (Methode: siehe Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff.).

Nachfolgend werden die wichtigsten Analysenergebnisse dieser Versuchsreihen zunächst tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 7), bevor eine mathematische Beschreibung ausgewählter Parameter erfolgt.

Auf eine Differenzierung zwischen belüfteten und unbelüfteten Proben wurde dabei verzichtet, weil bei keiner Versuchsreihe statistisch signifikante Einflüsse dieses Parameters ersichtlich wurden, was vermutlich an dem physiologisch guten Zustand und ausreichendem Sauerstoffsättigungsgrad der Anstellhefe lag.

Die Einzelauswertungen, die als Referenz für den kontinuierlichen Betrieb dienten, finden sich im elektronischer Anhang: EA15.

Tabelle 7: Variationen der Anstellkonzentration und Fermentationstemperaturen (0,5 bar)

Parameter		Auswirkungen isothermer Erhöhungen der Anstellzellzahlen				Auswirkungen erhöhter Fermentationstemperaturen bei konstanten Zellzahlen		
		10 °C	15 °C	20 °C	Grad	10→15 °C	15→20 °C	Grad
HG-Parameter	Extraktabbau	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	Lag-Phase	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	Alkoholbildung	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	pH-Wertreduktion	++++	-	-	X	++++	+++	T
VDK	Diacetylbildung	++++	++	++++	T	++++	++++	S
	2,3-Pentadionbildung	++++	++	++++	T	++++	++++	S
	Acetaldehydbildung	-	-	+	X	++	+	X
Alkohole	Propanolbildung	+	+	+	X	+++	-	X
	i-Butanolbildung	+	+	+	X	++	-	X
	Amylalkoholbildung	+	+	+	X	-	+	X
		Ester						
Ester	Ethylacetatbildung	+	+	-	X	-	-	X
	Isoamylacetat	+	-	-	X	++	++	T
Bio.	Zellzahlzunahme	+++	+++	++++	T	++++	++++	S
	Biomassezunahme	+++	+++	++++	S	++++	+	T
Zucker	Fruktoseabbau	-	-	++++	T	++	++	T
	Glukoseabbau	+++	++	+	T	+++	+++	T
	Maltoseabbau	++++	++++	+++	T	++++	++	T
	Maltotrioseabbau	++++	++++	+++	S	++++	++	T
FAN	FAN-Abbau nach 24 h	+++	++++	++++	S	++++	++++	S
	FAN-Abbau (gesamt)	-	-	++	T	++++	+	S
Gruppe A	Asparaginsäureabbau	-	+++	+++	T	++++	++++	S
	Asparaginabbau	-	X	X	X	++++	++++	S
	Serinabbau	-	++++	X	X	++++	++++	S
	Glutaminsäureabbau	++	++	++	T	++++	++++	S
	Glutaminabbau	-	++	++	T	++++	+++	S
	Lysinabbau	-	+	+++	T	++++	++++	S
	Argeninabbau	-	-	+	T	++++	++	T
Gruppe B	Threoninabbau	-	+++	++	T	++++	++	T
	Methioninabbau	-	+++	+++	T	++++	++++	S
	Isoleucinabbau	+	+	++	T	++++	++++	S
	Leucinabbau	-	++	++++	T	++++	++++	S
	Valinabbau	-	+	+++	T	++++	++++	T
Gruppe C	Histidinabbau	-	-	-	X	++++	+	T
	Phenylalaninabbau	-	+	+++	T	++++	++++	S
	Alaninabbau	-	-	+++	T	++++	+++	S
	Tyrosinabbau	-	-	+	X	++++	+++	T
	Glycinabbau	-	-	-	X	++++	-	T
	Tryptophanabbau	-	-	-	X	++	++	X
	Gammaabbau	-	-	-	X	+++	-	X

In den verglichenen Versuchsreihen bei 0,5 bar₀:
++++ = keine Abweichungen // +++ = einzelne Ausreißer // ++ = eine naheliegende Abweichung //
+ = eine grobe Abweichung // - keine logische Reihe
S = signifikant // T = tendenziell // X = kein Trend erkennbar

Wie der tabellarischen Übersicht und der dunkelgrauen Hinterlegung entnommen werden kann, unterliegen der Extraktabbau, die Zeit, bis die Lag-Phase überwunden wird, die Alkoholbildung sowie der FAN-Abbau in den ersten 24 Stunden nach dem Anstellen klaren Gesetzmäßigkeiten. So steigen hier alle Reaktionsgeschwindigkeiten signifikant (S) mit Erhöhung der Anstellzellzahlkonzentrationen und der Fermentationstemperaturen an. Diese Tatsache ermöglicht folgende mathematische Beschreibung der genannten Parameter:

5.2.1.1 Extraktabbau

Da dichteerhöhende, fermentierbare Zucker das Edukt alkoholischer Gärungen darstellen, gilt der Extraktabbau als wichtigster Parameter zur Prozessüberwachung und Steuerung von Fermentationen.

Weil jede Versuchsreihe separat erfolgte, variierten die initialen Extraktgehalte nach dem Anstellen geringfügig (Standardabweichung: 0,194 °Plato).

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Extraktreduktionen zu gewährleisten, wurden daher alle Gehalte prozentual auf den jeweiligen Ausgangswert bezogen und abschließend auf den mittleren Extraktgehalt über alle Versuche (11,81 °Plato) zurückgerechnet.

Die Abbildung 25 veranschaulicht die Versuchsergebnisse. Dabei werden die Kurven umso dicker dargestellt, je mehr Zellen zum Anstellen verwendet wurden.

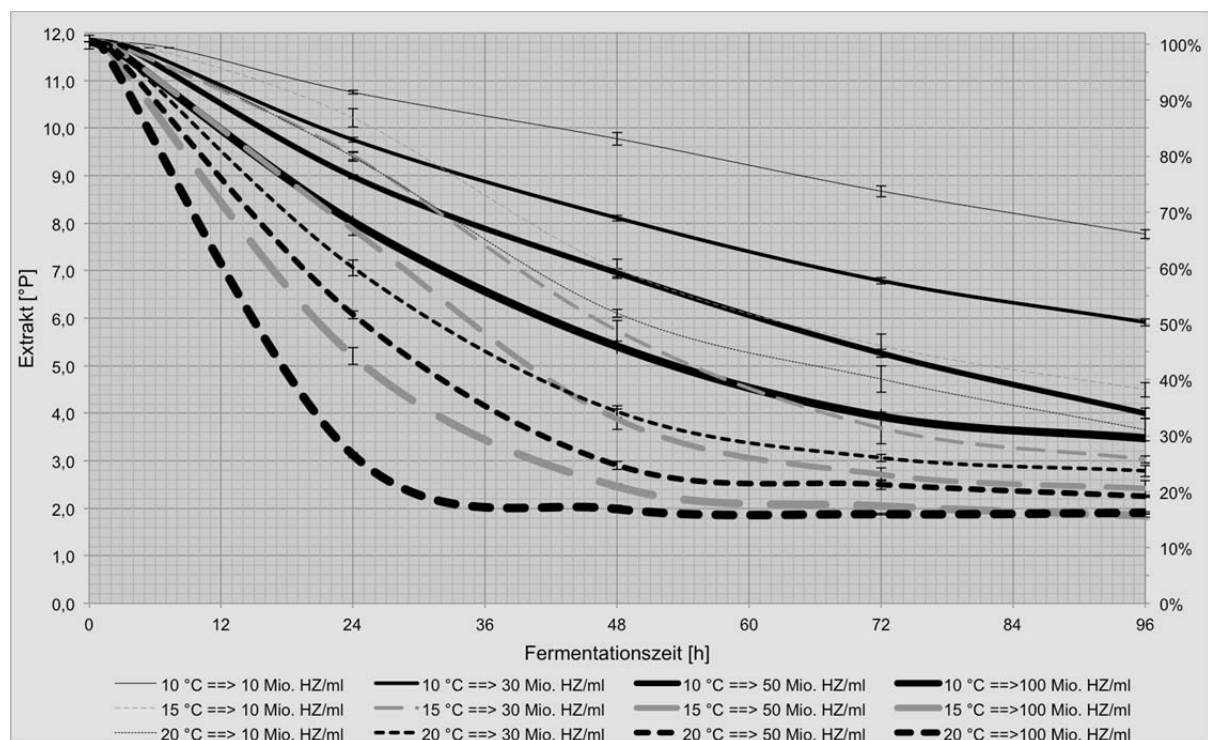


Abb. 25: Extraktabbau i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temperatur

Wie illustriert, beschleunigten sich die Fermentationen mit zunehmender, initialer Organismenkonzentration und Fermentationstemperatur.

Um die Effekte besser bewerten zu können, wurden anhand der generierten Ergebnisse mathematische Gleichungen pro abgebautem Grad Plato (°P) ermittelt, um die einzelnen Fermentationsstadien in Abhängigkeit der Anstellhefemenge und Gärtemperatur approximativ zu beschreiben (Tabelle 8). Die graphischen Darstellungen der einzelnen Abbaugrade findet sich dabei im Anhang 9 (Abb. 87–Abb. 95).

Tabelle 8: Arithmetische Korrelationen des Extraktabbaus (0,5 bar)

Extraktreduktion von durchschnittlich	Formel	grafische Darstellung
Hefe: TUM 34/70 // Zeit: [h] // ZZ: [Mio. HZ/ml] // Temp.: [°C] // Würzecharakter: vgl. Tabelle 2		
Abbau um 1 °Plato (11,81 °P → 10,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 1^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,757}]{\frac{ZZ}{29299 * e^{-0,191 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 87 S. 130
Abbau um 2 °Plato (11,81 °P → 9,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 2^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,7113}]{\frac{ZZ}{23031 * e^{-0,12 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 88 S. 131
Abbau um 3 °Plato (11,81 °P → 8,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 3^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,7773}]{\frac{ZZ}{49632 * e^{-0,119 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 89 S. 131
Abbau um 4 °Plato (11,81 °P → 7,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 4^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,8423}]{\frac{ZZ}{110853 * e^{-0,127 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 90 S. 132
Abbau um 5 °Plato (11,81 °P → 6,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 5^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,903}]{\frac{ZZ}{173943 * e^{-0,115 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 91 S. 132
Abbau um 6 °Plato (11,81 °P → 5,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 6^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,8797}]{\frac{ZZ}{293209 * e^{-0,131 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 92 S. 133
Abbau um 7 °Plato (11,81 °P → 4,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 7^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-1,781}]{\frac{ZZ}{504416 * e^{-0,162 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 93 S. 133
Abbau um 8 °Plato (11,81 °P → 3,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 8^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-2,1449 * e^{-0,014 * \text{Temp.}}}]{\frac{ZZ}{5 * 10^6 * e^{-0,293 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 94 S. 134
Abbau um 9 °Plato (11,81 °P → 2,81 °P)	$Zeit_{\text{Abbau } 9^{\circ}\text{P}} = \sqrt[{-2,6797 * e^{-0,031 * \text{Temp.}}}]{\frac{ZZ}{7 * 10^7 * e^{-0,442 * \text{Temp.}}}}$	Abb. 95 S. 134

Durch Verwendung adäquater Rechenoperationen ermöglicht diese Art der Auswertung – neben den im Anhang 9, S. 130 ff. gezeigten Darstellungen – eine algebraische Vorhersage und Beurteilung von Fermentationsverläufen.

Dazu wurde im Rahmen der Vorstudie überprüft, wie sich eine Variation der Anstellzellzahl und der Temperatur auf die Produktivität der Hefezellen auswirkt. Die Analyse ergab dabei, dass sich bei Fermentationen die zwischen 10 und 100 Mio. HZ/ml angestellt werden, eine vom Gärgrad/Extraktabbau und von der Temperatur unabhängige Produktivitätsreduktion [%] mit Erhöhung der Initialen Biomassekonzentration [Multiplikationsfaktor: MF] einhergeht.

Dieser systematische Zusammenhang wird nachfolgend illustriert (Abb. 26) und lässt sich durch die Formel 3 mit hohem Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,996$) approximieren:

$$\text{Produktivitätsverlust [\%]} = \frac{-95,159658 + 97,392794 * MF^{0,489658564}}{0,022641833 + MF^{0,489658564}} \quad \text{Formel 3}$$

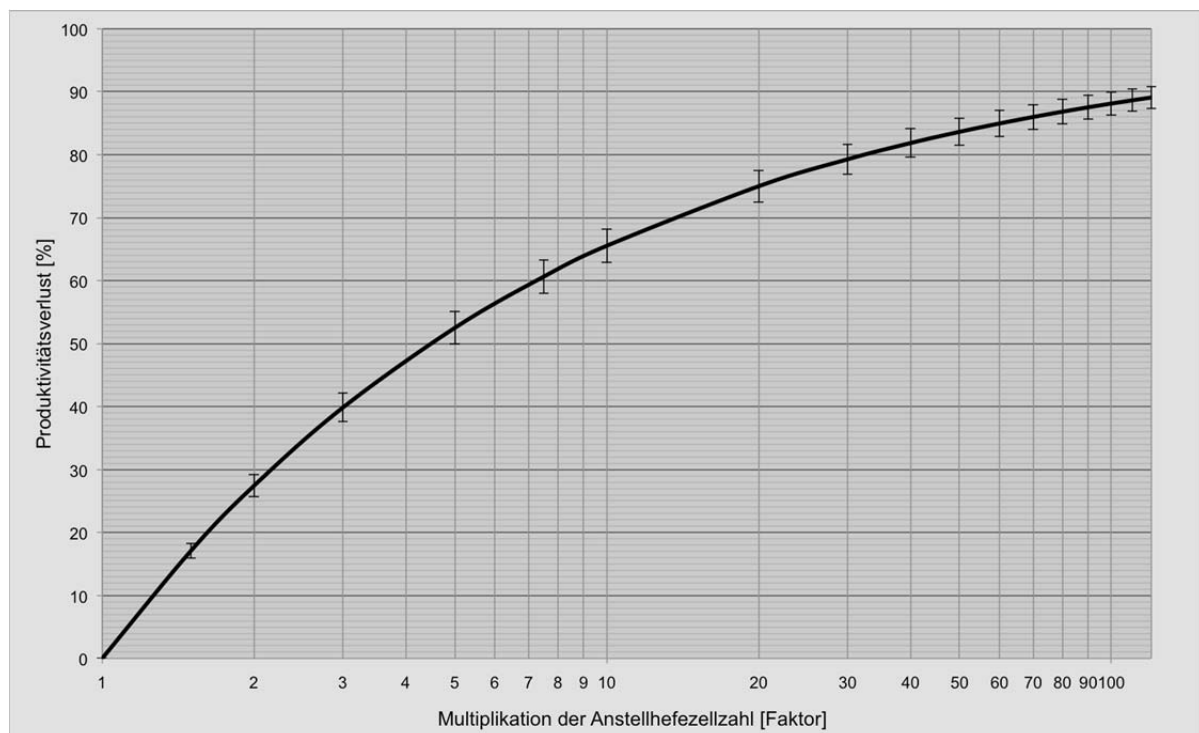


Abb. 26: Produktivitätsverlust von Hefe i. Abh. d. Inokulationsgehalte

Die Abbildung 26 verdeutlicht, dass Vervielfältigungen der Inokulationsmengen – insbesondere bei geringen Multiplikationsfaktoren – zu signifikanten Verlusten der Produktivitätsraten führen.

So verdreifacht sich bspw. die Fermentationsgeschwindigkeit nicht bei einer Verdreifachung [Faktor 3] der Anstellzellzahl, sondern nimmt komparativ um rund 40 % ab, wodurch sich lediglich eine 1,8 fache (Faktor $3 \times (1 - 0,4)$) reale Prozessbeschleunigung ergibt.

Basierend auf diesen kausalen Zusammenhängen lässt sich für genannte Bedingungen folgende allgemeingültige Formel bestimmen (Tabelle 9):

Tabelle 9: Universalformel zur Berechnung von Batchgärungen

Extraktabbau i. Abh. d. Temperatur	zellzahlabhängiger Faktor
Gültigkeitsbereich: 11,81 °Plato SW; 10–100 Mio. HZ/ml; 0,5 bar _ü	
$\text{Zeit} = (a * \text{Ext.}^3 + b * \text{Ext.}^2 + c * \text{Ext.} + d) * \left(\frac{30}{\text{ZZ} * \left(1 - \frac{e * f + g * \text{ZZ}^h}{f + \text{ZZ}^h} \right)} \right)$	
$a = 0,04163 * \text{Temp.} - 0,9036$	$e = -77,761$
$b = -1,125 * \text{Temp.} + 24,25$	$f = 0,0666$
$c = 10,34 * \text{Temp.} - 225,6$	$g = 0,9555$
$d = -33,82 * \text{Temp.} + 771,5$	$h = 0,4982$
Zeit [h] // Restextrakt (Ext.) [°Plato] // Temperatur (Temp.) [°C] // Zellzahl (ZZ) [Mio. HZ/ml]	

In der Abbildung 27 werden die realen, experimentell ermittelten Extraktabbauraten [R] den mithilfe dieser Formel berechneten Extraktabbauraten [B] gegenübergestellt, um die geringfügigen Varianzen zu verdeutlichen.

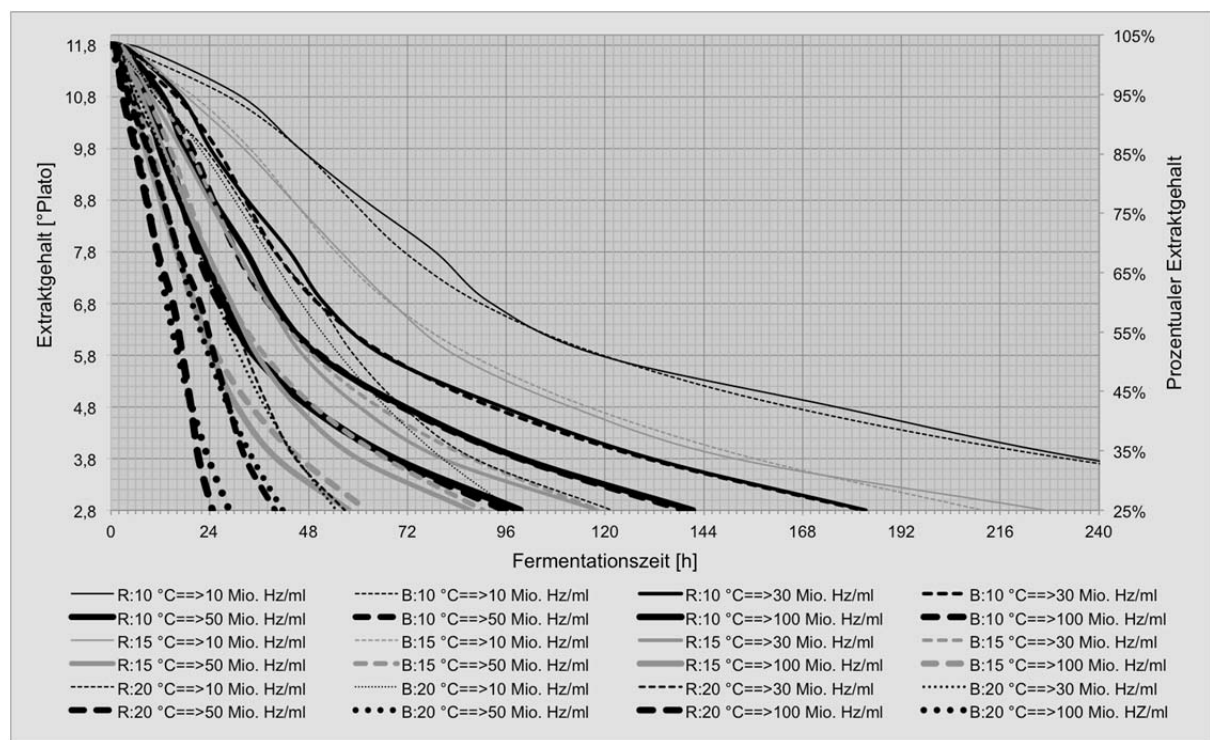


Abb. 27: Abweichungen der Universalformel zu empirisch ermittelten Werten

Wie der Abbildung 27 entnommen werden kann, sind die Abweichungen zwischen den empirisch determinierten Daten [R] und den über die Formel (Tabelle 9) berechneten Werten [B] äußerst gering.

Somit kann eine hinreichend genaue Vorhersage der Fermentationsverläufe durch Applikation der Formel (Tabelle 9) erfolgen.

5.2.1.2 Alkoholgehalt

Die Abbildung 28 zeigt die Alkoholbildung in Abhängigkeit der Anstellhefezellzahl und der Fermentationstemperatur während der Experimente. Aus der Graphik geht hervor, dass die Alkoholbildung durch wärmere Fermentationstemperaturen und höhere Anstellmengen amplifiziert wird.

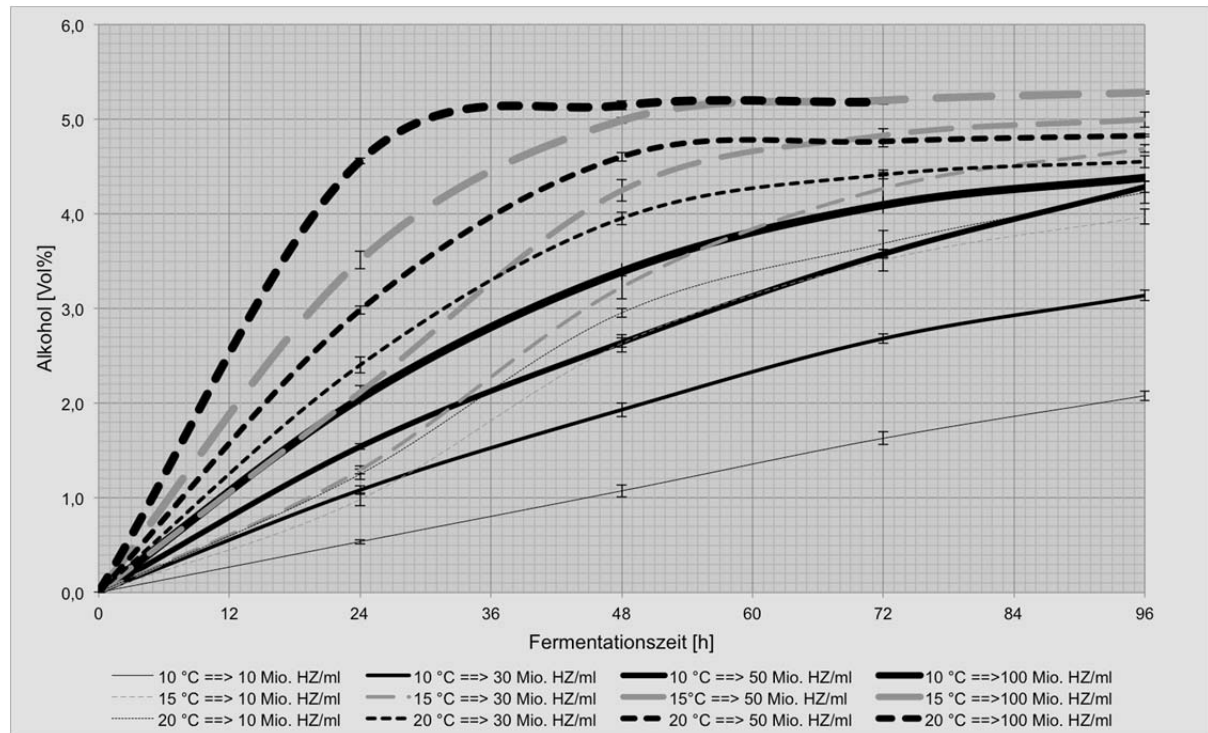


Abb. 28: Alkohol i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temperatur

Allgemeine mathematische Korrelationen zwischen dem Extrakt(Zucker)abbau und der Alkoholbildung werden beispielsweise von Gay-Lussac und Balling beschrieben.(256, 257)

Dennoch wurde auch im Rahmen dieser Arbeit eine entsprechende, individuelle Gesetzmäßigkeit determiniert, die hier mit einem Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,999$) durch die Formel 4 beschrieben werden kann:

$$\text{Alkoholgehalt} \left[\frac{\text{Gew}\%}{\text{Vol}\%} \right] = 0,5267 * (\text{Extraktabbau} [^{\circ}\text{P}]) + 0,0024 \quad \text{Formel 4}$$

Die reziproke Korrelation zwischen Alkoholbildung und Extraktabbau wird nachfolgend (Abb. 29) illustriert.

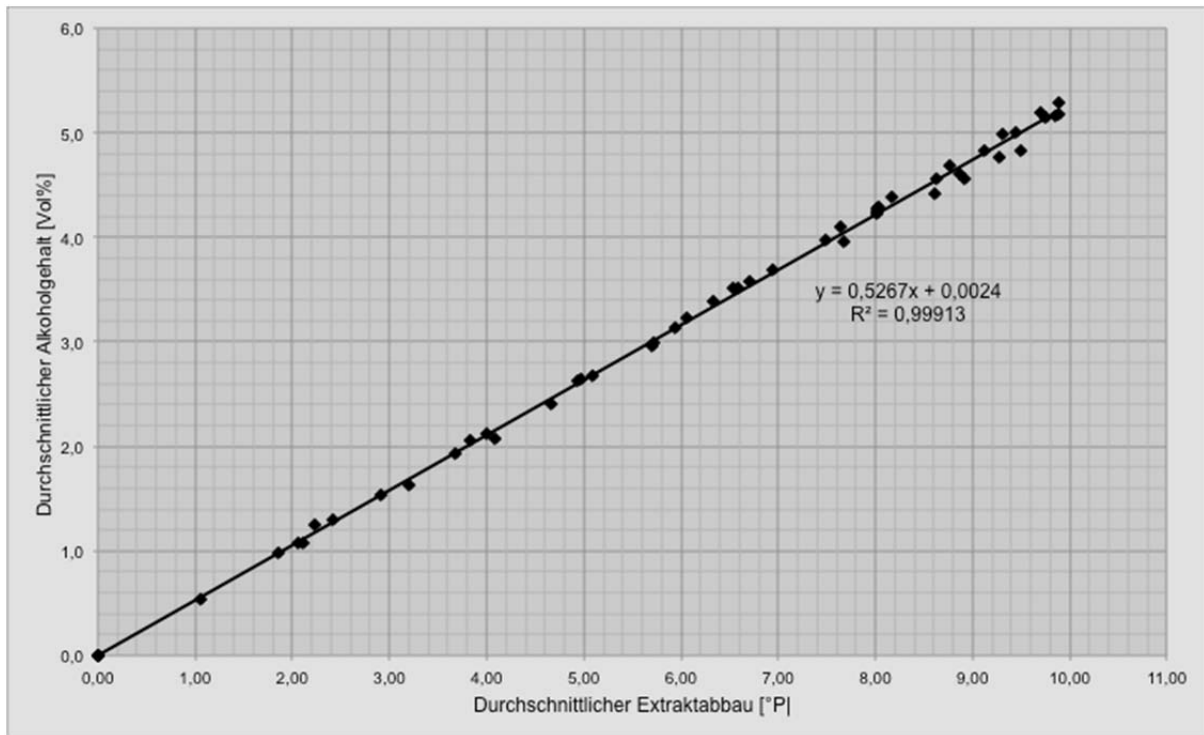


Abb. 29: Alkoholbildung i. Abh. d. Extraktabbaus

Aufgrund des hohen Bestimmtheitsmaßes ($R^2 = 0,999$) wird auf eine grafische Auswertung der singulären mathematischen Beziehungen verzichtet und auf die Formel in Tabelle 9 der Extraktabbauraten (Kapitel 5.2.1.1, S. 54 ff.), verwiesen, die entsprechend umformuliert werden kann, wodurch eine zeitliche Beurteilung der temperatur- und zellzahlabhängigen Alkoholbildung möglich wird.

5.2.1.3 Zeit zum Überwinden der Lag-Phase

Nach der Überführung in Substrat setzt der Metabolismus von Mikroorganismen üblicherweise verzögert ein, da zunächst eine Adaption an die Medien und die dort vorherrschenden Bedingungen erfolgt. Dieser Zyklusabschnitt wird auch als sogenannte Lag-Phase bezeichnet.

Der Eintritt exponentieller Stoffwechselforgänge (Log-Phase) kennzeichnet das Ende dieses Prozesses und wurde hier mithilfe der Erfassung eines signifikanten Druckanstieges in geschlossenen Systemen (Methode: Kapitel 5.3.1.2, S. 70 ff.) wie folgt (Formel 5) bestimmt.

$$Zeit_{LAG-Phase} = \sqrt[{-1,90833}]{\frac{ZZ}{1298,2 * e^{-0,108 * Temp.}}} \quad \text{Formel 5}$$

Die grafische Darstellung dieses Zusammenhangs (Formel 5) verdeutlicht, dass wärmere Fermentationstemperaturen [Temp.: °C] und Steigerungen der Anstellzellzahlen [ZZ: Mio. HZ/ml] zu einer beschleunigten Überwindung der Lag-Phase führen. Dieser Effekt wirkt sich bei kalten Fermentationstemperaturen und geringen Anstellkonzentrationen besonders stark aus (vgl. Abb. 30).

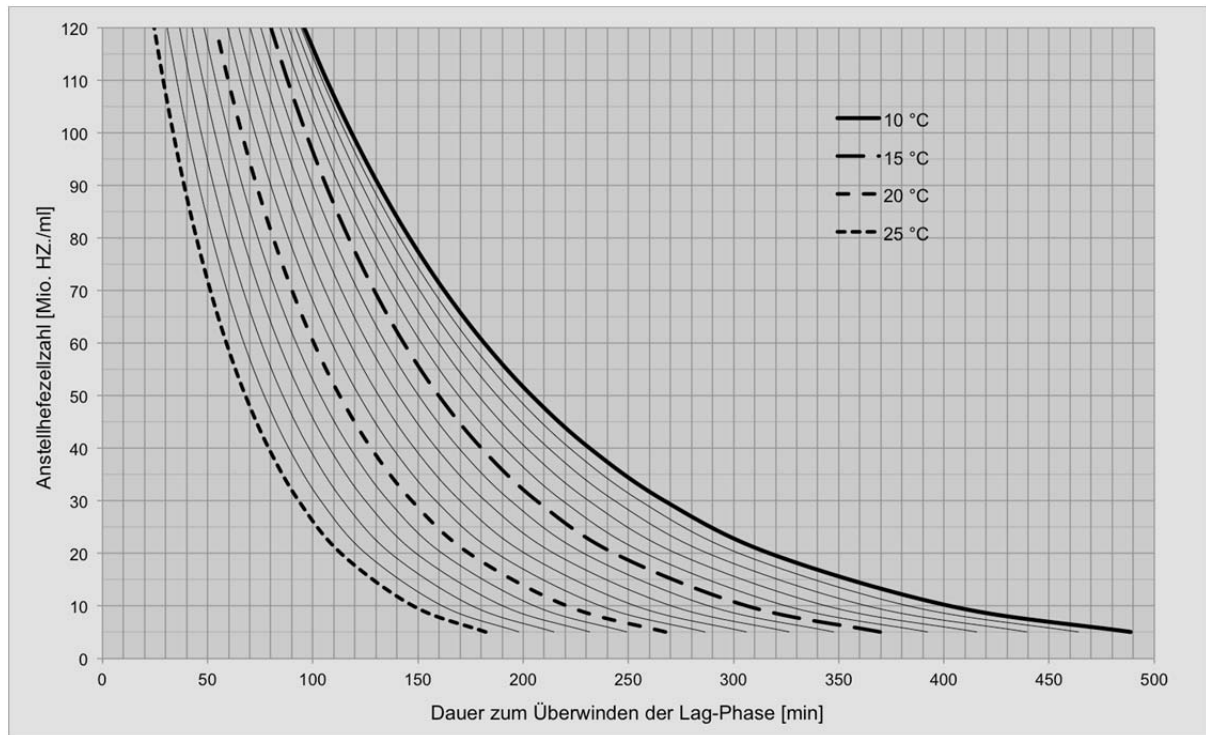


Abb. 30: Überwindung der Lag-Phase i. Abh. d. Anstellhefemenge und der Temperatur

5.2.1.4 FAN-Aufnahme 24 Stunden nach dem Anstellen

Der freie α -Aminostickstoff (FAN) ist essenziell für den Ablauf bestimmter Stoffwechselfvorgänge und die Bildung von Biomasse (Zellteilung). Durch die Beurteilung des Abbaugrades in Abhängigkeit von der Fermentationszeit können mithilfe dieses Parameters Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der Kulturen erfolgen.

Wie in der Tabelle 7 und im elektronischen Anhang (EA15) dargestellt, konnten hier jedoch lediglich nach dem Ablauf eines 24-stündigen Zeitintervalls durchweg logische, zellzahl- und temperaturabhängige Versuchsergebnisse ermittelt werden, die sich durch die Formel 6 darstellen lassen:

$$FAN_{\text{Abbau } 24h} = \ln \left(\frac{ZZ}{-0,005 * Temp.^2 + 0,16 * Temp. - 0,88} \right) * (0,001 * Temp.^2 + 0,0375 * Temp. - 0,245)$$

Formel 6

Somit wird bei wärmeren Fermentationstemperaturen [Temp.: °C] und höheren Anstellzellzahlgehalten [ZZ: Mio. HZ./ml] deutlich mehr FAN [%] verstoffwechselt, wie die Abbildung 31 illustriert.

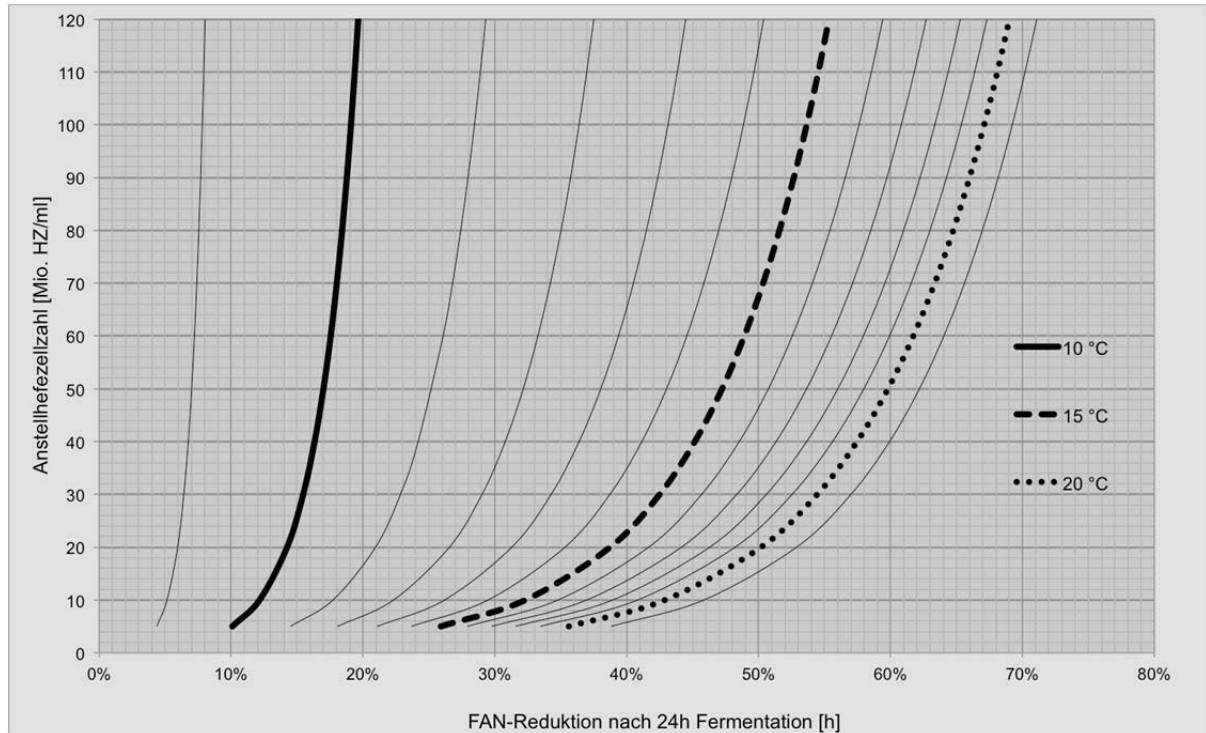


Abb. 31: FAN-Abbau nach 24 Stunden i. Abh. d. Anstellhefemenge und der Temperatur

Alle weiteren Analyseergebnisse aus dieser Versuchsreihe (Versuchsumfang: siehe Tabelle 7) werden im elektronischen Anhang EA15 beschrieben und dienen zur Beurteilung der kontinuierlichen Prozesse.

5.2.2 Variationen der Fermentationsdrücke

Wie in Kapitel 3.6.2.4, S. 25 ff. beschrieben wird, können Überdrücke die Fermentationsverläufe beeinflussen. Aus diesem Grund erfolgten Versuche mit konstant erhöhten, zyklisch variierenden und sukzessiv steigenden sowie fallenden Spundungsdrücken.

5.2.2.1 Isobare Spunddruckerhöhungen

Bereits bei der Eignungsprüfung der KF und der Determinierung der Versuchsparameter konnten geringfügige, druckabhängige Beeinflussungen auf die Fermentationen beobachtet werden (siehe Kapitel 5.1.3.3, S. 46 ff.).

Um weitere systematische Zusammenhänge zu detektieren, wurden die zuvor beschriebenen Versuchsreihen, in denen die Zellzahlen (10, 30, 50 und 100 Mio. HZ/ml (TUM 34/70)) und Temperaturen (10, 15 und 20 °C) variiert wurden, bei 1,3 bar_ü und 2,0 bar_ü wiederholt.

Die Tabelle 10 fasst die Gesetzmäßigkeiten, die sich durch die Bewertung der Einzelparameter (siehe elektronischer Anhang: EA16) für 1,3 bar Spundungsdruck ergeben, tabellarisch zusammen.

Tabelle 10: Variationen der Anstellkonzentrationen und der Temperatur (1,3 bar)

Parameter		Auswirkungen isothermer Erhöhungen der Anstellzellzahlen				Auswirkungen erhöhter Fermentationstemperaturen bei konstanten Zellzahlen		
		10 °C	15 °C	20 °C	Grad	10 → 15 °C	15 → 20 °C	Grad
HG-Parameter	Extraktabbau	++++	++++	+++	S	++++	++++	S
	Lag-Phase	Nicht bestimmt						
	Alkoholbildung	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	pH-Wertreduktion	++++	++++	++	T	++++	+++	T
VDK	Diacetylbildung	++++	++++	++	T	++++	++++	S
	2,3-Pentadionbildung	+++	+++	++++	T	++++	++++	S
Alkohole	Acetaldehydbildung	+	-	++	X	++	++	T
	Propanolbildung	++++	+	+++	T	++	++	T
	i-Butanolbildung	++++	+	+++	T	++	++	T
	Amylalkoholbildung	++++	+	+	X	++	++	T
Ester	Ethylacetatbildung	++++	+	++	T	-	+	X
	Isoamylacetat	++++	+	-	X	+	++	X
Bio.	Zellzahlzunahme	++	++++	++++	T	++	++	X
	Biomassezunahme	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
Zucker	Fruktoseabbau	++	++++	++++	T	++++	++++	S
	Glukoseabbau	+++	++++	++++	S	++++	++++	S
	Maltoseabbau	+	++++	++	T	+++	+++	T
	Maltotrioseabbau	+++	+++	++	T	++	++	T
FAN	FAN-Abbau nach 24 h	-	+	-	X	++	++	X
	FAN-Abbau (gesamt)	-	-	-	X	++	++	X
Gruppe A	Asparaginsäureabbau	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	Asparaginabbau	-	X	X	X	++++	X	X
	Serinabbau	-	X	X	X	++++	X	X
	Glutaminsäureabbau	+++	++	+++	T	++++	++++	S
	Glutaminabbau	-	++	+	X	++++	++	T
	Lysinabbau	-	++	++++	T	++++	++++	S
	Argeninabbau	-	+	+	X	++++	++	T
Gruppe B	Threoninabbau	-	-	-	X	++++	-	T
	Methioninabbau	-	++	++++	T	++++	++++	S
	Isoleucinabbau	-	-	++++	X	++++	++++	S
	Leucinabbau	-	+	++++	X	++++	++++	S
	Valinabbau	-	-	++	X	++++	+++	T
Gruppe C	Histidinabbau	-	-	++	X	+++	+	X
	Phenylalaninabbau	-	++	++	T	+++	+++	T
	Alaninabbau	-	-	++	X	++++	+++	T
	Tyrosinabbau	-	-	++	X	++++	+++	T
	Glycinabbau	-	-	-	X	++++	-	X
	Tryptophanabbau	-	-	-	X	-	-	X
	Gammaabbau	-	-	-	X	++	-	X
In den verglichenen Versuchsreihen 1,3 bar_ü :								
++++ = keine Abweichungen // +++ = einzelne Ausreißer // ++ = eine naheliegende Abweichung //								
+ = eine grobe Abweichung // - keine logische Reihe								
S = signifikant // T = tendenziell // X = kein Trend erkennbar								

Wie der Tabelle 10 entnommen werden kann, ergaben sich durchwegs logische, signifikante (S) Zusammenhänge bei 1,3 bar Spundungsdruck für den Extraktabbau, der Alkoholbildung, der Biomassezunahme, dem Glukoseabbau und der Asparaginsäurereduktion.

Weil die Vergärungsgrade jedoch deutlich geringer waren als bei 0,5 bar_ü (Kapitel 5.2.1, S. 52 ff.) und derartige Verhältnisse daher für diese Abhandlung ausgeschlossen wurden, erfolgte keine äquivalente statistische Absicherung der Versuchsergebnisse, weshalb auf

eine mathematische Beschreibung/Einbeziehung/Auswertung dieser Parameter verzichtet wurde. Eine detaillierte Versuchsauswertung aller Substanzen finden sich jedoch in den elektronischen Anhängen: EA16, EA17.

In der Tabelle 11 sind die wichtigsten Fermentationscharakteristika bei 2,0 bar_ü zusammengefasst. Dabei zeigt sich, dass durchgehend signifikante Zusammenhänge für den Extraktabbau und die Alkoholbildung, die pH-Wert-Reduktion und die Entwicklung der VDKs sowie bei der Propanolbildung detektiert werden konnten.

Tabelle 11: Variationen der Anstellkonzentrationen und der Temperatur (2,0 bar)

Parameter		Auswirkungen isothermer Erhöhungen der Anstellzellzahlen				Auswirkungen erhöhter Fermentationstemperaturen bei konstanten Zellzahlen		
		10 °C	15 °C	20 °C	Grad	10→15 °C	15→20 °C	Grad
HG-Parameter	Extraktabbau	++++	++++	+++	S	++++	++++	S
	Lag-Phase	Nicht bestimmt						
	Alkoholbildung	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	pH-Wertreduktion	++++	++++	+++	S	++++	+++	S
VDK	Diacetylbildung	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	2,3-Pentadionbildung	++++	++++	++++	S	++++	++++	S
	Acetaldehydbildung	++	+	+	X	++++	++++	S
Alkohole	Propanolbildung	++++	+++	+++	S	++++	++++	S
	i-Butanolbildung	++++	+++	+++	T	++++	+++	T
	Amylalkoholbildung	+++	+++	+++	T	++++	++++	S
Ester	Ethylacetatbildung	++++	+++	+++	T	++	++	X
	Isoamylacetat	++++	+++	+	X	+++	+	X
Bio.	Zellzahlzunahme	++	++++	++++	T	+++	-	X
	Biomassezunahme	++	+++	++++	T	++	++	T
Zucker	Fruktoseabbau	++	-	++++	X	-	+++	X
	Glukoseabbau	++++	+++	++++	S	-	++++	X
	Maltoseabbau	+++	+++	++++	S	-	++++	X
	Maltotrioseabbau	++	++	+++	T	-	++++	T
FAN	FAN-Abbau nach 24 h	-	++++	-	X	+++	-	X
	FAN-Abbau (gesamt)	-	++	-	X	-	-	X
Gruppe A	Asparaginsäureabbau	-	++++	++++	T	++++	++++	S
	Asparaginabbau	-	X	X	X	++++	X	X
	Serinabbau	-	X	X	X	++++	X	X
	Glutaminsäureabbau	++	-	++++	T	++++	++++	S
	Glutaminabbau	-	++	-	X	++++	++	T
	Lysinabbau	-	+++	++++	T	++++	++++	S
	Argeninabbau	-	+	-	X	++++	-	X
	Threoninabbau	-	X	-	X	++++	-	X
Gruppe B	Methioninabbau	-	++	++++	T	++++	++++	S
	Isoleucinabbau	-	-	+++	X	++++	++++	S
	Leucinabbau	-	++	++++	T	++++	++++	S
	Valinabbau	-	-	++	X	++++	+++	T
	Histidinabbau	-	-	-	X	-	-	X
Gruppe C	Phenylalaninabbau	-	-	++	X	++++	+++	S
	Alaninabbau	-	++	++	X	++++	+++	S
	Tyrosinabbau	-	-	++	X	++++	+++	T
	Glycinabbau	-	-	-	X	++++	-	T
	Tryptophanabbau	-	-	-	X	-	-	X
	Gammaabbau	-	-	-	X	-	-	X

In den verglichenen Versuchsreihen **2,0 bar_ü**:
 ++++ = keine Abweichungen // +++ = einzelne Ausreißer // ++ = eine naheliegende Abweichung //
 + = eine grobe Abweichung // - keine logische Reihe
 S = signifikant // T = tendenziell // X = kein Trend erkennbar

Um den Einfluss von Druckerhöhungen bei genannten Variationen der Zellzahlen und Fermentationstemperaturen besser beurteilen zu können, erfolgt in der Tabelle 12 eine vergleichende Darstellung der analysierten Gesetzmäßigkeiten bei isobaren Fermentationen mit unterschiedlichen Druckniveaus.

Die Spalte rechts außen illustriert dabei ein Bewertungsschema, bei dem 2 Sterne für signifikante Parameter (S) und 1 Stern für Tendenzen (T) vergeben wurden, um eine Gesamtbeurteilung einzelner Stoffklassen zu erleichtern.

Tabelle 12: Gesamtbeurteilung von Druck-, Zellzahl- und Temperaturvariationen

Parameter		Auswirkungen isothermer Erhöhungen der Anstellzellzahlen			Auswirkungen erhöhter Fermentationstemperaturen bei konstanten Zellzahlen			Gesamtbeurteilung
		0,5 bar _ü	1,3 bar _ü	2,0 bar _ü	0,5 bar _ü	1,3 bar _ü	2,0 bar _ü	
HG-Parameter	Extraktabbau	S	S	S	S	S	S	*****
	Lag-Phase	S	X	X	S	X	X	****
	Alkoholbildung	S	S	S	S	S	S	*****
	pH-Wertreduktion	X	T	S	T	T	S	*****
VDK	Diacetylbildung	T	T	S	S	S	S	*****
	2,3-Pentadionbildung	T	T	S	S	S	S	*****
Alkohole	Acetaldehydbildung	X	X	X	X	T	S	***
	Propanolbildung	X	T	S	X	T	S	*****
	i-Butanolbildung	X	T	T	X	T	T	****
	Amylalkoholbildung	X	X	T	X	T	S	****
Ester	Ethylacetatbildung	X	T	T	X	X	X	**
	Isoamylacetat	X	X	X	T	X	X	*
Bio.	Zellzahlzunahme	T	T	T	S	X	X	*****
	Biomassezunahme	S	S	T	T	S	T	*****
Zucker	Fruktoseabbau	T	T	X	T	S	X	*****
	Glukoseabbau	T	S	S	T	S	X	*****
	Maltoseabbau	T	T	S	T	T	X	*****
	Maltotrioseabbau	S	T	T	T	T	T	*****
FAN	FAN-Abbau nach 24 h	S	X	X	S	X	X	****
	FAN-Abbau (gesamt)	T	X	X	S	X	X	***
Gruppe A	Asparaginsäureabbau	T	S	T	S	S	S	*****
	Asparaginabbau	X	X	X	S	X	X	**
	Serinabbau	X	X	X	S	X	X	**
	Glutaminsäureabbau	T	T	T	S	S	S	*****
	Glutaminabbau	T	X	X	S	T	T	*****
	Lysinabbau	T	T	T	S	S	S	*****
	Argeninabbau	T	X	X	T	T	X	***
Threoninabbau	T	X	X	T	T	X	***	
Gruppe B	Methioninabbau	T	T	T	S	S	S	*****
	Isoleucinabbau	T	X	X	S	S	S	*****
	Leucinabbau	T	X	T	S	S	S	*****
	Valinabbau	T	X	X	T	T	T	****
	Histidinabbau	X	X	X	T	X	X	*
Gruppe C	Phenylalaninabbau	T	T	X	S	T	S	*****
	Alaninabbau	T	X	X	S	T	S	*****
	Tyrosinabbau	X	X	X	T	T	T	***
	Glycinabbau	X	X	X	T	X	T	**
	Tryptophanabbau	X	X	X	X	X	X	
	Gammaabbau	X	X	X	X	X	X	

S = signifikant = ** // T = tendenziell = * // X = kein Trend erkennbar

Die Gesamtbeurteilung (Tabelle 12, rechte Spalte) verdeutlicht, dass systematische Zusammenhänge bei isobaren Variationen der Zellzahl, der Temperatur und des Fermentationsdrucks insbesondere für den Extraktabbau und die Alkoholbildung bestehen. Doch auch die Bildung und Reduktion der VDKs, die Biomassezunahme, der Glukoseabbau sowie die Reduktion der Aminosäuren: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Methionin und Leucin scheinen bei genannten Bedingungen klaren Gesetzmäßigkeiten zu unterliegen.

Insgesamt werden viele Reaktionen – vor allem die Aufnahme bestimmter Aminosäuren – stärker durch Temperaturerhöhungen beeinflusst als durch Zellzahlerhöhungen.

5.2.2.2 Variierende Spundungsdrücke

Industrielle Fermenter werden in der Regel 10 bis maximal 25 m hoch befüllt.(201) Unabhängig von der Form der Tanks, der enthaltenen Flüssigkeitsmenge und der Oberfläche des Fluids erhöht sich der Druck dabei gleichmäßig in Abhängigkeit der Flüssigkeitshöhe. Dieses Phänomen wird als hydrostatisches oder Pascal'sches Paradoxon bezeichnet.(258) Wenn für die Produktdichte simplifiziert 1.000 kg/m^3 angenommen wird, erhöht sich der Druck um 0,1 bar/Meter Füllhöhe und variiert somit allein aufgrund der Flüssigkeitssäule um bis zu 2,5 bar in den Reaktoren.

Obgleich die Topologie der Strömungsvorgänge in den Fermentern äußerst komplex ist,(242) erfolgt während der Hauptgärung – hauptsächlich aufgrund der Gas- und Wärmebildung/Abführung – vereinfacht eine zentral gerichtete Aufwärts- und dezentral gerichtete Abwärtsströmung (259), wodurch die Hefe während der Fermentation einem ständigen Kreislauf von zeitlich unterschiedlichen Druckniveaus ausgesetzt wird.

Weil konvektionsverursachte Druckschwankungen üblicherweise nicht bei Experimenten im Labormaßstab berücksichtigt werden, wurde in dieser Versuchsreihe evaluiert, welcher Effekt eine zyklische Druckvariation auf Kleingärungen hat.

Zu diesem Zweck wurden primär 3 Testfermenter (TF50) so modifiziert, dass Druckprofile gezielt implementiert werden konnten. Wie die Abbildung 32 zeigt, wurden dazu essenziell 2 Magnetventile (MV1/MV2) in einer CO_2 -Zuleitung (CO_2 zu) an Zeitschaltuhren (ZSU1/ZSU2) angeschlossen, die wiederum über Nadelventile (NV1/NV2) mit den Spundungsapparaturen (SV) der Tanks kommunizierten.

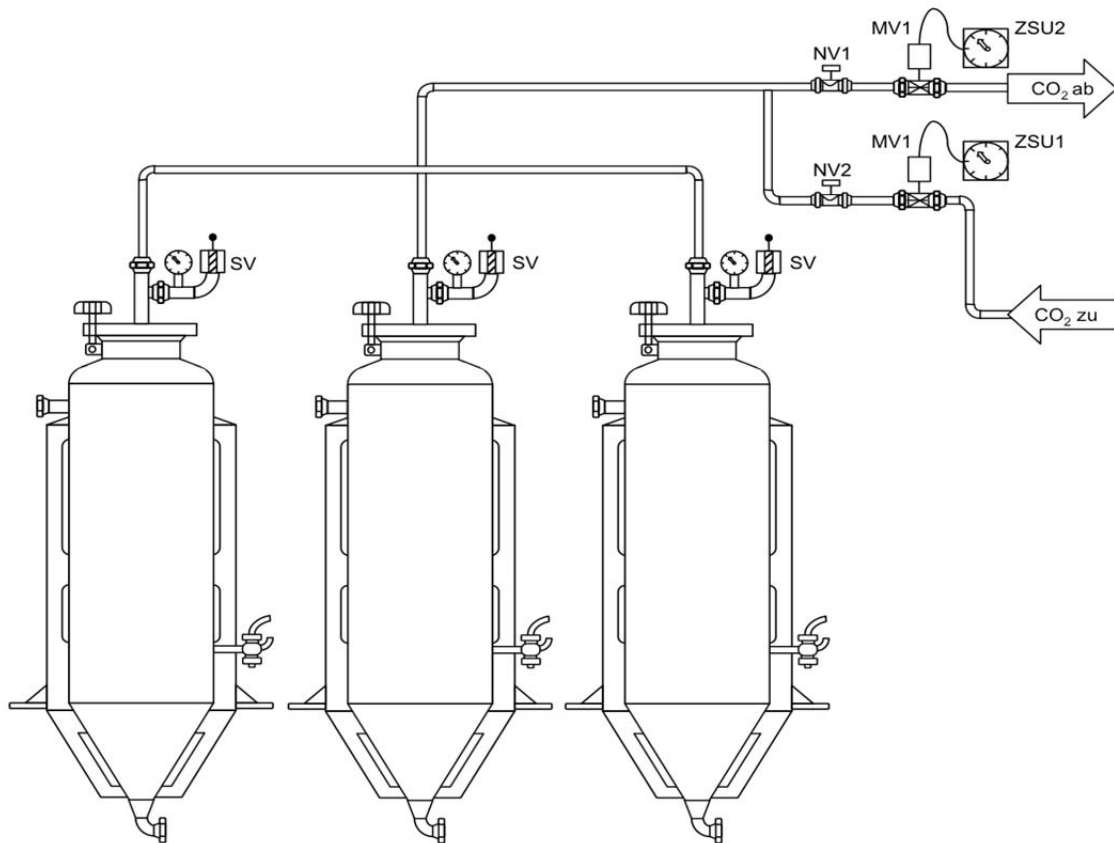


Abb. 32: Versuchsaufbau für variierende Spundungsdrücke in Kleinfementern

Für einen periodischen Druckaufbau wurde das Magnetventil 1 (MV1) in der unter Druck (2 bar) stehenden Gaszuleitung (CO_2 zu) für eine definierte Zeit lang geöffnet, wobei die Einströmgeschwindigkeit über das Nadelventil 1 (NV1) reguliert werden konnte. Simultan dazu wurde das Magnetventil 2 (MV2), gesteuert über die 2. Schaltuhr (ZSU2), verschlossen.

Damit eine Überschreitung des Zieldruckes vermieden und die Aufrechterhaltung eines Druckplateaus gewährleistet werden konnte, erfolgte eine herkömmliche Tankspundung (SV). Anschließend wurde das Magnetventil 1 (MV1) geschlossen und das Magnetventil 2 (MV2) geöffnet, sodass ein über das 2. Nadelventil (NV2) einstellbarer Druckabfall (CO_2 ab) erfolgen konnte.

Um adäquate, praxisnahe Bedingungen in den Versuchen zu simulieren, wurden die real vorherrschenden Strömungsgeschwindigkeiten während Bierhauptgärungen berücksichtigt. Diese betragen nach DELENTE, AKIN und KRABBE durchschnittlich 0,15 m/s bei 9 Meter Füllhöhe und 0,23 m/s bei 27 Meter Füllhöhe.(260) SENGE hingegen beschreibt eine maximale Strömungsgeschwindigkeit von etwa 0,12 m/s in einem 250 m³-ZKT (261).

Unter Einbezug der Behältergeometrie wurde daher entschieden, für den Versuch mit einer axialen Strömungsgeschwindigkeit von ca. 0,16 m/s und einer Füllstandshöhe von 15 Meter zu rechnen. Somit ergibt sich eine Druckdifferenz (Druckauf- und Abbau) von 1,5 bar in 125 Sekunden. Außerdem wurden Verweilzeiten von je 15–20 Sekunden bei Minimaldruck (0 bar_i) und Maximaldruck (1,5 bar_i) vorgesehen, um die radialen Strömungen von der Tankmitte zur Tankwandung und umgekehrt zu simulieren. Als Referenz wurde ein isobarer, mittlerer Spundungsdruck in 3 Referenzsystemen (TF50) von 0,75 bar gewählt. Die Abbildung 33 illustriert das implementierte Druckprofil.

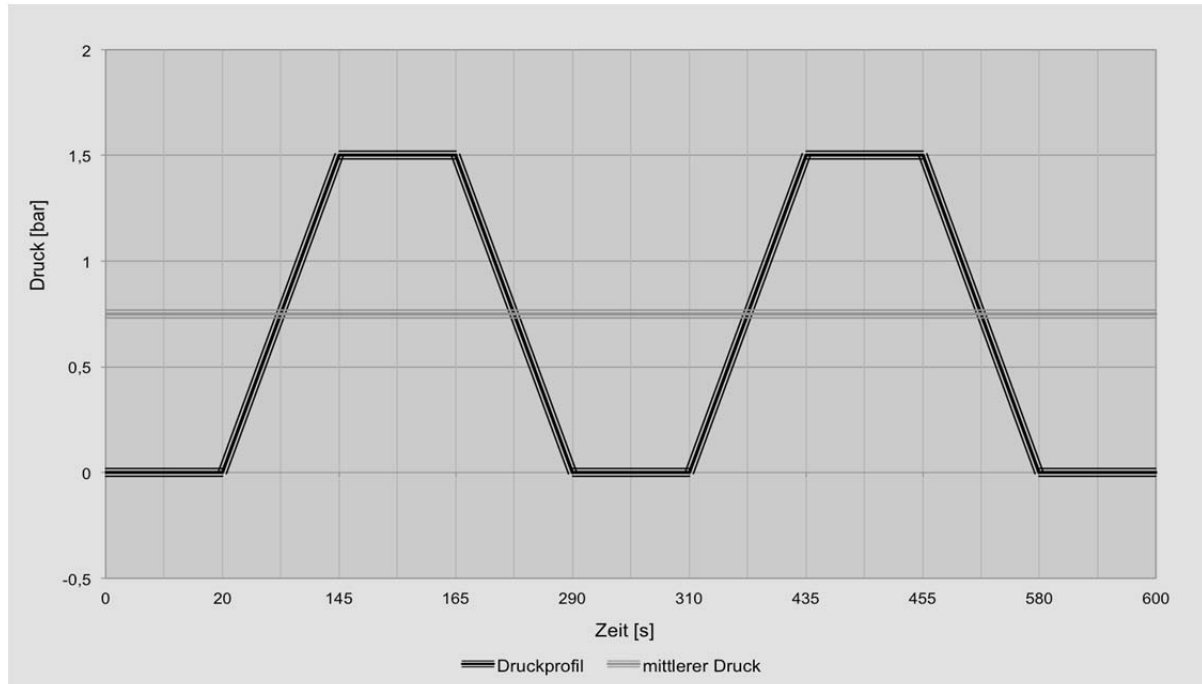


Abb. 33: Druckprofil für periodische Variationen

Um die notwendige Kohlenstoffdioxidmenge für die Versuche zu reduzieren, wurde das Kopfraumvolumen auf etwa 4 % reduziert. Demnach wurden 6 gleichartige Testfermenter (TF50) mit je 68 Liter untergäriger Originalbierwürze befüllt (vgl. Kapitel 5.1.3.5, S. 50 ff.) und primär je 5 ml silikonbasiertes Antischaummittel zugegeben, um ein Übersäumen während der Fermentation zu verhindern. Anschließend wurden alle Systeme mit 30 Mio. HZ/ml (TUM34/70) inokuliert. Die Fermentationen erfolgten simultan bei 15 °C für 7 Tage.

Trotz unterschiedlich eingestellter Druckgradienten konnten jedoch keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Extraktabbauraten, den Alkoholbildungen, den pH-Wert-Reduzierungen, den Abnahmen der FAN-Gehalte und den Diketonverläufen festgestellt werden.

Lediglich die Proben der isobaren Gärungen enthielten gegen Ende der Fermentationen geringfügig mehr Acetaldehyd, Ethylacetat und Isoamylacetat.

Die Fettsäure- und Schwefelgehalte der Unfiltratproben hingegen ließen auf keine systematischen Beeinflussungen schließen.

Die Untersuchungen der Erntehefe ergaben, dass die Organismen, die zuvor einem permanenten (isobaren) Druck ausgesetzt waren, vergleichsweise etwas schneller Gas bildeten (Eintritt der Log-Phase) und somit als gärkräftiger bzw. vitaler zu charakterisieren sind. (vgl. Kapitel 5.3.1.2, S. 70 ff.). Ferner war die Zellmembran dieser Mikroben tendenziell etwas weniger stark negativ polarisiert (vgl. Kapitel 5.3.1.1, S. 70 ff.)

Die sensorische Produktbeurteilung, bei der 10 geschulte DLG Verkoster/innen partizipierten, ergab jedoch dass keine organoleptischen Unterschiede zwischen den isobar fermentierten Proben und den Produkten, die bei variierenden Drücken hergestellt wurden, detektiert werden konnten. (vgl. EA18)

Somit ist eine Implementierung von alternierenden Drücken zur Simulation von Strömungsvorgängen in Großtanks bei Laborfermentationen obsolet.

5.2.2.3 Sukzessiv erhöhte und verringerte Spundungsdrücke

Um im kontinuierlichen Betrieb einen Fluidtransfer ohne zusätzlichen Einsatz von Primärantrieben zu ermöglichen, sollte in den Reaktoren der Kaskade idealerweise ein fallender Druckgradient in Flussrichtung eingestellt werden.

Ferner bietet eine solche Maßnahme potenziell den Vorteil, dass sich aufgrund des erhöhten Initialdrucks weniger Biomasse bildet und dadurch Verluste reduziert werden können. Außerdem kann eine resultierende Gasentbindung einen positiven Einfluss auf das Gärungsnebenproduktspektrum haben (vgl. Kapitel 3.6.2.4, S. 25 ff).

Aus diesen Gründen wurde experimentell ermittelt, wie sich ein sukzessiv ansteigender Druck im Vergleich zu einem kongruent fallenden und einem mittleren isobaren Druck auf die Gärungscharakteristika auswirken. Dazu wurden zunächst 9 Testfermenter (TF50) mit je 50 Liter untergäriger Originalbierwürze simultan mit je 30 Mio. HZ/ml Erntehefe (3. Führung; Stamm: TUM 34/70) angestellt. Die Fermentationen erfolgten isotherm bei 10 °C innerhalb von 168 Stunden. Dabei wurden, wie die Abbildung 34 illustriert, 3 Tanks isobar auf 0,5 bar_ü gespundet („mittlerer (isobarer) Druck“). Bei 3 Tanks wurde der Druck sukzessiv von 1,2 bar_ü Initialdruck täglich um 0,2 bar reduziert („fallender Druck“) und bei 3 weiteren Tanks wurde der Druck täglich um 0,2 bar erhöht („steigender Druck“). 24 Stunden vor der Entnahme der letzten Proben wurden alle Tanks auf 0,5 bar_ü eingestellt, um eine bessere Vergleichbarkeit in den Verkostungen, insbesondere hinsichtlich des Karbonisierungsgrades gewährleisten zu können.

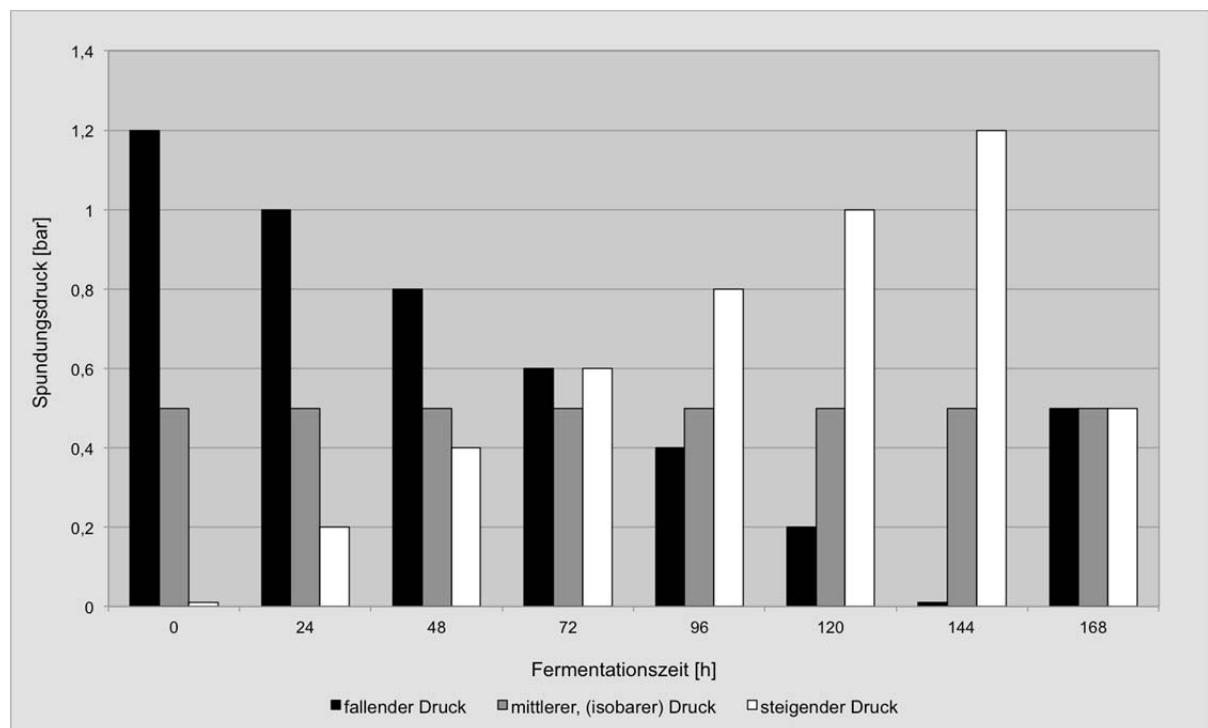


Abb. 34: Druckprofile für sukzessiv steigende/fallende Druckgärungen

Wie dem elektronischen Anhang EA19 entnommen werden kann, verliefen der Extraktabbau und der Alkoholaufbau bei den isobaren Fermentationen etwas schneller als bei variierenden Drücken. Auch der pH-Wert-Sturz erfolgte bei konstantem Druck tendenziell etwas rascher und weitreichender.

Bei der Aufnahme des FAN stellten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede ein. Gleiches gilt für die Bildung von höheren Alkoholen, Estern und Aldehyden sowie der Bildung und dem Abbau der VDKs.

Im Anschluss an diese Versuchsreihe wurde eine 3-Glas-Verkostung der Produkte vorgenommen. Dabei wurden die unter variierenden Drücken hergestellten Proben mit den isobar fermentierten Erzeugnissen verglichen.

Jeweils 7 der 10 Verkoster/innen konnten komparativ keine sensorischen Abweichungen detektieren. Unter Einbezug der analytischen Ergebnisse kann daher davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der beschriebenen Parameter weder sukzessiv steigende noch fallende Drücke während der Hauptgärung in Laborfermentern zu signifikanten Veränderungen der Gärungscharakteristika führen.

5.3 Fermentationsorganismen

Um alternative Technologien vergleichend beurteilen zu können, müssen Informationen über die Mikroorganismen zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit alternative Verfahren entwickelt und getestet, um den physiologischen Zustand von Hefen vereinfacht und reproduzierbar bestimmen zu können.

Ferner wurde evaluiert, welche stammspezifischen Charakteristika der eingesetzte Stamm TUM 34/70 im Vergleich zu anderen handelsüblichen Brauereihefen besitzt.

Außerdem sollte die genetische Stabilität der Population bekannt sein, da so die Eignung für bestimmte Applikationen (z. B. Anzahl der Wiederverwendungen und Resistenz gegen Stressoren) determiniert werden kann.

5.3.1 Physiologischer Zustand der Kulturorganismen

Untergärige Lagerbierhefen werden bei klassischen Batchfermentationen in der Regel nach 4–8 Wiederverwendungsintervallen (Führungen) verworfen. Dies liegt unter anderem an der zunehmenden Gefahr, dass sich Fremdorganismen, die oft kürzere Generationszeiten als Hefen aufweisen und die sich aufgrund ihrer genetischen Struktur schnell an die vorherrschenden Bedingungen anpassen können, andernfalls durchsetzen könnten. Ferner verändert sich die Altersstruktur der Population mit der Anzahl der Wiederverwendungen. Dies macht sich in einer variierenden Zellgrößenverteilung und einer zunehmenden Anzahl an Sprossnarben auf den Membranen bemerkbar, wodurch insbesondere die Flokkulationseigenschaften beeinträchtigt werden. Außerdem nimmt der Einfluss autolysierender Organismen zu, die unter Umständen ungewünschte Stoffklassen wie Proteinasen freisetzen können, wodurch z. B. die Qualität des Bierschaums reduziert werden kann.

Üblicherweise wird bei der routinemäßigen Qualitätskontrolle daher die Kulturreinheit (Kontaminationsfreiheit) und die Viabilität (Lebend-Tot-Anteil) der Population bestimmt und die Charge nach einer Zyklusanzahl, die auf Erfahrungswerten, wirtschaftlichen Interessen und Literaturkenntnissen beruht, verworfen.

Neben den klassischen molekularbiologischen Analysenverfahren besteht die Möglichkeit, den physiologischen Zustand der Organismen (Vitalität) z. B. mittels der Messung des intrazellulären pH-Wertes oder durchflusszytometrischer Verfahren zu ermitteln.

Da diese komplexen Verfahren jedoch in der Regel hohe Investitionskosten und geschultes Laborpersonal bedingen, werden sie bisher nur in Ausnahmefällen in der Praxis implementiert.

Bei kontinuierlichen Fermentationsverfahren ist die Kenntnis über den physiologischen Zustand der Zellen jedoch essenziell, da die Kulturen bei klassischen Prozessen oftmals deutlich länger in den Systemen verbleiben als bei chargenweiser Produktion und teilweise keine Aufbereitung und Wiederverwendung vorgesehen wird.

Deshalb wurden im Rahmen dieser Abhandlung verschiedene Verfahren entwickelt und getestet, mit denen die Vitalität vereinfacht bestimmt werden sollte. Die Prinzipien werden dabei nachfolgend zusammengefasst.

5.3.1.1 *CO₂-Volumen und Ladungstitration zur Vitalitätsbestimmung*

Bereits 1961 stellte HLAVÁČEK eine Methode vor, um den physiologische Zustand von Brauereihefen mithilfe des entstehenden Kohlesäurevolumens in Kleinfermentationen indirekt, über ein sogenanntes Fermentometer zu evaluieren.(262) Dieses Verfahren gilt bis heute als Referenz für moderne Vitalitätsbestimmungsmethoden, z. B. der intrazellulären pH-Wert-Bestimmung (ICP).

Um zu ermitteln, ob derartige Messungen auch vereinfacht und direkt im Fermentationsmedium erfolgen können, wurden Experimente in sogenannten Einhorngärungs-saccharometern vorgenommen. Gleichzeitig wurde mithilfe der Ladungstitration evaluiert, ob bei den Organismen, deren physiologischer Zustand zuvor mithilfe von Stressoren (ethanolischer Stress, oxidativer Stress und osmotischer Stress) manipuliert wurde, Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheiten feststellbar waren.

Wie aus der englischsprachigen Veröffentlichung (263), hervorgeht, in der die Methoden detailliert beschrieben werden, konnten mithilfe beider Verfahren Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Organismen analytisch bestimmt werden.(264)

Da die Ladungstitration jedoch vergleichsweise aufwendig ist und die Gasbildung in den Einhorngärröhrchen nur manuell ermittelt werden konnte, was zu einer Steigerung des Laborfehlers führt, wurde eine weitere Methode zur Vitalitätsbestimmung von Hefen getestet, die nachfolgend (Kapitel 5.3.1.2) beschrieben wird.

5.3.1.2 *CO₂-Druckaufbau zur Vitalitätsbestimmung*

In geschlossenen Systemen führt das Gasvolumen, das bei Gärungen gebildet wird, zu Druckerhöhungen. Weil die Bildungsrate von der Fermentationsleistung der Hefe abhängt, ermöglicht das resultierende Druckniveau, welches bei definierten Verhältnissen innerhalb einer festgelegten Zeiteinheit gemessen wird, die Beurteilung der Vitalität einer Population.(198, 265)

Weil diese Methode jedoch bisher nur manuell erfolgte, Analysenparameter nicht klar definiert wurden und der entstehende Gasdruck potenziell die voranschreitende Fermentation beeinflusst, wurde in dieser Abhandlung ein alternatives, vollautomatisiertes Verfahren zur Bestimmung der Hefevitalität entwickelt und getestet. Wie in der englischsprachigen Veröffentlichung (266) erläutert wird, wurde dazu ein Laborsystem ausgewählt,

mit dem der Druckaufbau drahtlos, in multiplen Modulen parallel und in Echtzeit aufgezeichnet werden konnte. Ferner ermöglichte die Konfiguration eine gezielte Einstellung des real vorherrschenden Kopfraumdrucks, sodass Beeinflussungen reduziert werden konnten.

Nachdem die idealen Prozessbedingungen bezüglich Fementationssubstrat, Inokulationsgehalte, Flüssigkeits-zu-Kopfraumvolumen, realer Druck im Kopfraum, Ablassintervalle, Gärtemperatur und rechnerischem Zieldruck ermittelt wurden, konnten reproduzierbare Messungen mit geringer Standardabweichung ($\sigma = \pm 7\%$) vorgenommen werden. (264)

Vergleichende Analysen unterschiedlich vitaler Hefen ergaben, dass die entwickelte Methode hohe Korrelationen zu den etablierten Methoden aufwies; z. B. zur intrazellulären pH-Wertbestimmung (ICP) (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,999$) und zur Messung des Gärungskohlesäurevolumens im Fermentometer (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,988$).

Weil der hier entwickelte Prozess den bestehenden Verfahren jedoch aufgrund der Schnelligkeit, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Einfachheit überlegen war, wurde dieser präferiert.

Außerdem wurde die Methode anschließend so modifiziert, dass auch geringere Biomassegehalte in den Proben ausreichen, um aussagekräftige Messwerte rasch zu erhalten. Dies erwies sich insbesondere dann als vorteilhaft, wenn Proben mit geringen Hefemengen, wie die zu Propagationsbeginn, beurteilt werden sollen. Das modifizierte Messverfahren wird in der Tabelle 13 chronologisch zusammengefasst, bevor die Laboranlage in Abbildung 35 illustriert wird.

Tabelle 13: Vitalitätsanalyse von Proben mit geringen Biomassegehalten

Prozessparameter			
Medium	Betriebswürze, vortemperiert auf 25 °C		
Zellzahl	65 Mio. HZ/ml (bestimmt via Thomakammer)		
Volumen	80 ml in 100-ml-Duranglasflasche		
Magnetrührwerk	350 rpm/15 mm Rührstäbe		
Messziel	Zeit bis 600 mbar _i aufgebaut wurden		
Systemeinstellungen			
Live Interval	30 s	Global release	690 mbar
Recording Interval	1 min.	Valve open time	10 ms
Probenbereitung			
Vortemperierung	Sterilwürze und Gläser im Brutschrank auf 25 °C einstellen		
Hefe aufkonzentrieren	Probenmasse bei 3000 rpm/300 s = 750 g zentrifugieren, Überstand abschütten		
Hefe waschen	100 ml Leitungswasser zugeben, Im Ultraschallbad 300 s homogenisieren		
Zellzahlbestimmung	Der Hefe-Wasser-Suspension via Thoma Kammer		
erneute Zentrifugation	Menge der Hefe-Wasser-Suspension zentrifugieren die benötigt wird, um 100 ml mit 65 Mio. HZ/ml anzustellen (3000 rpm/300 s = 750 g), Überstand abschütten		
Anstellen	100 ml vortemperierte Würze ins Zentrifugenglas zugeben, bei 600 rpm mit 15 mm Magnetührstäbchen das Zentrifugat mit Würze für 60 s homogenisieren		
Überführen	80 ml in die vortemperierten, mit 15 mm Magnetührern versehenen Durangläser überführen, Gläser mit Drucksensor verschließen		
Messung starten	Gläser auf Magnetührer im Brutschrank stellen (25 °C/300 rpm) und Messung starten (Zeit notieren)		
Messziel	Zeit bis 600 mbar _i erreicht sind (Soll: < 90 min)		

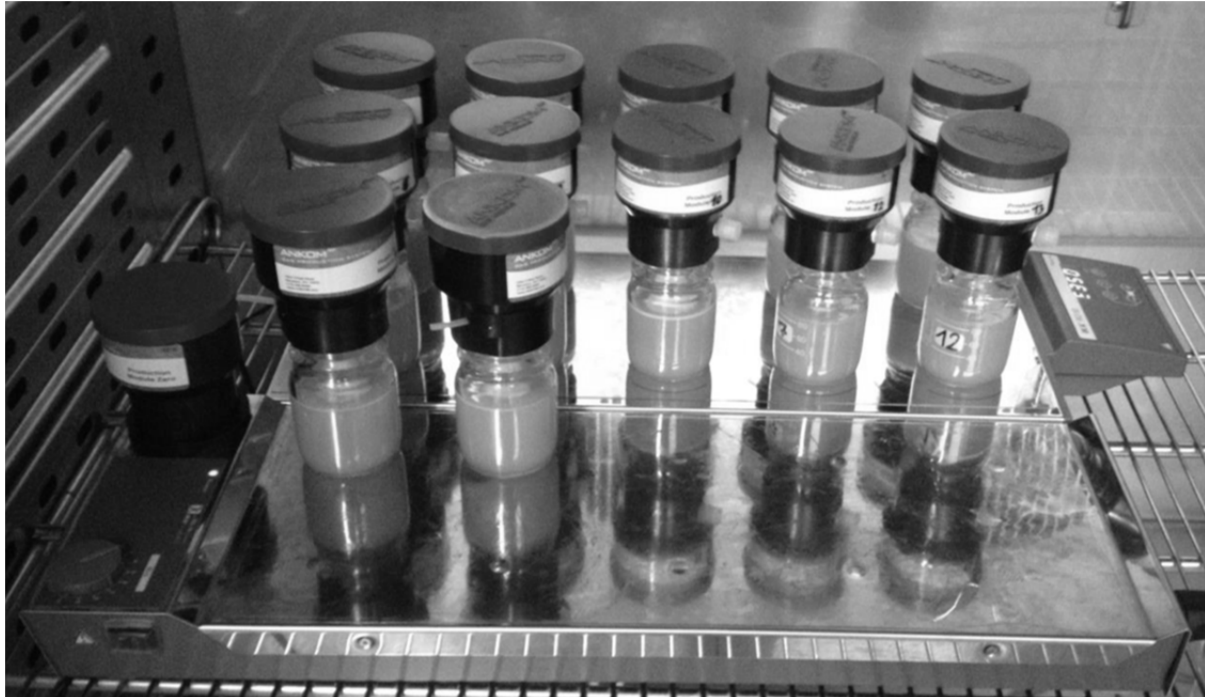


Abb. 35: Vitalitätsprüfung von Hefe

5.3.2 Hefecharakterisierung

Kontinuierliche Fermentationsverfahren können zu einer signifikanten sensorischen Veränderung des Produktcharakters führen. Wie in Kapitel 3.6.2, S. 22 ff. dargestellt, gibt es jedoch zahlreiche technologische Variablen, mit denen sich die Gärungen und somit die Aromen beeinflussen lassen. Neben den angeführten Stellgliedern kann auch die Auswahl des eingesetzten Kulturorganismus zu einer Manipulation der Produktausprägung genutzt werden. Bislang fehlten allerdings zuverlässige und praxisnahe Informationen über die Charakteristiken einzelner Stämme.

In dieser Abhandlung wurden daher 6 handelsübliche, untergärige Hefestämme (TUM 34/78, TUM 193, TUM 194, TUM 66/70, TUM 44 und TUM 69) standardisiert in 3 separaten Versuchsreihen mit TUM 34/70 verglichen.

Um möglichst praxisnahe Bedingungen zu simulieren, die *Scale-up*-Einschätzungen ermöglichen, erfolgten die Fermentationen dabei in KF bei 15 °C, 0,5 bar_ü und Inokulationsgehalten von 30 Mio. HZ/ml (vgl. Kapitel 5.1.3.3, S. 46 ff.).

Wie aus der englischsprachigen Veröffentlichung (247) hervorgeht, unterschieden sich die getesteten Stämme dabei in einzelnen Merkmalen deutlich voneinander.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass stammenspezifisch Veränderungen der Oberflächenladungen während des Fermentationsverlaufs resultieren.(264)

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die von STEWART et al. (267) vorgeschlagenen Reorganisation der Aminosäuren Methionin, Leucin und Isoleucin in die Gruppe A und der Verschiebung von Phenylalanin in Gruppe B zugestimmt werden sollte. Dies gilt allerdings nicht eindeutig für Tyrosin und Tryptophan.

Ferner konnte eine Abhängigkeit der Aminosäureaufnahme bezüglich der Molekülgrößen und Strukturkomplexität beobachtet werden.

5.3.3 Adaptionsvermögen

Hefen passen sich – wie alle (Mikro-)Organismen – in gewissem Maß an ihre Umgebungsbedingungen an. Dabei vollzieht sich in der Regel nach und nach eine natürliche, stammspezifische Selektion und Adaption, die sich jedoch nicht nach üblicher Anzahl an Wiederverwendungen bei Batchverfahren bemerkbar macht.(268)

Bei kontinuierlichen Gärverfahren verbleiben die Hefen jedoch oftmals deutlich länger in den Systemen, teilweise bei statischen Bedingungen. Dies führt zu einer gesteigerten Stressung durch Alkohol. Dabei ist bekannt, dass Ethanol bei *Saccharomyces*-Hefen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Plasmamembranen, einer Verringerung der Protonengradienten und intrazellulären pH-Werte sowie zu einer Hemmung der Glykolyse führt, weshalb in dessen Anwesenheit die kinetische Reaktionsgeschwindigkeit der Organismen reduziert wird (Produktinhibition). Dieser Effekt wird durch Temperaturerhöhungen verstärkt.(184, 269, 270) Zudem begünstigen gesteigerte Ethanolgehalte im Substrat/Fermentat die Bildung von Spontanmutationen („Petite“ Mutationen), die Einfluss auf den Produktcharakter nehmen können.(271, 272) Der Grad der Alkoholtoleranz ist dabei stammspezifisch und von der individuellen mtDNA abhängig.(273, 274)

Ebenso kann die Steigerung der Zuckerkonzentrationen im Fermentationsmedium zu einer verstärkten Stressung der Mikroorganismen führen. Diese resultiert zu Gärbeginn aus erhöhten osmotischen Drücken und wird im Fermentationsverlauf durch die inhibierende Wirkung zunehmend gesteigerter Alkoholkonzentrationen überlagert. Komparative Versuche mit Anhebungen von fermentierbaren und nicht-fermentierbaren Substanzgehalten zeigten dabei, dass sich der osmotische Stress allein negativ auf das Zellwachstum der Hefe, die Gärgeschwindigkeit und die Alkoholausbeute auswirkt.(275, 276) Auch die Toleranz gegen erhöhte osmotische Drücke ist stammspezifisch.(277)

Beide genannten Stressoren führen – je nach Stabilität der Kultur – zu einer Steigerung der Mutationsraten. Dabei wirken sich Mutationen sowohl auf die morphologischen Merkmale der Organismen (Zellformen, Zellgrößen, Agglomerationsvermögen etc.) als auch auf die biochemischen Eigenschaften (Nährstoffanforderungen, fermentative Fähigkeiten etc.) aus.(3) Die meisten dieser Mutationen werden jedoch rezessiv vererbt, sodass die betroffenen Gene in der Regel ihre veränderten Funktionen nicht über mehrere Generationen beibehalten. Daher gilt es als äußerst unwahrscheinlich, dass sich natürlich mutierte Zellen im Wettbewerb langfristig durchsetzen können.(278) Dies gilt insbesondere für industriell genutzte (Brauerei)Hefen, die aufgrund ihres polyploiden Charakters genetisch stabiler und somit weniger mutationsanfällig sind als haploide- oder diploide (Wild)Heferasen.(279) Zudem sind genannte Populationen homothallich und somit unter natürlichen Bedingungen nicht kopulationsfähig, wodurch sexuell bedingte Mutationen ausgeschlossen werden können.(278, 279) Dennoch werden in der Literatur oft Mutationen für Instabilitäten im kontinuierlichen Modus verantwortlich gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob und inwiefern sich überlegene Populationen durch natürliche Selektionen erhalten lassen, bevor abschließend ermittelt werden konnte, welchen Einfluss derartig selektivierte Hefen auf Fermentationen haben.

Zu diesem Zweck erfolgten parallele Versuchsserien, in denen eine herkömmliche Ausgangskultur des Stammes TUM 34/70 (standardisierte Propagation siehe Kapitel 5.1.2.1, S. 38 ff.) durch erhöhte Alkoholgehalte, erhöhte Zuckergehalte und einer Kombination beider gezielt gestresst und überlegene Zellen multiple Male wiederverwendet wurden. Die Abbildung 36 zeigt schematisch den Versuchsablauf.

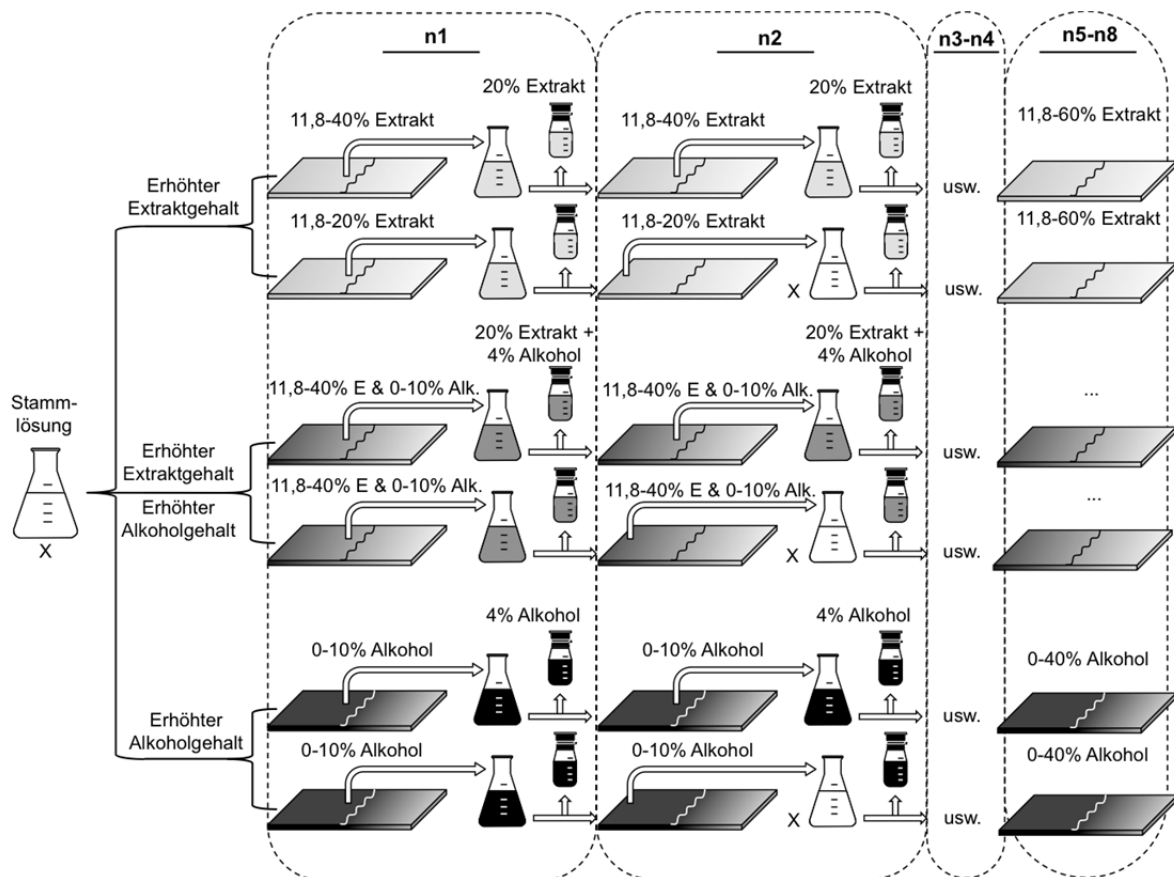


Abb. 36: Verfahren zur Untersuchung des Adaptionsvermögens von Hefe

Wie der Abbildung 36 entnommen werden kann, wurde die Stammkultur (je 100 μ l) zunächst auf 6 Gradientenplatten (je 2 120 x 120 mm Platten pro Stressor) ausgestrichen, die zuvor durch die separate, schräge Erhärtung von je 50 ml Würzeagar mit jeweiligem Stressor und der Zugabe von 50 ml purem Würzeagar hergestellt wurden.

Um eine reine Alkoholadaption zu initiieren, wurde in den ersten 4 Führungen (n1–n4) ein Alkoholgradient von 0–10 GG% über die Plattenlänge eingestellt, der in 4 weiteren Führungen (n5–n8) aufgrund des Erreichens der Wachstumsgrenze nach (n4) auf 40 GG% erhöht wurde. Für die osmotische (*high-gravity* (HG)) Stressung wurden hingegen durch Saccharosegabe in den ersten 4 Führungen Konzentrationen von 11,8–20 GG% eingestellt, die nachfolgend (n5–n8) aufgrund des zunehmenden Wachstums auf 11,8–40 GG% erhöht werden mussten. Weil das Wachstum bei kombinierten Stressoren keine Anpassung über die 8 Führungen (n1–n8) obligat machte, wurde hier mit konstanten maximalen Konzentrationen von 20 GG% Zucker und 4 GG% Alkohol gearbeitet.

Da aus der Praxis bekannt ist, dass sich Organismen teilweise besser an Stressoren anpassen können, wenn nach jeder Stressphase eine Erholungsphase induziert wird, wurde jeweils ein Teil der Versuche (Abb. 36, untere Versuchsserien) wechselartig belastet.

Nach jedem Inkubationszyklus auf der Gradientenplatte (3 Tage bei 28 °C) wurde die Wachstumsgrenze determiniert, und die Kulturen selektiv – wie dargestellt – in je 100 ml Flüssigmedium überführt, um dort erneut eine Vermehrung der Kulturen – ebenfalls nach dreitägiger Inkubationsphase bei 28 °C unter permanentem Schütteln – zu erreichen. Dabei enthielten die Flüssigkulturen für die alkoholische Stressung 4 GG% Alkohol, für die

osmotische Stressung 20 GG% Extrakt und für die kombinierte Stressung 4 GG% Alkohol und 20 GG% Extrakt. Nachdem die Vermehrungsphase abgeschlossen war, wurden erneut je 100 µl Kultur auf die entsprechenden Gradientenplatten ausgestrichen und der Prozess wie gezeigt wiederholt.

Der restliche Teil des Flüssigmediums wurde zentrifugiert (5 min; 3500 rpm = 750 g) und die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 in Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Ermittlung des Druckaufbaus (Zieldruck: 1 bar_ü) in Flüssigkulturen mit gleichen stofflichen Variationen (Methode siehe Kapitel 5.3.1.2, S. 70 ff. (266)).

Nach dem 8. Adaptierungszyklus (n8) wurden vergleichende Fermentationen mit den 3 dauerhaft gestressten Hefen und einer ungestressten Referenzhefe in 4 unterschiedlichen Medien durchgeführt (Würze, Würze mit 4 GG% Alkohol, HG-Würze mit 20 GG% Extrakt und einer Würze mit 4 GG% Alkohol und 20 GG% Extrakt). Zu diesem Zweck wurden zunächst parallel standardisierte Propagationen (siehe Kapitel 5.1.2.1, S. 38 ff.) in den entsprechenden Medien (mit Stressoren) vorgenommen, sodass ausreichend Biomasse zur Verfügung stand, um jeweils 20 Liter mit 30 Mio. HZ/ml anzustellen. Die 16 simultanen, drucklosen Fermentationen bei 15 °C wurden anschließend aus logistischen Gründen in Flaschen vorgenommen, die mit je mit 250 ml angestelltem Fermentat befüllt wurden. Dabei wurde bis zum Erreichen des Endvergärungsgrades täglich der Extraktgehalt, der pH-Wert und die Trübung der Biere bestimmt. Nach einer Lagerungsphase von 14 bzw. 15 Tagen bei 5 °C wurden zusätzlich die FAN-, GNP- und VDK-Gehalte sowie das Zuckerspektrum bestimmt und vergleichende Verkostungen vorgenommen.

Die Abbildung 37 illustriert, bis wohin eine Kulturbildung auf den Gradientenplatten bei dauerhafter Stressbelastung (Abb. 36, jeweils obere Versuchsserie) beobachtet werden konnte.

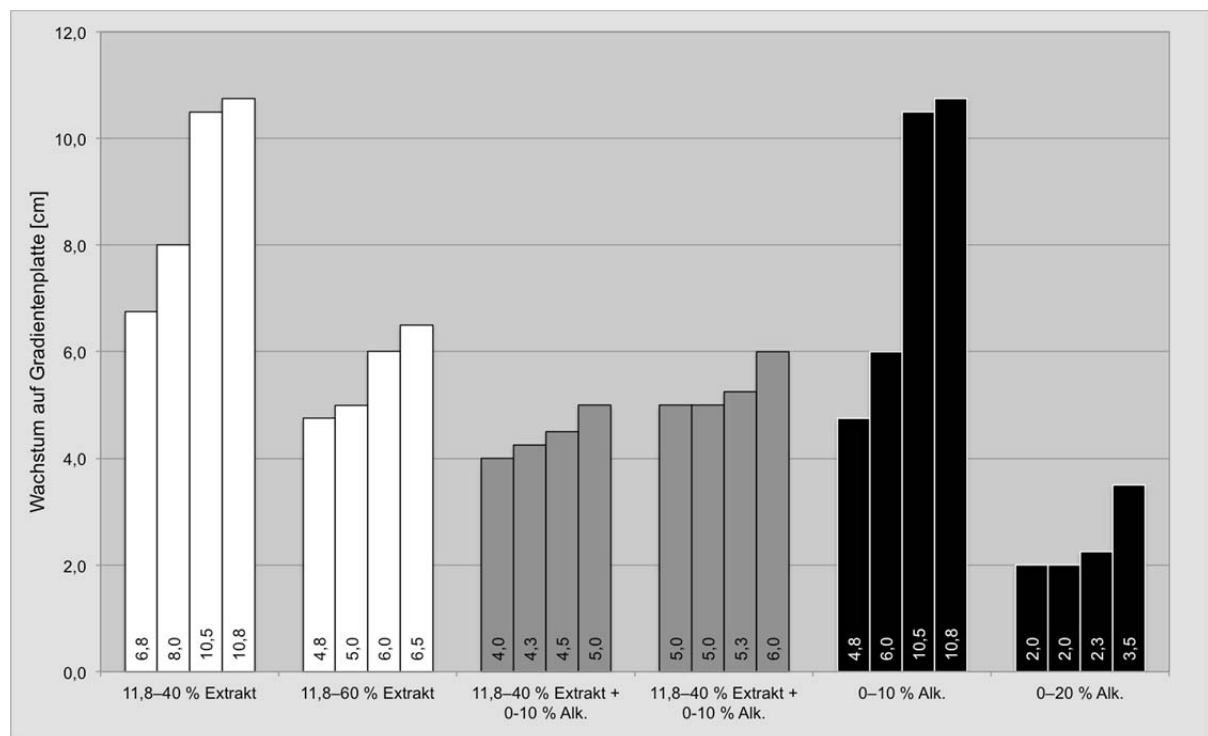


Abb. 37: Wachstumsanpassungen von Hefen bei dauerhafter Stressung

Wie der Abbildung 37 entnommen werden kann, schienen sich die Organismen an die vorherrschenden Bedingungen mit steigender Anzahl der Führungen anzupassen.

Ferner wird ersichtlich, dass die Kombination von Alkohol und hohen Extraktkonzentrationen eine stärker inhibierende Wirkung hatte, weshalb hier keine Erhöhung der Konzentrationen auf der Gradientenplatte nach 4 Führungen erfolgte.

Die Abbildung 38 zeigt das Kulturwachstum auf den Gradientenplatten bei wechselartigen Stressbedingungen (in Abb. 36, jeweils untere Versuchsserie).

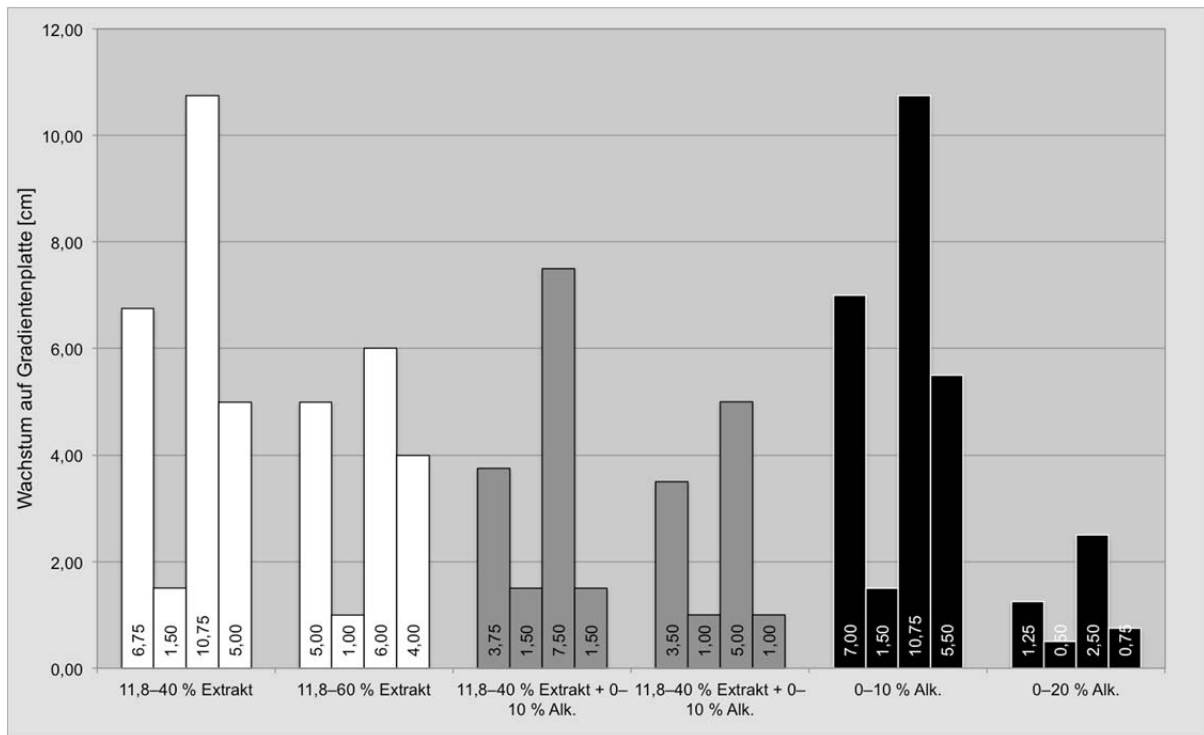


Abb. 38: Wachstumsanpassungen von Hefen bei variierender Stressung

In diesem Experiment wurde nach jeder Stressphase eine Kultivierung in Medien ohne Stressoren vorgenommen. Wie die Abbildung 38 verdeutlicht, hatte diese Vorgehensweise einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum der Hefen auf den Gradientenplatten.

So wuchsen die Organismen nach diesem Prozess nur in Medien an, die deutlich weniger Stressoren enthielten. Dennoch kann auch hier eine Anpassung über den Verlauf beobachtet werden, wenn nur die geraden (n_2, n_4, n_6, n_8) und ungeraden Führungen (n_1, n_3, n_5, n_7) miteinander verglichen werden.

In der Abbildung 39 sind die Zeiten dargestellt, die die dauerhaft stressbelasteten Hefen in entsprechenden Medien benötigten, um rechnerisch 1 bar_ü aufzubauen. Dabei zeigt sich, dass auch hier eine tendenzielle Beschleunigung der Gasbildung (Verringerung der benötigten Zeit um Zieldruck aufzubauen) und somit eine Adaption an die Stressoren resultierte.

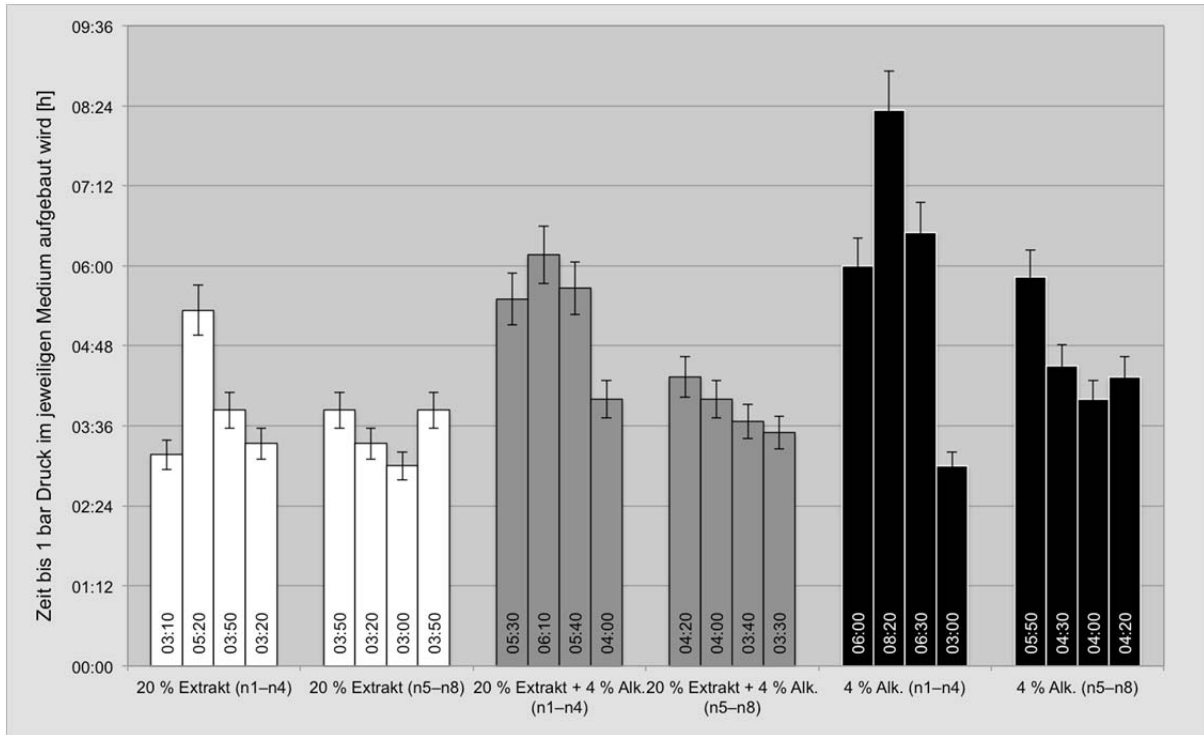


Abb. 39: Extraktabbau von Hefen bei dauerhafter Stressung

In der Abbildung 40 ist der Druckaufbau der zuvor wechselhaft belasteten Hefe dargestellt. Ähnlich wie bei den dauerhaft gleichartig gestressten Organismen kann auch hier eine tendenzielle Beschleunigung der Druckaufbauraten und somit eine Adaption über die Anzahl der Führungen beobachtet werden.

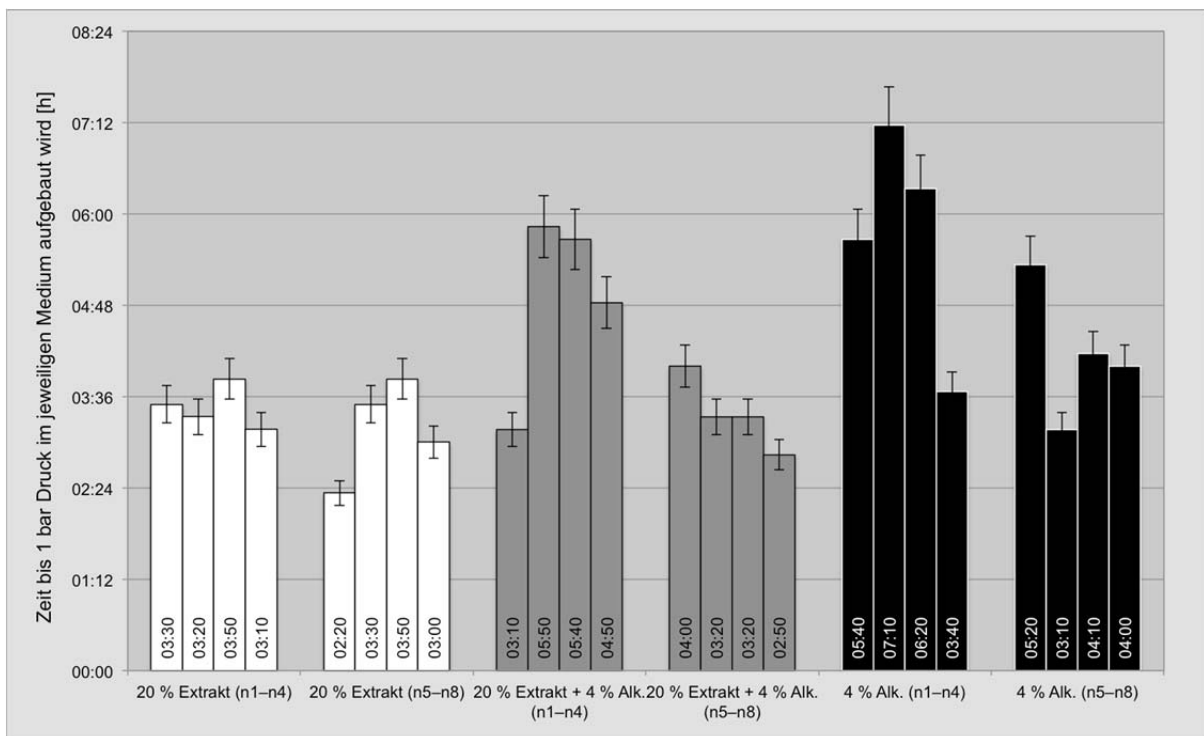


Abb. 40: Extraktabbau von Hefen bei variierender Stressung

Unabhängig von der zuvor über 8 Führungen vorgenommenen Stressungs- und Selektionsmethode konnten bei den anschließenden Fermentationen keine statistisch signifikanten Veränderungen in den Extraktabbauraten und pH-Wert-Reduzierungen beobachtet werden. Daher wird nachfolgend auf eine grafische Versuchsauswertung verzichtet und für weitere Details auf den elektronischen Anhang: EA23 verwiesen.

Marginale Unterschiede ergaben sich lediglich dahingehend, dass die ungestresste Referenzhefe komparativ geringfügig mehr α -Aminostickstoff in Würze, in extraktreicher Würze und in Substrat mit Alkohol und hohem Extraktgehalt verstoffwechselte. Zudem bildete sie in unbehandeltem Nährmedium sowie in der extraktreichen Würze vergleichsweise mehr Gärungsnebenprodukte.

In stark alkoholischen Substraten und in den Substraten mit erhöhtem Stammwürzegehalt und Alkohol bildete die zuvor mit Alkohol gestresste Hefe hingegen etwas mehr Gärungsnebenprodukte.

Die Hefe, die primär wiederholte extraktreiche Fermentationen und Wachstumsphasen durchlief, reduzierte die VDKs vergleichsweise etwas schneller.

Bei den Verkostungen nach DLG-Schema konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Produkten, die mittels gestressten und ungestressten Hefen hergestellt wurden festgestellt werden.

Insgesamt wurde durch die Versuche verdeutlicht, dass sich die Hefen zwar an die vorherrschenden Bedingungen anpassen können (Wachstum und Gasbildung), sich jedoch trotz gezielter Selektion und 8 Wiederverwendungen keine signifikanten Unterschiede bei den Fermentationen ergaben.

Somit scheint der Stamm TUM 34/70 hinreichend stabil zu sein, um in kontinuierlichen Experimenten eingesetzt zu werden.

5.4 Verfahrenstechnische Parameter

Um die kontinuierlich betriebene Pilotanlage adäquat auslegen und anschließend Versuche effizient durchführen zu können, musste die Auswirkung diverser prozesstechnischer Parameter vorab untersucht werden. Daher erfolgten Basisexperimente, in denen die Lagerstabilität von Würzen bei unterschiedlichen Temperaturen getestet wurde.

Außerdem wurde der Einsatz von Bakteriziden zur Erhöhung der mikrobiellen System-sicherheit in Betracht gezogen. So erfolgten Versuche, in denen untersucht wurde, ob Nisin bildende Organismen potenziell in brauereiüblichen Medien kultiviert werden können, um sie im Falle einer effizienten Wirkstoffbildung später gezielt zur Prozessstabilisierung zu verwenden.

Ferner wurde ermittelt, welche Auswirkungen verschiedene Antischaummittel auf Fermentationen und die Brandhefebildung haben.

Abschließend wurde ein alternatives Verfahren entwickelt und getestet, um Verweilzeittests während der Produktion mit geringer Prozessbeeinflussung durchzuführen.

5.4.1 Substratstabilität

Die Stabilität des Fermentationssubstrates ist essenziell, um reproduzierbare und konstante Experimente durchführen zu können. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Lagerungstemperaturen und die Zugabe von Nisin zur Stabilisierung untersucht.

5.4.1.1 Variation der Substratlagerungstemperatur

Um durch die Implementierung von kontinuierlichen Gärverfahren eine maximale Steigerung der Anlageneffizienz und Wirtschaftlichkeit zu gewährleisten, muss eine kontinuierliche Substratzufuhr sichergestellt werden. Produktionspausen und Reinigungszyklen müssen daher berücksichtigt und ggf. eine Pufferung der Würze vorgesehen werden.

Weil Bierwürze ein ideales Nährmedium für zahlreiche Mikroben darstellt und sich die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Fluides rasch verändern, gilt die adäquate Bevorratung des Substrates allerdings als äußerst diffizil.

Bei bisherigen großtechnisch implementierten Verfahren zur kontinuierlichen Bierfermentation wurde die Würze bisher meist kalt bei Temperaturen von unter 5 °C zwischengelagert. Vor der Verwendung des Substrats wurde der Kalttrub in der Regel abgeschieden und das Medium teilweise aufwendig vorfiltriert und/oder erneut hitzebehandelt, um eine Kontaminationsfreiheit sicherzustellen (vgl. Kapitel 3.5, S. 8 ff.).

Weil diese Art der Speicherung jedoch den apparativen und energetischen Aufwand erhöht, wurde in einer Versuchsreihe getestet, welchen Einfluss eine heiße Einlagerung auf wichtige Leitsubstanzen hat.

In Versuchen erfolgte daher die parallele Aufbewahrung der untergärigen Originalbierwürze isotherm bei 4, 20, 60, und 75 °C. Zudem wurde eine Situation geschaffen, die hier als „fallend“ bezeichnet wird, bei der die heiße Würze in einem vollisolierten Behälter eingelagert wurde und sich die Temperatur nur aufgrund von Abstrahlungseffekten reduzierte. Ausgewählte Analysenparameter wurden in einen Zeitraum von 48 Stunden regelmäßig kontrolliert, bevor simultane Vergärungen und eine abschließende, vergleichende sensorische Beurteilung der Produkte erfolgten.

Wie dem elektronischen Anhang EA24 entnommen werden kann, konnten keine signifikanten, temperaturabhängigen Extraktunterschiede festgestellt werden. Der pH-Wert nahm hingegen bei konstanten 75 °C geringfügig stärker ab als bei kühleren Lagerungsbedingungen.

Der FAN-Gehalt aller Produkte wurde hingegen umso stärker reduziert, je wärmer die Lagerungen vorgenommen wurden. Dabei ergab sich ein approximativ linearer Zusammenhang, wobei bei 4 °C eine Reduzierung von rund 2,5 % resultierte und bei 75 °C rund 15 % weniger FAN in den Proben nach 48 stündiger Lagerung enthalten waren.

Außerdem ergaben sich klare Temperaturabhängigkeiten der Parameter Farbe und TBZ, die bei heißer Bevorratung zunahmen, wohingegen die Bittereinheiten durch derartige Pufferungsmethoden tendenziell reduziert wurden.

Nach der beschriebenen Würzelagerung, bei unterschiedlichen Temperaturen und anschließender Temperierung auf 15 °C folgte die simultane Vergärung aller Substrate mit 30 Mio. HZ/ml (TUM 34/70) in KF bei 0,5 bar_i (Methode: siehe Kapitel 5.1.3.2, S. 43 ff.).

Die Extraktreduktion und der pH-Wert-Sturz erfolgten dabei in der zuvor bei 65 °C gelagerten Würze am schnellsten. Die konstant kälter werdende („fallende“) Würze wurde am unzureichendsten verstoffwechselt.

Die abschließende sensorische Kontrolle der Produkte durch 10 DLG-Verkoster/innen ergab, dass lediglich das Bier, welches aus der „fallend“ eingelagerten Würze resultierte, signifikant (negativ) von den anderen Produkten abwich. Ferner wurde die Bittere aus den Produkten der zuvor heiß eingelagerten Substrate (60 und 75 °C) als nachhängend und adstringierend empfunden. Somit sollte eine kalte Würzeeinlagerung bei Versuchen zur kontinuierlichen Gärung präferiert werden.

5.4.1.2 Substratstabilität: Zugabe Bakterizide

Um die mikrobiologische Sicherheit des Substrates bei einer Einlagerung sowie die der folgenden Prozesse zu erhöhen, besteht neben der Hitzebehandlung die Möglichkeit, dem Medium antimikrobiell wirksame Stoffe wie Bakterizide zuzugeben.

Nisin ist dabei besonders geeignet, da es hitzebeständig, bereits in zahlreichen Ländern zugelassen und nachweislich gegen mehr als 90 % aller grampositiven, bierschädlichen Bakterien (Hauptkontaminanten) wirksam ist. Hefen sollen hingegen nicht durch das Peptid Nisin beeinflusst werden, weshalb Bierfermentationen laut Literatur unverändert erfolgen. Außerdem gilt der Verzehr von Nisin – zumindest in bestimmten Konzentrationen – für den Menschen als unbedenklich, weshalb das Produkt von der FDA (*Food and Drug Administration*) den GRAS-Status (*generally recognized as safe*) erhielt.

Eine genauere Wirkstoffbeschreibung sowie tiefergehende allgemeine Informationen sind in der englischsprachigen Veröffentlichung (280) dargestellt.

Da Nisin von bestimmten Milchsäurebakterien (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) natürlich produziert wird, wurde im Rahmen dieser Abhandlung untersucht, ob derartige Stämme in brauereitypischen Umgebungen kultiviert werden können, um den Wirkstoff ggf. innerbetrieblich herstellen und einsetzen zu können.

Zu diesem Zweck wurden 4 frei erhältliche Stämme (NCIMB 8780, 8586, 701402 und 701403), die bekanntermaßen das Potenzial haben, Nisin zu bilden, mit 7 weiteren Laktokokken-Stämmen (TUM 575, 8947, 8127, 8446, 8673, 8973 und 8872) verglichen, die zuvor aus kontaminierten Getränken isoliert und identifiziert werden konnten.

Die genetischen Untersuchungen ergaben, dass einige Stämme enge Verwandtschaftsgrade aufwiesen und sich Abweichungen innerhalb der TUM- und der NCIMB-Cluster ergaben. Außerdem besaß keiner der Organismen die Gene *HorA*, *HorC* und *ORF5*, weshalb alle Stämme als hopfensensitiv einzustufen sind.

Der Agar-Diffusion-Assay-Test erwies sich als die zuverlässigste Methode, um die Wirkstoffkonzentrationen reproduzierbar zu bestimmen. Mithilfe dieses Verfahrens konnte gezeigt werden, dass nur die NCIMB-Stämme Nisin bildeten.

Das Medium MRS schien den Organismen bessere Wachstumsbedingungen zu liefern als (ungehopfte) Vorderwürze und (gehopfte) Würze, was sich auch in einer verstärkten Nisin- und Säurebildung äußerte.

Insgesamt zeigte sich, dass die Stämme NCIMB 8780 und NCIMB 8586 vergleichsweise am meisten Nisin bildeten und toleranter hinsichtlich Bitterstoffen, Ethanol und hohen sowie niedrigen Extraktgehalten waren.(281)

5.4.2 Antischaummitteleinsatz

Ogleich der Bierschaum im Fertigprodukt ein wichtiges Qualitätsmerkmal darstellt, können Schäume während des Herstellungsprozesses zu einer Vielzahl an Problemen, z. B. der Verschmutzung von Anlagenkomponenten und der Abscheidung wertgebender Bestandteile führen.

Bei kontinuierlich betriebenen Fermentationsanlagen besteht außerdem die Gefahr, dass sich schaumbedingte Verunreinigungen wie Brandhefeansätze über die Betriebszeit anreichern und somit sukzessiv zu einer negativen Produktbeeinflussung führen können.

Neben diversen verfahrenstechnischen und technologischen Möglichkeiten kann der Einsatz von Antischaummitteln dazu beitragen, die Schaumbildung zu kontrollieren bzw. zu reduzieren.

In einer Versuchsserie die im Rahmen dieser Arbeit entstand, wurden daher verschiedene Auswirkungen eines silikonbasierten und zweier hopfenbasierter Antischaummittel vergleichend getestet.

Wie aus der englischsprachigen Veröffentlichung (282), hervorgeht, ist die benötigte Einsatzkonzentration zur Reduzierung der Kräusendeckenhöhe dabei linear abhängig vom Oberflächen- zu Gesamtvolumenverhältnis.

Ferner zeigte sich, dass die hopfenbasierten Antischaummittel idealerweise klassisch, d. h. homogen zur Würze vor Fermentationsbeginn gegeben werden sollten, wohingegen sich bei dem silikonbasierten Mittel bessere Resultate durch eine vorangestellte Benetzung der Tankinnenwandungen ergaben.

Außerdem konnte im Kleinmaßstab festgestellt werden, dass durch den Einsatz derartiger Stoffe potenziell der Verschmutzungsgrad um bis zu 20 % reduziert werden kann.

Keine eindeutigen Ergebnisse lieferten die Fermentationsanalysen. So ergaben sich schnellere Gärungen bei Antischaummittelgaben im 2-Liter-Maßstab (KF), die jedoch nicht im 50 Liter-Maßstab (TF50) reproduziert und somit verifiziert werden konnten.

Zudem konnten im Unfiltrat Abweichungen hinsichtlich der Schaumhaltbarkeit und Beeinflussungen der Oberflächenladungen und Angärgeschwindigkeiten von Erntehefe beobachtet werden. Dennoch hatten die Substanzen keinen signifikanten Einfluss auf sensorische Parameter im Unfiltratbereich.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde entschieden, verschiedene Dosagearten bei den Langzeitversuchen im kontinuierlichen Modus zu testen, um dort Effekte auf die Brandhefebildung zu ermitteln. Diese Versuche sind im Kapitel 6.2, S. 89 ff. dargestellt.

5.4.3 Verweilzeittests

Um das gewählte Reaktordesign und dessen Betrieb adäquat beurteilen zu können, müssen die im System vorherrschenden Strömungsbedingungen primär determiniert werden. Üblicherweise werden hierzu Indikatorsubstanzen eingesetzt, die eine Konzentrationsbestimmung in der Anlage ermöglichen. Weil diese sogenannten *Tracer*, z. B. salzhaltige Fluide und/oder Farbstoffe, allerdings die Fermentationen beeinflussen oder deren Gehalte während Gärungen nicht hinreichend genau bestimmt werden können, wurden Experimente herkömmlich in wässrigen Lösungen und in Abwesenheit der Fermentationsorganismen durchgeführt.

Da das zu testende Verfahren jedoch auf natürlichen Strömungsvorgängen basiert (siehe Kapitel 4, S. 27 ff.) und der Anteil des zwangsdurchströmten Fluides im Verhältnis zu den Reaktorvolumina gering ist, eigneten sich konventionelle Verweilzeittestverfahren hier nicht.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Abhandlung ein Verfahren entwickelt und getestet, um Strömungsvorgänge in Reaktoren mithilfe von sogenannten *Biotracern* bestimmen zu können.

Wie der englischsprachigen Veröffentlichung (283) entnommen werden kann, wurden dazu zunächst Hefestämme bestimmt, die ähnliche Gäreigenschaften wie die Kulturorganismen aufwiesen, diese sich jedoch entweder in bestimmmbaren genetischen Merkmalen, oder in Stoffwechseleigenschaften unterscheiden ließen.

Dabei zeigte sich, dass sowohl der modifizierte Raffinosestest als auch die Kapillarelektrophorese effiziente Möglichkeiten darstellen, um größere Mengen an obergärigen Hefen in untergärigen Populationen zuverlässig und quantitativ nachzuweisen.

Somit sind diese Analysenmethoden für Strömungsermittlungen mittels Stufenfunktionen geeignet, bei denen der Fermentationsorganismus vollständig durch den *Tracerorganismus* substituiert wird.

Da jedoch eine derartige quantitative Differenzierung von untergärigen *Tracerhefen* in untergärigen Kulturhefen nicht mithilfe der genannten Methoden erfolgen kann, sollte eine Strömungsevaluierung bei beschriebenen Bedingungen über Impulsfunktionen erfolgen, bei der geringe Mengen des *Tracerorganismus* in den Reaktorzulauf injiziert werden. Der Durchbruch kann in diesem Fall mittels klassischer PCR-Nachweismethoden bestimmt werden.

Weil dazu aber eine aufwendige, permanente Probenahme und Analyse erfolgen muss, wurde das Strömungsverhalten in der Pilotanlage vorab über einer Sprungfunktion bestimmt, bei der der untergärige Kulturorganismus TUM 34/70 im Zulauf durch den obergärigen Hefestamm TUM 68 vollständig ersetzt wurde.

Bei nahezu konstanter Aufrechterhaltung des Extrakt-niveaus im Fermenter ergab der modifizierte Raffinosestest, dass bei einer Gärtemperatur von 16 °C und einer Anstellhefemenge von 50 Mio. HZ/ml eine nahezu ideale Durchmischung in dem entwickelten, kontinuierlich betriebenen Reaktor vorherrschte.(283)

Um das Strömungsverhalten in der dauerhaft kontinuierlich betriebenen Pilotanlage mit mehreren Fermentern zu testen, erfolgten daher in den Langzeitversuchen sowohl Untersuchungen mittels Sprung- als auch mit Stufenfunktionen (vgl. Kapitel 6.2, S.89).

6 KONTINUIERLICHE FERMENTATION

Nachdem in den Basisexperimenten die biokinetischen Reaktionsmechanismen der Fermentationsorganismen bei verschiedensten Bedingungen zu Referenzzwecken in Batchverfahren evaluiert und diverse alternative Verfahren zur Prozess- und Anlagenkontrolle entwickelt wurden, konnte eine Pilotanlage – basierend auf dem in Kapitel 4, S. 27 ff. beschriebenen Konzept – entworfen und getestet werden.

Nachfolgend wird zunächst das finale Anlagendesign und Bedienprinzip der Pilotanlage erläutert, bevor ausgewählte Ergebnisse aus vier Langzeitversuchen dargestellt werden. Zusätzliche Informationen werden in den jeweiligen elektronischen Anhängen der Kapitel zusammengefasst.

6.1 Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation

Eine Herausforderung bei der Planung und konstruktiven Gestaltung kontinuierlicher Gärverfahren im Versuchsmaßstab stellt insbesondere die Wahl geeigneter Durchsatzraten und somit Dimensionen dar (vgl. Kapitel 3.2, S. 4 ff.).

Um unter Berücksichtigung logistischer Aspekte ein benötigtes Maß an Prozessstabilität zu gewährleisten und eine adäquate Dimensionierung der Antriebe und Schnittstellen zu ermöglichen, wurde hier eine (Fermentations-)Leistung von 50 Liter pro Tag als ideal angesehen.

Somit beträgt die durchschnittliche angestrebte Verweilzeit in den modifizierten Testfermentern (TFM50), die das Herzstück der Anlage bilden, 24 Stunden pro Tank.

In der Abbildung 41 wird das nach diversen Modifikationen optimierte Konzept der Pilotanlage grafisch illustriert, bevor eine chronologische Prozess- und Verfahrensbeschreibung zum Betrieb der Anlage folgt.

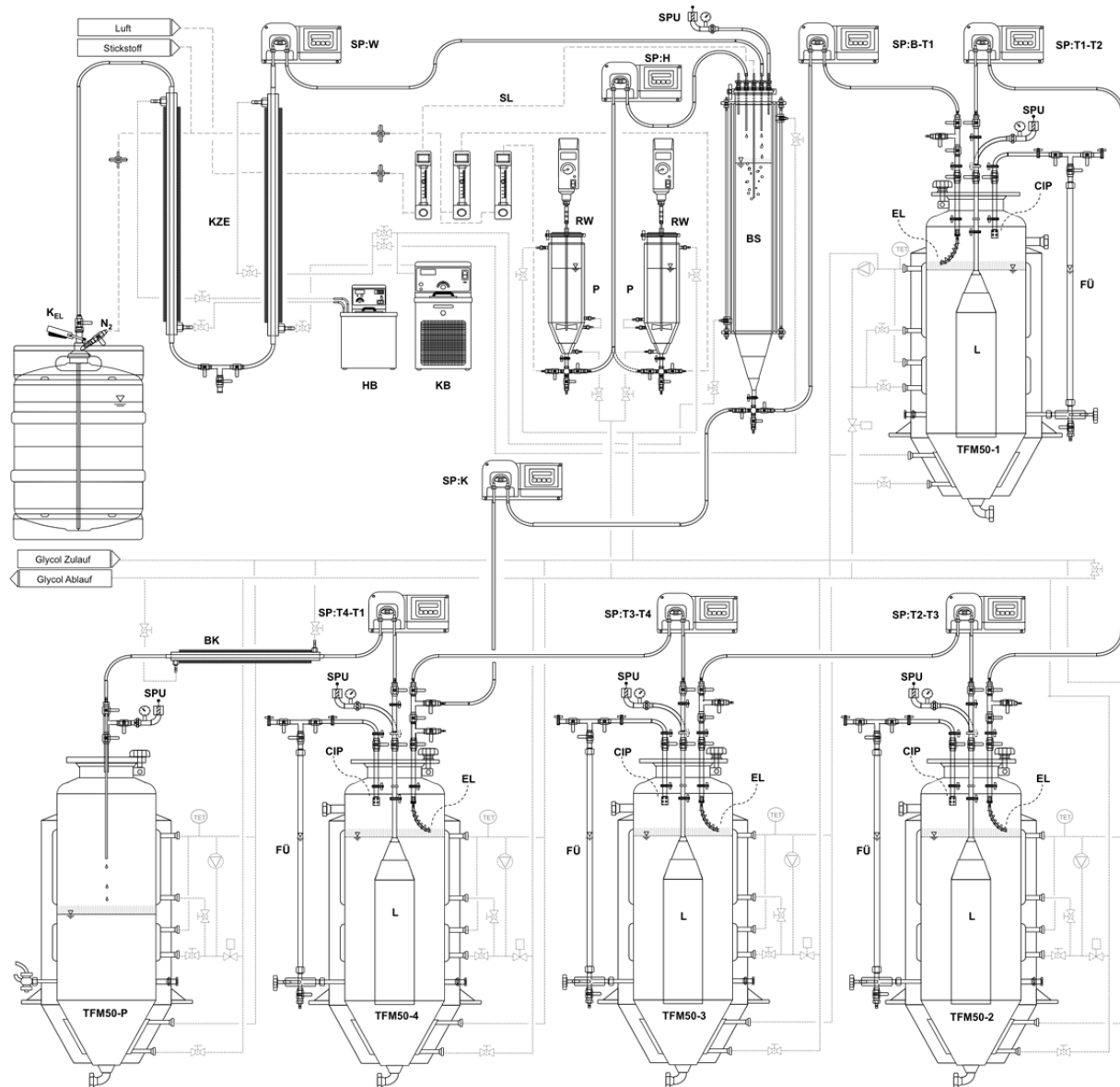


Abb. 41: Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation

6.1.1 Fermentationssubstrat

Die in den Kapiteln 5.1.1, S. 35 ff. und 5.4.1, S. 79 ff. dargestellten Versuche ergaben, dass untergärige Bierwürze, die zuvor heiß entnommen, druckbeaufschlagt und anschließend rasch abgekühlt wurde, eine hinreichende Lagerstabilität bei Zimmertemperaturen aufweist, um auch noch Tage später als qualitativ hochwertiges Fermentationssubstrat eingesetzt werden zu können. Daher wurde die benötigte Würzmenge (350 Liter/Woche) einmal wöchentlich entsprechend in Edelstahlfässern eingelagert, sodass täglich ein KEG (K_{EL}) zur Beimpfung der Anlage zur Verfügung stand. Dabei erfolgte die Gasbeaufschlagung der Gebinde mit Stickstoff ($N_2:1,5 \text{ bar}_ü$), um eine Karbonisierung des Substrates zu vermeiden und den Würzetransfer über den Kurzzeiterhitzer (KZE) in die Schlauchpumpe (SP:W) zu gewährleisten.

Weil sich – unabhängig von der Haltbarkeit des Nährmediums – die Kontaminationsgefahr durch die wiederholte Operation des An- und Absteckens der Würzebehälter (K_{EL}) erhöht, wurde das Substrat erneut hitzebehandelt (kurzzeiterhitzt). Dazu wurde die Würze zunächst kontinuierlich in einem isolierten Doppelrohrwärmetauscher – gespeist über die Zirkulationsleitung eines Heißwasserbades (HB) – im Gegenstrombetrieb auf 75 °C erhitzt, sodass bei gewählter Rohrlänge und angestrebter Durchsatzrate eine Heißhaltezeit von rund 60 Sekunden und somit 145 Pasteurisationseinheiten (PE) resultierten. In einem 2. identisch ausgeführten Doppelrohrkühler – gespeist über ein separates Kaltwasserbad (KB); ebenfalls im Gegenstrombetrieb – erfolgte anschließend die Abkühlung des Produktes auf 15 °C.

6.1.2 Belüftung und Inokulation

Weil die geringen Durchflussraten und Leitungsquerschnitte in der Pilotanlage keine übliche Belüftung der Kaltwürze in der Transferleitung zuließen, wurde das Substrat kontinuierlich, mithilfe einer Schlauchpumpe (SP:W) in einen Vorreaktor gepumpt, der nachfolgend auch als Belüftungsstrecke (BS) bezeichnet wird. In diesem doppelwandigen, temperierbaren, auf 0,05 bar_i gespundeten, zylindrokonischen Behälter mit Plexiglaszarge wurde kontinuierlich Sterilluft (SL) (80 ml/min) über einen zentral angeordneten, im Niveau verstellbaren Stechdeggen eingeleitet, sodass eine hinreichende Sauerstoffsättigung des Substrates sichergestellt werden konnte.

Ferner bewirkten die aufsteigenden Luftblasen in dem Reaktor (BS) eine partielle Durchmischung des Behälters (Wirkbereich steuerbar über die Eintauchtiefe des Stechdeggens), sodass die von oben mittels Schlauchpumpe (SP:H) dosierte Hefesuspension homogen verteilt werden konnte.

Die durchschnittliche, arithmetische Verweilzeit in dem Reaktor betrug je nach Füllstandshöhe und Durchflussgeschwindigkeit 2–4 Stunden.

Ein 3-Wege-Hahn am Konusauslauf der Belüftungsstrecke ermöglichte die chargenweise Trubstoffentfernung, die üblicherweise einmal täglich erfolgte, sowie die kontinuierliche Ableitung des Fluides in den ersten modifizierten Reaktor (TFM50-1) über die Schlauchpumpe (SP:B-T1). Darüber hinaus konnte wahlweise zusätzlich ein Teilstrom des sich im Hochkräusenstadium befindlichen Produktes über die Schlauchpumpe (SP:K) abgeführt und in einen beliebigen nachgeschalteten Tank (in Abb. 41: TFM50-4) eingeleitet werden.

6.1.3 Hefedosage und Lagerung

Um die Dosagegenauigkeit der Anstellhefe zu erhöhen und eine konstante Pump- und Fließfähigkeit der Suspension zu gewährleisten, wurde diese immer primär – durch Zugabe von sterilisiertem Wasser – auf eine Zellzahl von 600 Mio. HZ/ml eingestellt. Die Einlagerung der Organismen erfolgte kalt bei 3 °C in zylindrokonischen, doppelwandigen, glykolgekühlten Dosagebehältern aus Edelstahl, die nachfolgend auch als Propagatoren (P) bezeichnet werden.

Damit die Homogenität der Hefelösung in diesen Behältern aufrecht erhalten und Verblockungen der Dosageleitung verhindert werden konnten, wurde permanent steriler Stickstoff (N₂) über einen 3-Wege-Hahn an der Konusspitze eingeleitet und das Fluid zusätzlich mithilfe von Rührwerken (RW) durchmischt (60–80 rpm).

Die Installation von zwei baugleichen Tanks (P) ermöglichte eine separate Behälterreinigung, die Einlagerung größerer Hefemengen bei identischen Bedingungen und/oder die parallele Nutzung eines der Gefäße als Propagator/Assimilator.

6.1.4 Hauptreaktoren (TFM50)

Um das im Kapitel 4, S. 27 ff. beschriebene Verfahren und Anlagenkonzept zu testen, wurden neuartige Tankdeckel für die Testfermenter (TF50) entwickelt, sodass jeweils ein Einlaufstutzen, ein zentral angeordnetes, nach unten geöffnetes Leitrohr (L), eine Reinigungsvorrichtung (CIP) und eine Spundungsleitung (SPU) in das Tankinnere geführt werden konnten. Diese Zu- und Ablaufleitungen wurden auf der außenliegenden Seite mit Ventilkombinationen versehen, sodass bei Bedarf Absperrungen und Flüssigkeitsumleitungen, z. B. zur Leistungsbestimmung und analytischen Prozessüberwachung, vorgenommen werden konnten.

Zudem wurden die Probennehmer an der Tankzarge so modifiziert, dass eine permanente, individuelle Füllstandsüberwachung ermöglicht wurde. Die dazu zweckmäßige Verbindung des transparenten Füllstandsrohres (FÜ) mit der Reinigungsvorrichtung (CIP) im Tankinneren bot den Vorteil, dass das kommunizierende Leitungssystem separat gereinigt und bei Bedarf Stoffe wie Antischaummittel gezielt eingeleitet und dispergiert werden konnten.

Die kontinuierliche Durchströmung der Kaskade wurde realisiert, indem jeweils eine vorgeschaltete Schlauchpumpe (SP) das Fluid in den seitlichen inneren Einlauf (EL) des nachgeschalteten Hauptreaktors förderte und simultan das Fermentat über die Leitrohre (L) abgeführt wurde.

Zur Einstellung unterschiedlicher Druckniveaus in der Kaskade wurden individuell justierbare Spundungsventile (SPU) mit den Tankdomarmaturen der modifizierten Testfermenter (TFM50) verbunden.

6.1.5 Lagerung und Produktabführung

Wie aus der Abbildung 41 hervorgeht, konnte das Produkt bei Bedarf über einen baugleichen, glykolbetriebenen Doppelrohrwärmetauscher im Gegenstrom auf Lagertemperatur abgekühlt werden (BK). Außerdem konnte Kräusen aus der Belüftungstrecke (BS) über eine Schlauchpumpe (SP:K) an beliebiger Prozessstelle zugegeben werden.

Der letzte Tank (in Abb. 41: TFM50-5) diente in der Regel als Pufferbehälter, sodass täglich ein KEG mit temperiertem Produkt entnommen und wahlweise weiterbehandelt (z. B. abgekühlt und/oder filtriert) werden konnte.

6.1.6 Probenahme und Systemeinstellung

Um eine adäquate Prozessbeurteilung zu ermöglichen, wurden Probenahmestellen apparativ so konzipiert, dass Analysen aus allen Aggregaten sowie aus deren Zu- und Abläufen erfolgen konnten.

Eine Herausforderung bei dem Betrieb der Anlage stellte insbesondere die manuelle Einstellung der Flussraten dar. Weil Variationen hinsichtlich der Schlauchausdehnungskoeffizienten in den Pumpen aufgrund von unterschiedlichen Druckniveaus resultierten und zudem Gas-Flüssigkeitsgemische gefördert wurden, mussten alle Pumpeneinstellungen mindestens dreimal täglich überprüft und angepasst werden. Wahlweise konnte dies geschehen, indem der Zu- oder Abfluss in ein vor- oder nachgeschaltetes Aggregat unterbrochen und die zeitliche Füllstandsveränderung bestimmt, prozentual umgerechnet und die Einstellungen entsprechend angepasst wurden.

Alternativ dazu konnte die Flussrate durch die Ableitung und volumetrische Bestimmung des Fluides in einem zuvor definiertem Zeitraum ermittelt werden. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass die Messungen schneller erfolgen konnten und Probenmaterial nicht gesondert entnommen werden musste.

Die Abbildung 42 zeigt die finale Konfiguration der Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation. Im elektronischen Anhang EA28 finden sich außerdem weitere ausgewählte Fotos und Videos, die einen besseren Gesamteindruck des Betriebes vermitteln.



Abb. 42: Foto der Pilotanlage zur kontinuierlichen Fermentation

6.1.7 Analysenmethoden

Nachfolgend werden die Methoden zur Qualitätsüberwachung während der kontinuierlichen Langzeitversuche (LV1-LV4) tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 14: Methoden zur Qualitätsüberwachung der kontinuierlichen Fermentationen

Parameter	LV1 [29d]	LV2 [28d]	LV3 [37d]	LV4 [57d]	Methode
X = täglich analysiert // + = sporadisch analysiert // - = nicht analysiert					
Würze					
Extrakt/Stammwürze	X	X	X	X	MEBAK II 2.10.6.3
FAN	X	X	X	X	MEBAK III 3.3
pH-Wert	X	X	X	X	MEBAK II 2.14
Zuckerspektrum	+	+	+	+	MEBAK III 3.2.1
TBZ	+	+	+	+	MEBAK II 2.4
Endvergärungsgrad	+	+	+	+	MEBAK II 2.9.1.
Anstellhefe & Erntehefe					
Hefezellzahl (gesamt)	X	X	X	X	MEBAK 10.11.4.4
Viabilität der Hefe	X	X	X	X	MEBAK III 10.4.4.1
Unfiltrate aus Reaktoren					
Extrakt/Stammwürze	X	X	X	X	MEBAK II 2.10.6.3
Beschreibende Verkostung	X	X	X	X	Je 10 Verkoster/innen
pH-Wert	+	+	X	X	MEBAK II 2.14
Zuckerspektrum	+	+	-	-	MEBAK III 3.2.1
Viabilität: Hefe in Schwebel	+	+	X	+	MEBAK III 10.4.4.1
Viabilität: Erntehefe	+	+	X	X	MEBAK III 10.4.4.1
VDK; (Gesamt)	-	+	+	X	WBBM 2.21.5.1
VDK: Diacetyl frei	-	+	+	X	MEBAK III 1.2.1
VDK: 2,3-Pentandion-frei	-	+	+	X	MEBAK III 1.2.1
GNP: Acetaldehyd	-	+	-	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: Ethylacetat	-	+	-	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: n-Propanol	-	+	-	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: i-Butanol	-	+	-	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: i-Amylacetat	-	+	-	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: Amylalkohole	-	+	-	-	MEBAK III 1.1.1
Manuell: Druck, Temperatur, Füllstand, Flussraten, Mikrobiologie, Verweilzeittests siehe: (283)					
Filtrate (täglich je 50 Liter Sammelprobe)					
Extrakt/Stammwürze	-	-	X	X	MEBAK II 2.10.6.3
Vergärungsgrad	-	-	X	-	WBBM 2.9.6.3
Alkohol	-	-	X	-	WBBM 2.9.6.3
Farbe	-	-	X	-	WBBM 2.12.1
Trübung	-	-	X	-	WBBM 2.14.1.2
Schaum	-	-	X	X	WBBM 2.18.4
VDK; (Gesamt)	-	-	X	X	WBBM 2.21.5.1
VDK: Diacetyl frei	-	-	X	X	MEBAK III 1.2.1
VDK: 2,3-Pentandion-frei	-	-	X	X	MEBAK III 1.2.1
GNP: Acetaldehyd	-	-	X	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: Ethylacetat	-	-	X	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: n-Propanol	-	-	X	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: i-Butanol	-	-	X	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: i-Amylacetat	-	-	X	-	MEBAK III 1.1.1
GNP: Amylalkohole	-	-	X	-	MEBAK III 1.1.1
FAN	-	-	X	X	MEBAK III 3.3
Summe der Aminosäuren	-	-	X	X	WBBM 2.6.4.1.2
Schwefeldioxid	-	-	X	-	WBBM 2.21.8.2
EBC-Bittereinheiten	-	-	X	X	WBBM 2.17.1
Zuckerspektrum	+	-	-	-	MEBAK III 3.2.1
Verkostung DLG	-	-	X	-	MEBAK II 2.34.3
Beschreibende Verkostung	-	-	X	X	Je 10 Verkoster/innen

6.2 Langzeitversuche

Insgesamt wurden 4 Langzeitversuche in der kontinuierlich betriebenen Pilotanlage durchgeführt und zahlreiche Modifikationen getestet, bis ausreichende Kenntnisse generiert werden konnten, um Prozesskonfiguration zu bestimmen, mit denen sich Produkte in gewünschter Qualität langfristig herstellen ließen.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuchsserien werden nachfolgend chronologisch zusammengefasst. Zudem werden weitere Informationen strukturiert im elektronischen Anhang EA29–EA32 präsentiert

6.2.1 Langzeitversuch 1 (LV1): [Laufzeit 29 Tage]

In der ersten Versuchsreihe wurde die Dauerstabilität der Pilotanlage getestet. Zudem mussten störanfällige Stellen ermittelt und eliminiert werden. Überdies sollten die Erfahrungen aus dem Experiment später dazu genutzt werden, um apparative und verfahrenstechnische Optimierungen vorzunehmen und den Analysenumfang sukzessiv zu erweitern (siehe Tabelle 14).

Zu diesem Zweck wurden zunächst 3 Reaktoren (TFM50:1-3) chargenweise und jeweils um 24 Stunden zeitlich versetzt mit 50 Mio. HZ/ml (Stamm TUM 34/70) bei 15 °C und 0,5 bar Spundungsdruck angestellt.

Dabei basierte die Wahl dieser Parameter auf den Kenntnissen aus den Basisexperimenten, bei denen sich im Batchmodus gezeigt hatte, dass so der Extraktgehalt nach 76 Stunden nahezu vollständig abgebaut, das Diacetyl auf Gehalte unter 0,15 mg/l reduziert und simultan verhältnismäßig wenig Biomasse gebildet wurde (siehe Kapitel 5.2.1, S. 52 ff.).

60 Stunden nach dem Anstellen des ersten Fermenters (TFM50-3) wurde die Würze in der Belüftungsstrecke (BS) identisch inokuliert, sodass drei Stunden später der kontinuierliche Modus mit drei Hauptreaktoren und einem nachgeschalteten Puffertank, in dem das Produkt bei 3 °C zwischengelagert wurde, eingeleitet werden konnte.

Während des gesamten Langzeitversuchs wurden die genannten Gärtemperaturen und Anstellzellzahlen konstant aufrechterhalten. Lediglich der isobare Spundungsdruck wurde durch einen geringen Druckgradienten ersetzt (0,6; 0,5 und 0,4 bar_i), um das angestrebte industrielle Verfahren besser zu simulieren, bei dem der Fluidtransfer nicht über Primärantriebe wie Pumpen, sondern über Druckgefälle realisiert werden soll (vgl. Kapitel 4, S. 27 ff.).

Während des Experiments wurden zur Qualitäts- und Prozessüberwachung täglich mehrmals Proben aus den Fermentern, dem Puffertank sowie aus deren Zu- und Abläufen entnommen. Wie die Abbildung 43 illustriert, stellten sich Extraktgradienten über den Kaskadenverlauf ein, die trotz gewisser Schwankungen relativ konstant über die Laufzeit der Anlage aufrecht erhalten werden konnten.

Ferner wird ersichtlich, dass sich die Extraktdifferenzen zwischen den Zu- und Abläufen der Reaktoren im Gärverlauf zunehmend verringern und sich daher die Kurven aneinander annähern.

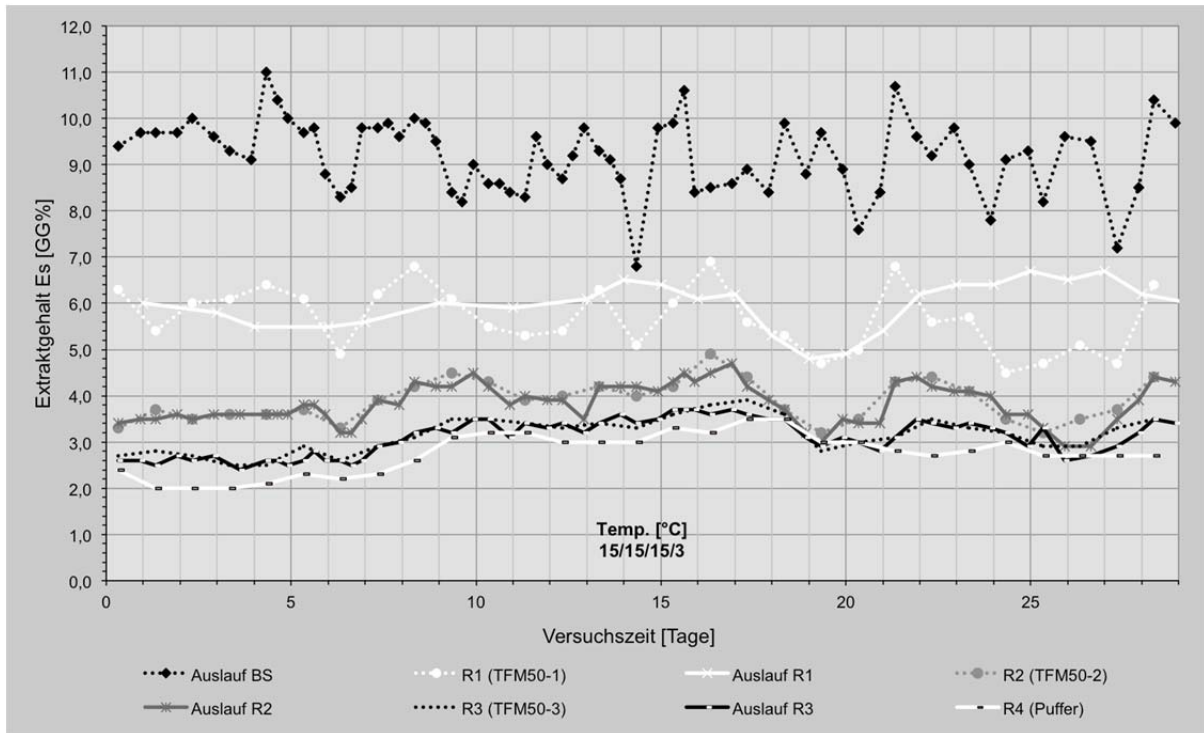


Abb. 43: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV1)

Die in der Abbildung 44 dargestellte Auswertung der Vergärungsgrade zeigt, dass insbesondere zu Versuchsbeginn höhere Vergärungsgrade erzielt wurden als in der 2. Hälfte des Experimentes. Die Vergärungsgrade verhalten sich somit reziprok zu den in der Abbildung 43 dargestellten Substratabbauraten.

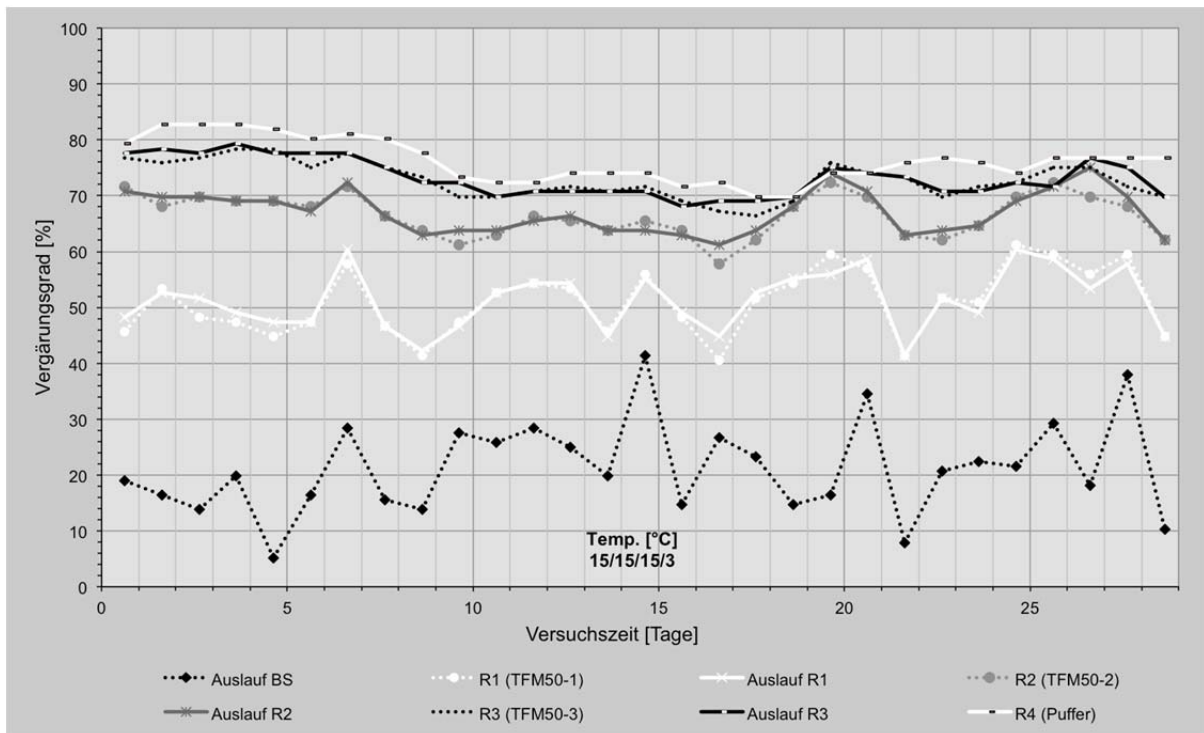


Abb. 44: Vergärungsgrade in der Pilotanlage (LV1)

Um dieses Verhalten genauer beurteilen zu können, sind in der Abbildung 45 die durchschnittlichen Extraktgehalte der kontinuierlich betriebenen Kaskade und deren Standardabweichungen dargestellt. Außerdem sind die zu erwartenden Abbauraten bei Batchfermentationen mit unterschiedlichen Anstellzellzahlen (berechnet über die Formel der Tabelle 9) gezeigt, sodass eine vergleichende Bewertung vorgenommen kann.

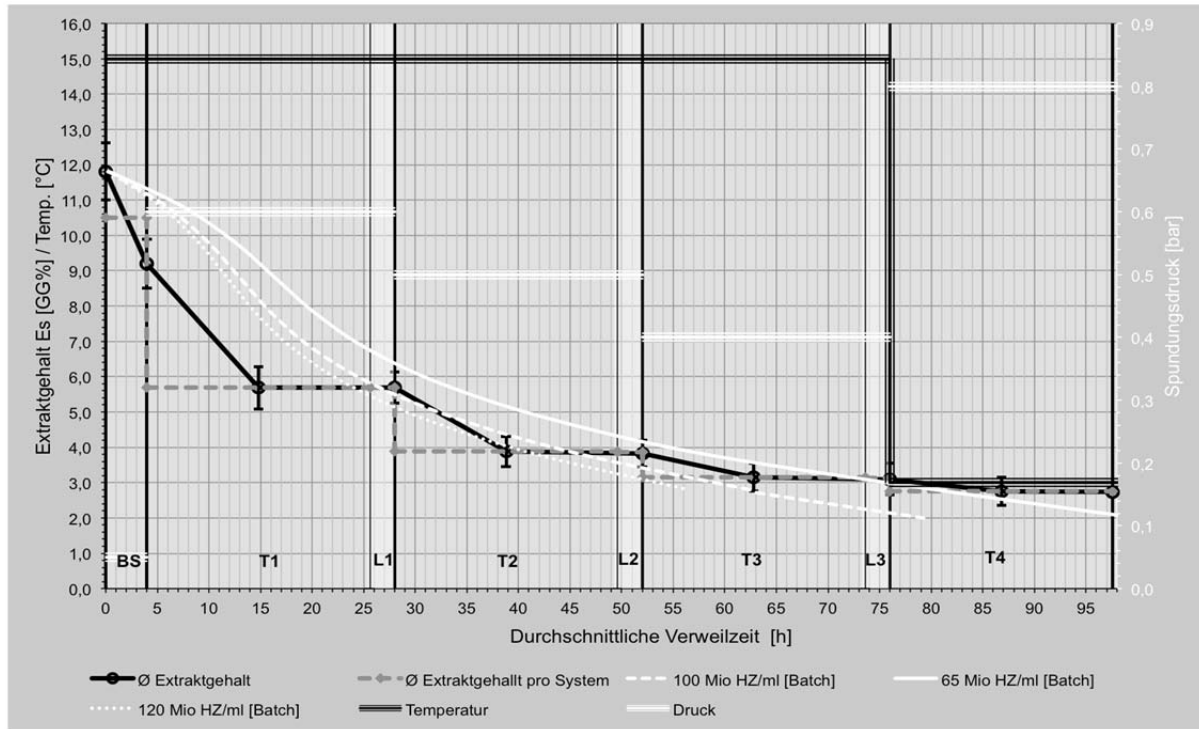


Abb. 45: Verfahrenseinstellungen (LV1)

Aus den Reduzierungen der Geradensteigungen (Abb. 45) geht hervor, dass sich der Extraktabbau im System sukzessiv verringerte. Ferner wird ersichtlich, dass die Stoffwechselaktivität in der Belüftungsstrecke extrem hoch war. Wohingegen die Substrataufnahme bei Batchprozessen aufgrund von Adaptionsprozessen klassisch verzögert eintritt (Lag-Phase), scheint dies bei entsprechendem, kontinuierlichen Betrieb in der beschriebenen Konfiguration nicht der Fall zu sein. Dabei verhält sich das permanent mit rund 50 Mio. HZ/ml inokulierte System eher wie ein Chargenprozess, der mit doppelt so hoher Zellzahl angestellt wird.

Die sporadisch durchgeführten Analysen der Gärungsnebenprodukte aus dieser Versuchsserie lassen aufgrund der großen Schwankungen und partiellen Problemen bei der Probenverarbeitung keine klaren Aussagen oder Vergleiche zu (vgl. EA29).

Bei den Verkostungen stellte sich jedoch heraus, dass die unfiltrierten Biere sensorisch als qualitativ hochwertig empfunden wurden, wobei der Eindruck der Bittere leicht schwankte und die Vollmundigkeit mit abnehmendem Vergärungsgrad gegen Versuchsmitte – ca. ab dem 12. Tag – als angenehmer empfunden wurde.

Organoleptisch waren über den vollständigen Versuchsverlauf keine Fehleraromen im frischen Unfiltrat erkennbar.

Ferner wurde die Anlagenverschmutzung nach Beendigung des Tests und Entleerung der Anlage beurteilt und in Bildern festgehalten. Die Ergebnisse werden vergleichend in der Abbildung 51, S. 96 beschrieben und diskutiert.

6.2.2 Langzeitversuch 2 (LV2): [Laufzeit 28 Tage]

Nachdem notwendige Modifikationen vorgenommen und die Anlage um einen Reaktor (TFM50-4) erweitert wurde, sollte eine 2. Versuchsreihe durchgeführt werden, um bei ähnlichen Bedingungen tiefergehende analytische Informationen über die Prozessabläufe zu erhalten.

Dabei sollte unter anderem eine gezielte Kontamination des Substrates vorgenommen werden, um die Reaktionen der Kulturorganismen studieren und anschließend die Wirkung eines Bakterizids auf Nisinbasis (siehe Kapitel 5.4.1.2, S. 80) testen zu können.

Außerdem wurde in jedem System täglich eine geringe Menge eines silikonbasierten Antischaummittels über die Spritzköpfe der Reaktoren dispergiert, sodass die resultierende Verschmutzung bzw. Belagbildung am Versuchsende mit der des zuvor durchgeführten Tests verglichen werden konnte.

Ferner sollte abschließend der untergärrige Kulturorganismus TUM 34/70 durch den obergärrigen Stamm TUM 68 ersetzt werden, um die Strömungsvorgänge im Gesamtsystem mittels des modifizierten Raffinosestests (siehe Kapitel 5.4.3, S. 82) zu ermitteln.

Obwohl die Anlage auf identische Art und Weise wie zuvor (LV1) in Betrieb genommen wurde, förderte die Hefedosagepumpe (SP:H) – anfänglich unbemerkt – deutlich mehr Organismen in das System, sodass die Substratgehalte – insbesondere in den ersten beiden Reaktoren – immer weitreichender abgebaut wurden. Dieser Sachverhalt wird durch den Extraktabbau in Abbildung 46 und die Vergärungsgrade, dargestellt in Abbildung 47 illustriert.

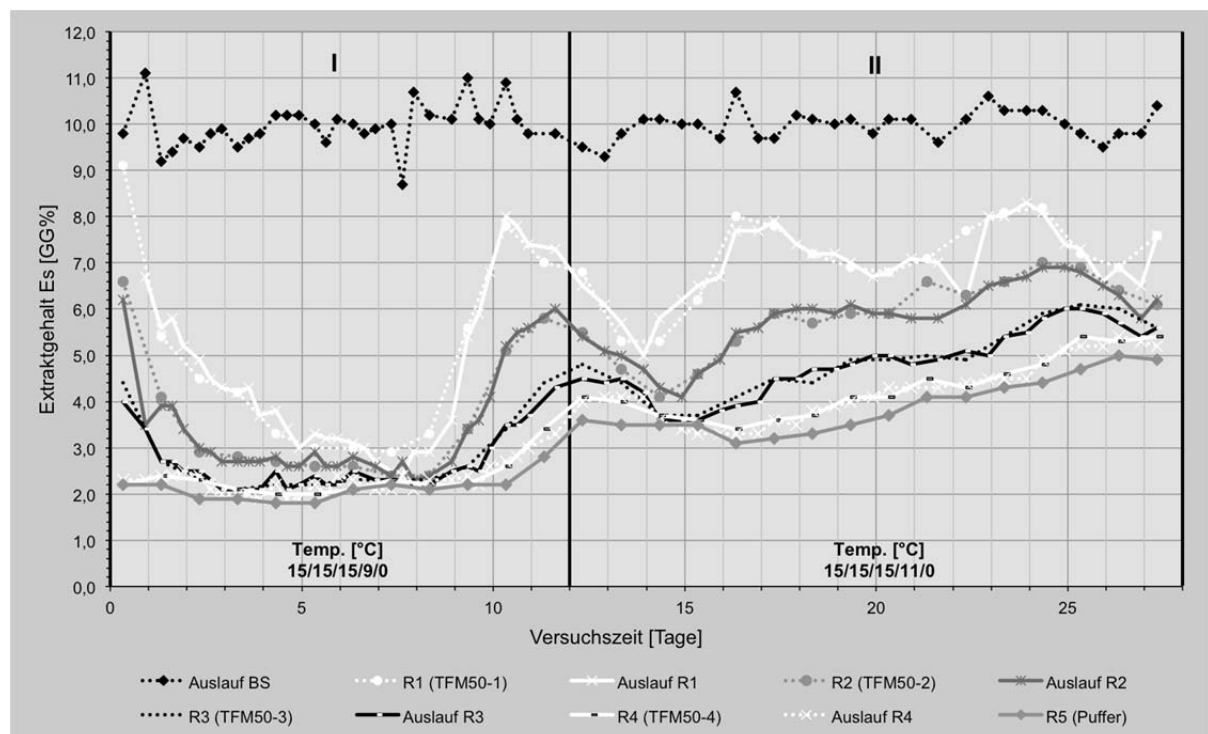


Abb. 46: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV2)

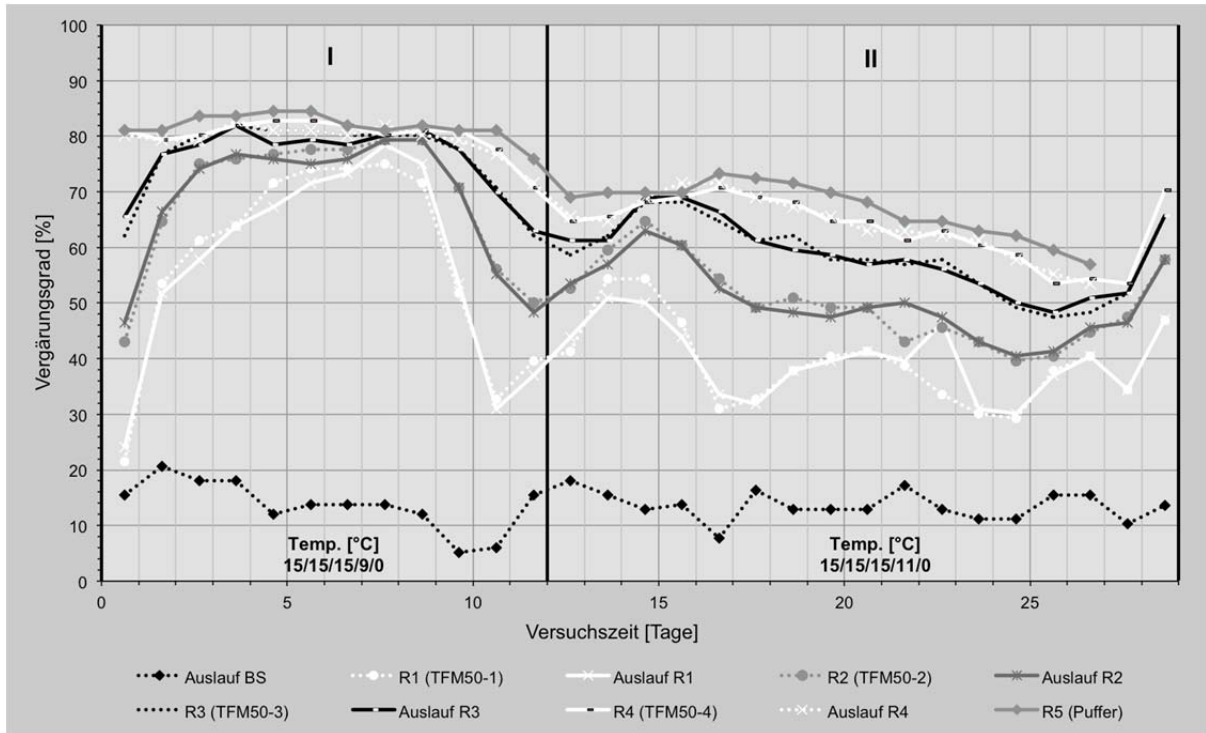


Abb. 47: Vergärungsgrade in der Pilotanlage (LV2)

Bei der Einzelauswertung technologisch unterschiedlicher Verfahren wird ersichtlich, dass insbesondere in der 1. Phase (Abb. 48), bei der in den ersten 3 Reaktoren 15 °C, im 4. Reaktor 9 °C und im Puffer 0 °C eingestellt wurden, die Standardabweichungen so groß sind, dass keine sinnvolle Interpretation der Analysenwerte erfolgen kann.

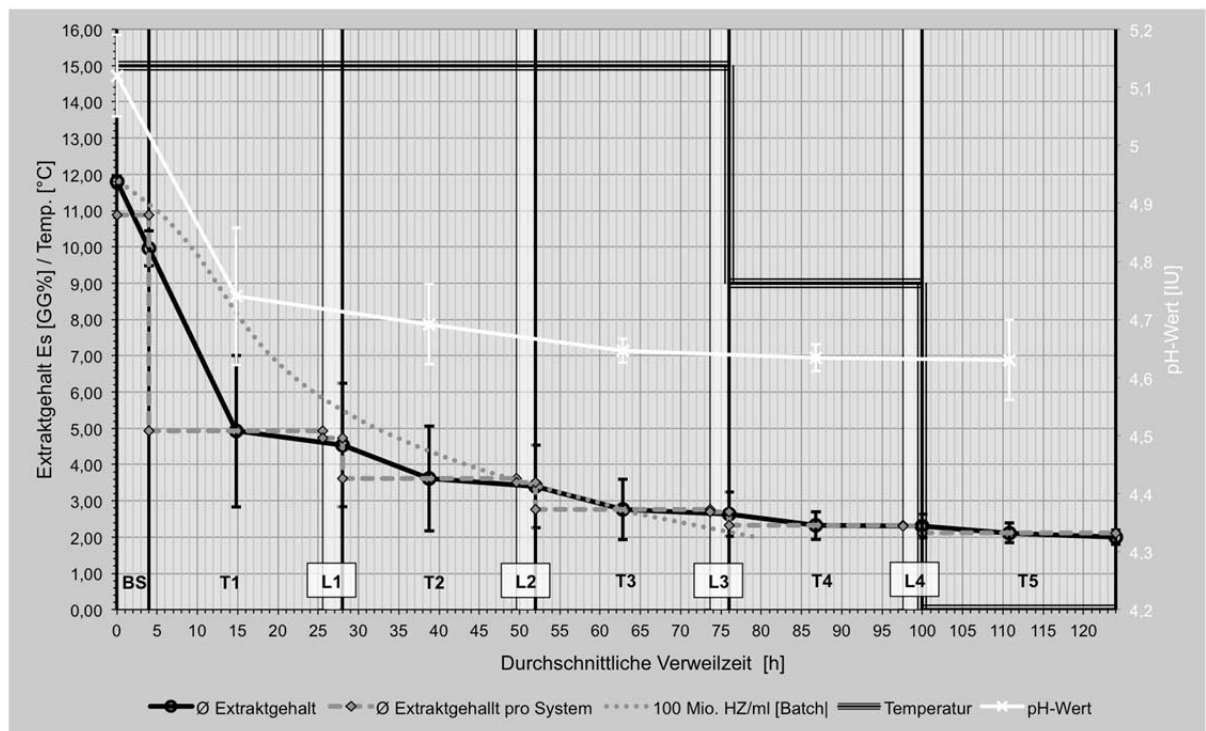


Abb. 48: Verfahrenseinstellungen (LV2/P1: 15/15/15/9/0)

In der 2. Phase (Abb. 49) des Versuchs, in der die Temperatur des 4. Reaktors von 9 auf 11 °C angehoben wurde, um den Substratabbau zu fördern, zeigte sich, dass die Extraktreduktion durchschnittlich in allen Systemen nach dem 1. Reaktor, ähnlich stark ausgeprägt war. Zudem wird ersichtlich, dass die Endvergärungsgrade auch nach 4 Fermentationstagen und einem Kaltlagerungstag nicht erreicht wurden. Entsprechend hoch waren die mittleren pH-Werte der Proben.

Trotz der Korrektur der Gabemenge am 8. Tag und diversen weiteren verfahrenstechnischen Modifikationen, die Variationen der Fließgeschwindigkeiten und Füllstände inkludierten, stabilisierte sich das System nicht wie gewünscht, sodass letztendlich nicht die angestrebten, dauerhaft stabilen Extrakt-niveaus resultierten.

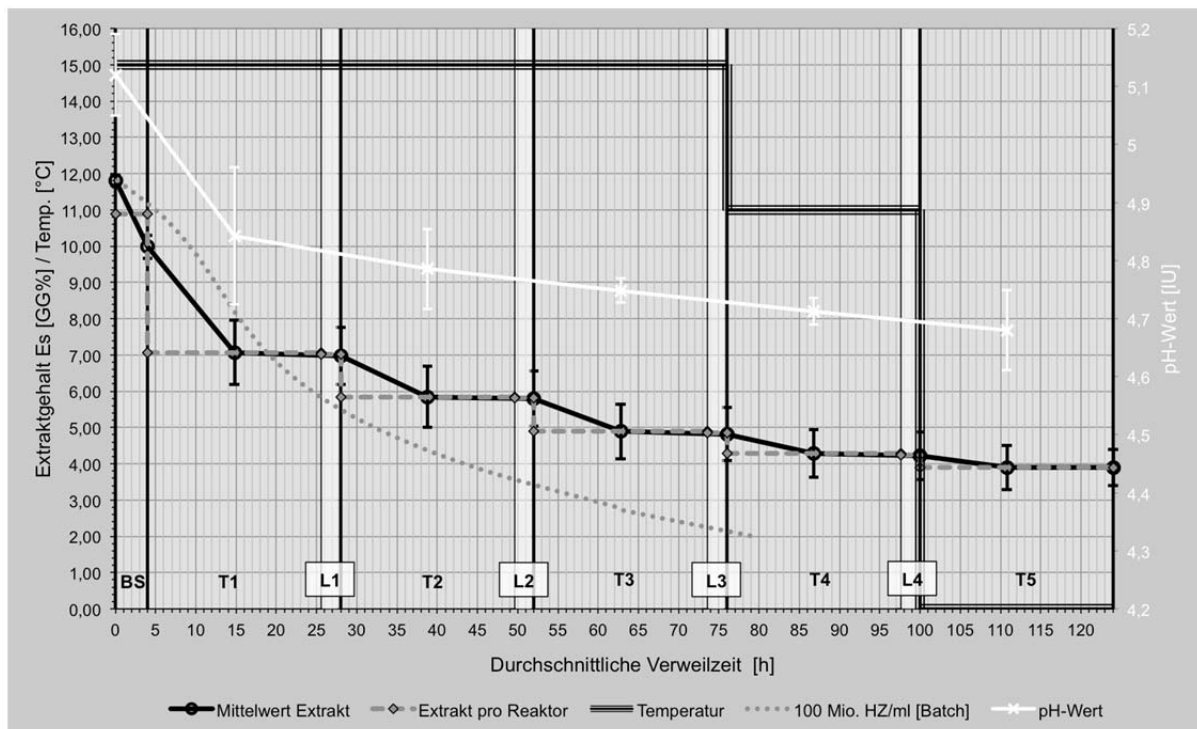


Abb. 49: Verfahrenseinstellungen (LV2/P2: 15/15/15/11/0)

Aufgrund der großen Schwankungen und des allgemein unbefriedigenden Versuchsverlaufs wurden daher nur sporadisch Analysen zur Bestimmung der pH-Werte, des freien α -Aminostickstoffs (FAN), der Gärungsnebenprodukte (GNPs), der vicinalen Diketone (VDKs) und der Zuckerspektren durchgeführt (vgl. Tabelle 14). Diese Werte sind ergänzend im elektronischen Anhang: EA30 dargestellt.

Nachdem die Extraktgehalte in den ersten Reaktoren erhöht werden konnten, wurde das System am 13. Versuchstag gezielt mit Laktobazillen (*Lactobacillus brevis*) infiziert, um Erkenntnisse über die biochemischen Reaktionen der Organismen und Wechselwirkungen zwischen den Populationen zu erlangen.

Zu diesem Zweck wurde eine Bakterienkultur in MRS vorbereitet und etwa 25 ml mit einer Keimzahl von rund 1 Mrd. Bakterien/ml in die Belüftungsstrecke injiziert.

Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben dabei, dass sich die Bakterien rasch im gesamten System verteilten. Außerdem konnte bereits einen Tag nach der Beimpfung eine organoleptische Veränderung bemerkt werden, sodass die Zwischenprodukte allgemein als unharmonisch und leicht säuerlich beschrieben wurden.

Trotz der verhältnismäßig geringen Vergärungsgrade schien sich das System jedoch innerhalb weniger Tage selbstständig zu stabilisieren, sodass die Anzahl und Beweglichkeit der Bakterien abnahm und Fehlgerüche 3 Tage nach der Kontaminierung nicht mehr detektiert werden konnten.

Nachdem etwa 100 Stunden nach der Infizierung visuell nur noch vereinzelt unbewegliche Stäbchen identifiziert werden konnten, wurde ein nisinhaltiges Präparat in die Belüftungsstrecke (BS) injiziert. 3 Tage später wurden von jedem Tank Proben entnommen und diese molekularbiologisch (vgl. Tabelle 4, S. 39) untersucht. Dabei zeigte sich, dass keine der Proben lebensfähige Bakterien enthielt und somit die Nisinzugabe eine wirksame Möglichkeit darstellt, um Infektionen zu eliminieren bzw. das Wachstum von Bakterien zu verhindern.

Abschließend wurde nach einer Anlagenbetriebszeit von 22 Tagen der untergärige Kulturstamm TUM 34/70 durch den obergärigen Stamm TUM 68 substituiert, um mithilfe des modifizierten Raffinosestests die durchschnittliche Verweilzeitverteilung im System nach der in Kapitel 5.4.3, S. 82, dargestellten Methode zu eruiieren. Die Probenentnahme erfolgte dafür über einen Zeitraum von 3 Tagen in einem Intervall von 8 Stunden. Das entnommene Material wurde jeweils sofort zentrifugiert (5 min; 750g; 5 °C), der Überstand abgeschüttelt, das Sediment mit sterilem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und alle Proben bei 4 °C zwischengelagert, bis abschließend eine simultane Fermentation in den Einhorn-Gärungssaccharometern nach der in Kapitel 5.3.1.1, S. 70, beschriebenen Analyse-methode (modifizierter Raffinosestest) erfolgen konnte.

Wie die Abbildung 50 illustriert, resultierten jedoch keine klaren Trends, die adäquate Interpretationen zuließen. Dies lag mutmaßlich an den geringen Vergärungsgraden, einer zu langen Probenlagerung und/oder zu großen zeitlichen Abständen zwischen den Messungen.

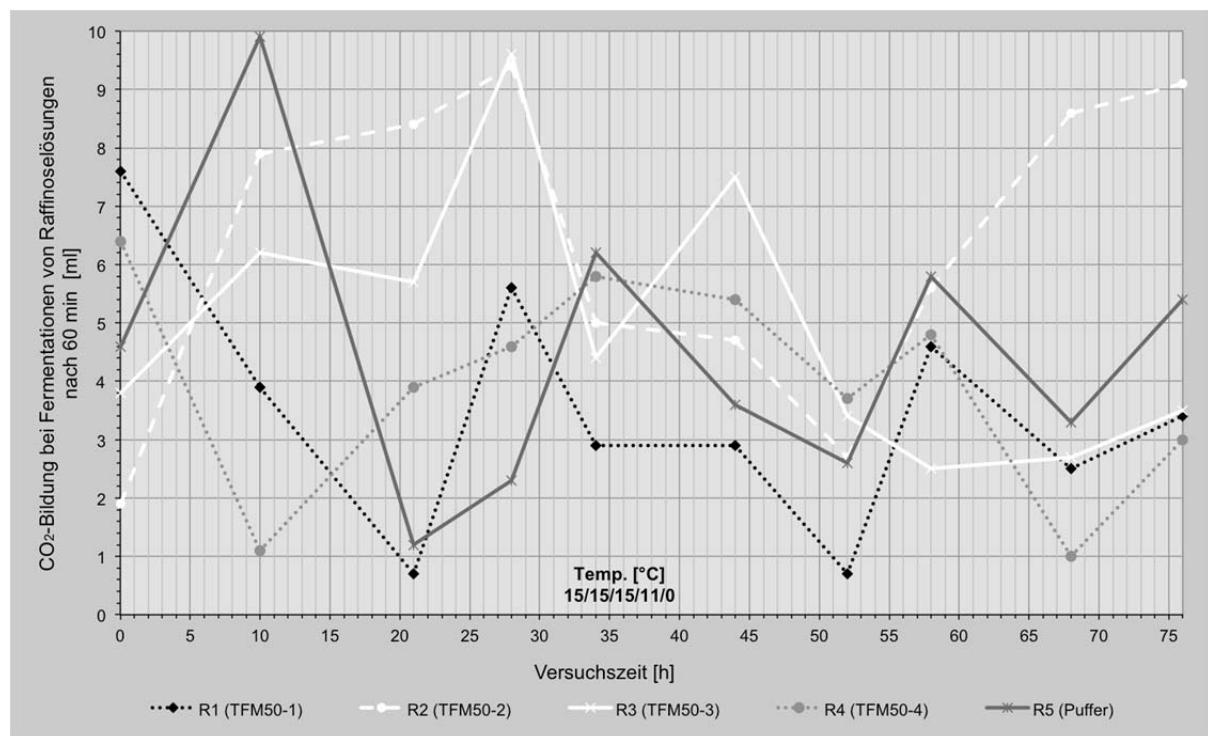


Abb. 50: Verweilzeittest (LV2: 15/15/15/11/0)

Basierend auf den Erkenntnissen der vorangestellten Versuche (Kapitel 5.4.2, S. 81), bei denen gezeigt werden konnte, dass der Anlagenverschmutzungsgrad durch den adäquaten Einsatz von Antischaummitteln reduziert werden kann, wurde im Rahmen dieses Versuchs täglich ein silikonbasiertes Antischaummittel über die Reinigungsvorrichtungen in den Reaktoren zerstäubt, um die Brandhefeablagerung an den Innenrohren mit denen des ersten Langzeitversuchs vergleichen zu können.

Um Kontaminationen durch die Eingriffe zu vermeiden, wurde das silikonbasierte Antischaummittel (159 g) zuvor in 20 Liter kochendes Wasser in einem Edelstahlbehälter (*Cornelius-KEG*) gegeben, selbiger verschlossen, unter Druck (1 bar_ü) gesetzt, für 60 Sekunden umgedreht, abgekühlt und bei 4 °C eingelagert. Alle verwendeten Schläuche und Anschlussstellen wurden vor Gebrauch fachgerecht desinfiziert. Die nachfolgenden Bilder veranschaulichen die resultierenden Unterschiede zwischen den Versuchsreihen.







Reaktor	Versuch 1 Ohne Antischaummittelzugabe	Versuch 2 Tägliche Antischaummittelzugabe über CIP-Spritzköpfe
R1 TFM50-1		
R2 TFM50-2		
R3 TFM50-3		

Abb. 51: Einfluss von Antischaummitteln und Verfahrensvariationen (LV1/LV2)

Wie der Abbildung 51 entnommen werden kann, lagerten sich im 2. Langzeitexperiment deutlich weniger Verschmutzungen an die Edelstahlleitrohre (L) an. Da jedoch simultan die Füllstände im 2. Versuch stärker variiert wurden, was zu einer Abtragung von Belägen beigetragen haben kann, nicht die äquivalenten Vergärungsgrade erreicht wurden und zudem ein rein mechanischer Effekt durch die tägliche Fluideinleitung resultierte, konnte die Wirkung nicht eindeutig dem silikonbasierten Antischaummittel zugeschrieben werden.

Aus diesem Grund wurde entschieden, im nächsten Experiment (Langzeitversuch 3) die Substanz exklusiv in der Belüftungsstrecke (BS) zu injizieren, um den Einfluss der Gabeart zu testen. In einem letzten Versuch (Langzeitversuch 4) sollten dann nur die Füllstände zyklisch variiert werden, ohne Antischaummittel zu dosieren. Diese Versuchsergebnisse sowie die Schlussfolgerung sind in der Abbildung 73, S. 113, dargestellt.

6.2.3 Langzeitversuch 3 (LV3): [Laufzeit 37 Tage]

Im ersten Dauerversuch (LV1) zeigte sich, dass die Anlage über Wochen stabil betrieben werden kann und dass bei den genannten Bedingungen sensorisch ansprechende Unfiltrate nach einer arithmetischen Verweilzeit von 3,5 Tagen resultierten.

Da in dieser Versuchsserie (LV1) jedoch keine Wiederverwendung der Organismen erfolgte, das Produkt nicht filtriert beurteilt wurde und die analytische Kontrolle im 2. Versuch (LV2) aufgrund der Systemschwankungen nicht aussagekräftig war, wurde eine 3. Versuchsserie (LV3) durchgeführt, um den Effekt derartiger Einflüsse zu beurteilen.

Zudem sollte in diesem Experiment ein Hauptaugenmerk auf den physiologischen Zustand der Fermentationskulturen gelegt werden.

Durch eine tägliche Antischaummittelzugabe in die vorgeschaltete Belüftungsstrecke (BS) wurde ermittelt, ob der geringere Anlagenverschmutzungsgrad des 2. Langzeitversuchs auf das silikonbasierte Produkt oder die Art der Dosage bzw. anderen Prozessparametern zurückzuführen war.

Da nach dem 2. Versuch (LV2) 4 Reaktoren und ein Puffer zur Verfügung standen, konnten die Gärtemperaturen in diesem Experiment leicht abgesenkt und verschiedene technologische Variationen getestet werden, um die idealen Verfahreneinstellungen zu bestimmen.

In der Abbildung 52 sind die Extraktverläufe über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt, wobei Temperaturvariationen sowie die Zugabezeitpunkte von Frischhefe als solche kenntlich gemacht wurden.

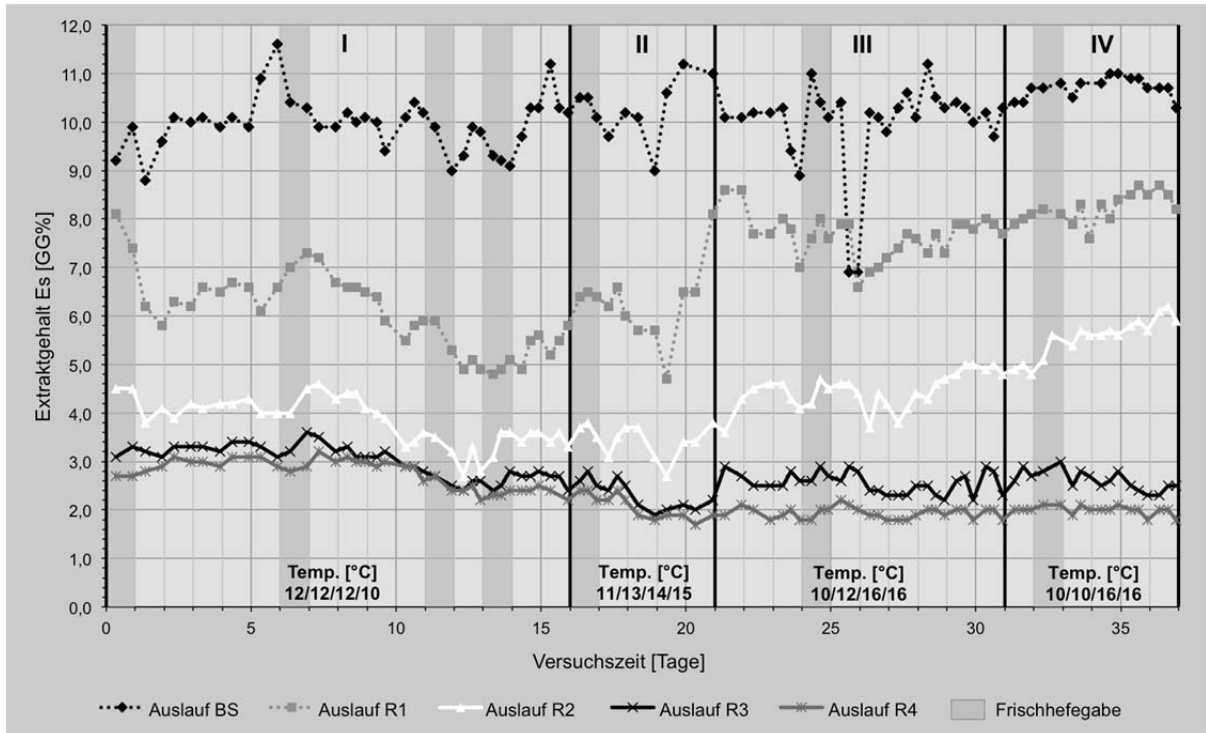


Abb. 52: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV3)

Wie aus der Abbildung 52 hervorgeht, konnten trotz partieller Erntehefewiederverwendungen in dieser Versuchsserie stabile Verhältnisse über einen Zeitraum von 37 Tagen aufrecht erhalten werden. Um dennoch die Effekte von Temperaturumstellungen und technologischen Modifikationen besser beurteilen und vergleichen zu können, werden nachfolgend die durchschnittlichen Extraktabbauraten während der gekennzeichneten 4 Phasen einzeln dargestellt und beschrieben.

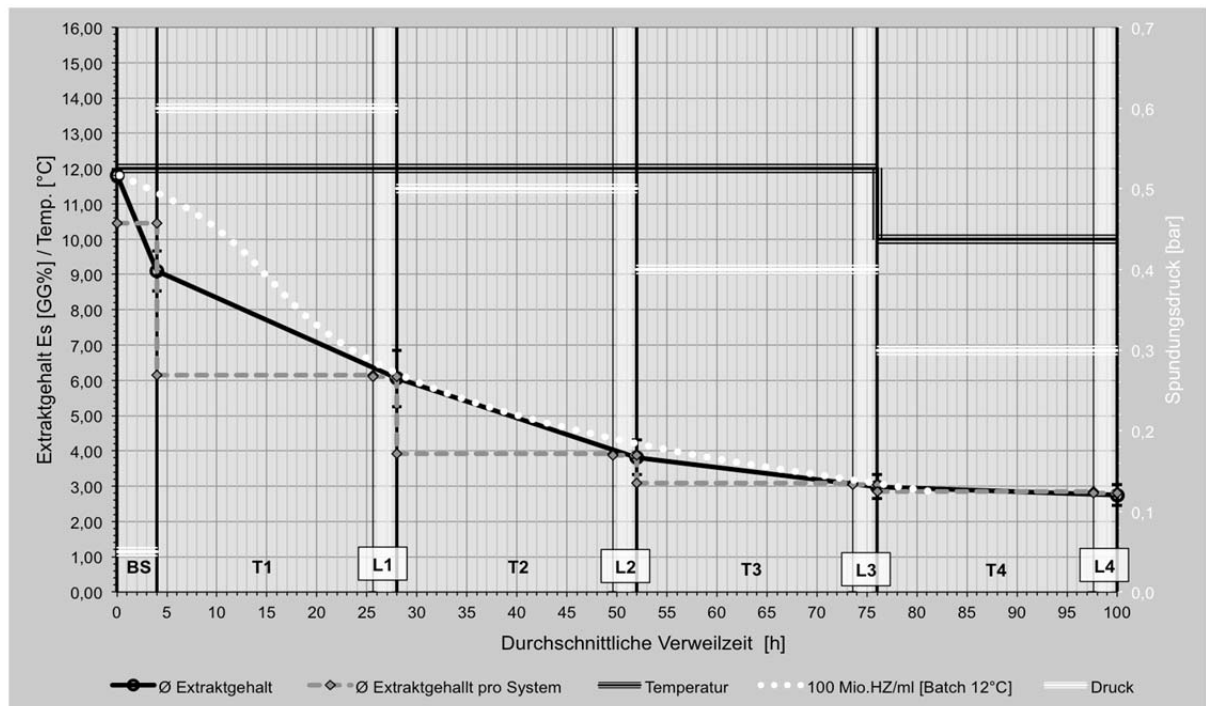


Abb. 53: Verfahrenseinstellungen (LV3/P1: 12/12/12/10)

Wie die Abbildung 53 zeigt, ergab sich durch die Wahl der Parameter in der ersten Phase (P1) ein fast kongruenter Extraktabbau, wie er bei identischen Temperaturen – jedoch mit doppelt so hohen Inokulationsgehalten – bei Batchverfahren zu erwarten ist. Lediglich die Lag-Phase wurde durch den entsprechenden kontinuierlichen Modus signifikant reduziert.

In der 2. Versuchsphase (P2), die in der Abbildung 54 dargestellt ist, wurden die Fermentationstemperaturen der in Reihe geschalteten Fermenter sukzessiv erhöht, wodurch die Gärungen in den letzten Reaktoren beschleunigt und höhere Vergärungsgrade erreicht wurden, was auch aus den Vergleichen der Batchgärungen mit 100 Mio. HZ/ml bei 12 °C hervorgeht.

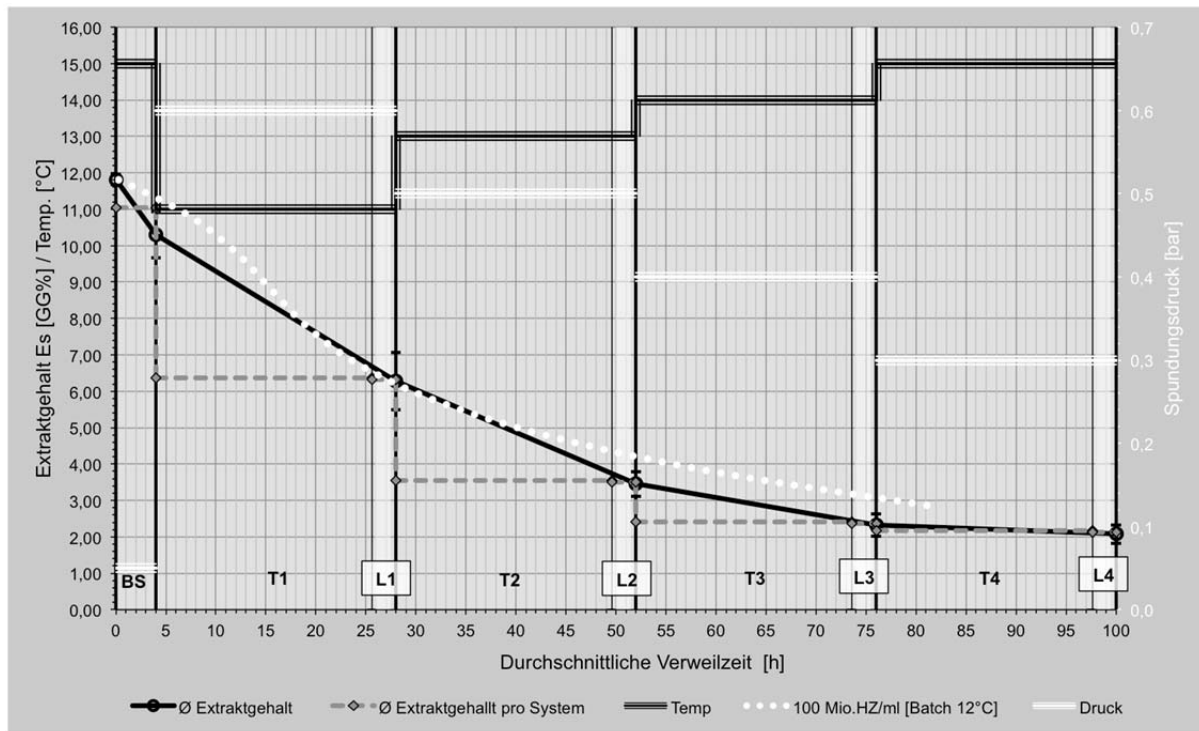


Abb. 54: Verfahrenseinstellungen (LV3/P2: 11/13/14/15)

In der 3. und 4. Versuchsphase (P3 und P4) (Abb. 55 und Abb. 56) wurden die Temperaturen in den ersten Fermentern stark abgesenkt und in den nachgeschalteten Tanks angehoben, um zu testen, ob sich durch eine derartige Vorgehensweise anfänglich weniger Diketone ausbilden bzw. die Gehalte durch wärmere Nachgärtemperaturen weitreichender reduziert werden können. Im Vergleich zu Batchfermentationen bei 12 °C resultierte daher eine anfänglich geringere Substrataufnahme, sodass sich vergleichbare Vergärungsgrade erst nach einer durchschnittlichen Verweilzeit von etwa 3 Tagen einstellen.

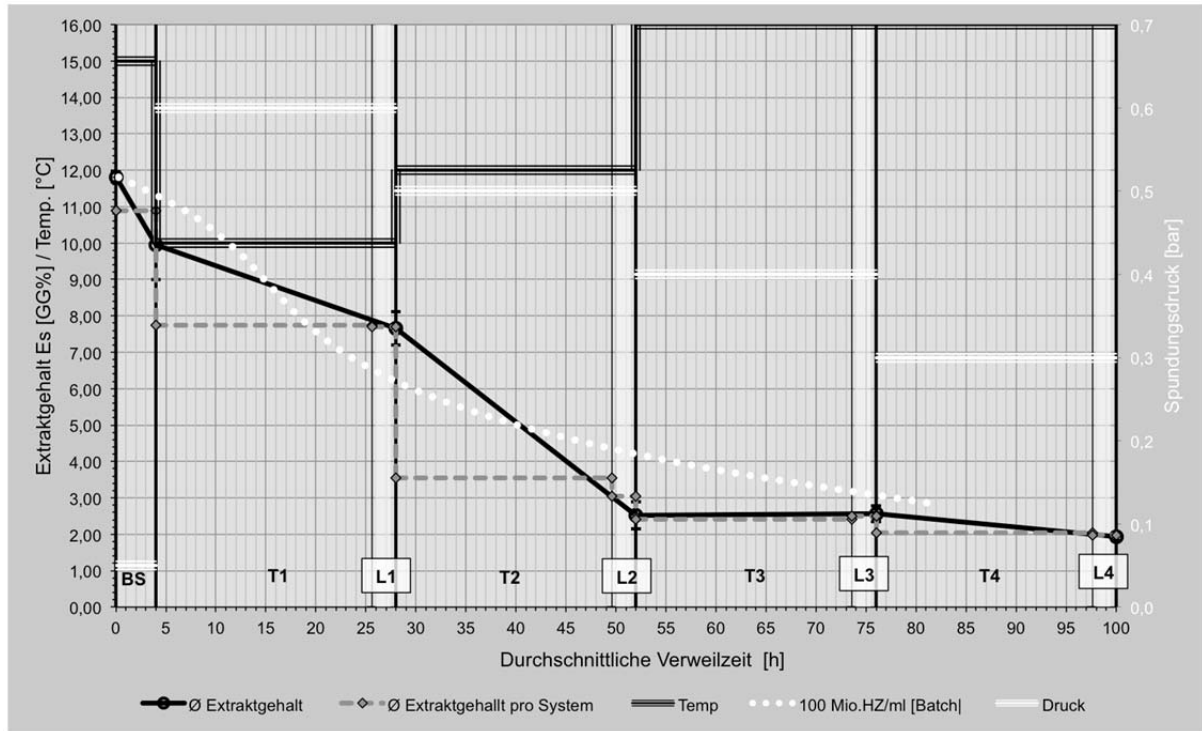


Abb. 55: Verfahrenseinstellungen (LV3/P3: 10/12/16/16)

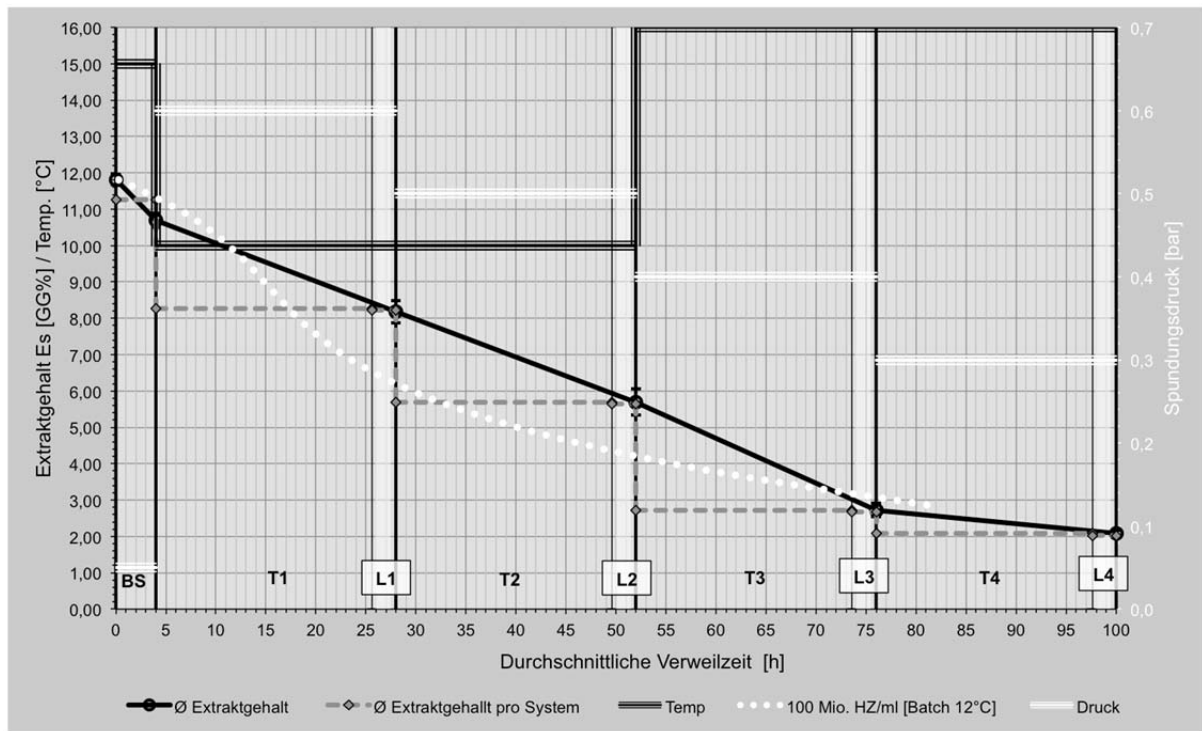


Abb. 56: Verfahrenseinstellungen (LV3/P4: 10/10/16/16)

Die Analyse der Hefeviabilität ergab, dass durchschnittlich etwa 15 % tote Hefezellen in der Erntehefe vorhanden waren.

Wie die Abbildung 57 zeigt, scheint der Totheefeanteil jedoch durch kältere Temperaturen zu Fermentationsbeginn und wärmeren folgenden Temperaturen tendenziell verringert zu werden.

Die aus Reaktor 2 (TFM50-2) geerntete Hefe wies durchschnittlich den besten physiologischen Zustand auf.

Da die frische Hefe („Frischhefe“) bereits einen verhältnismäßig geringen Lebendanteil aufwies (durchschnittlich etwa 90 %) und das System immer wieder erneut mit der systemeigenen Erntehefe reinokuliert wurde beträgt die reale Zunahme des Totanteils in der Erntehefe etwa 5–10% (sekundäre y-Achse in Abb. 57).

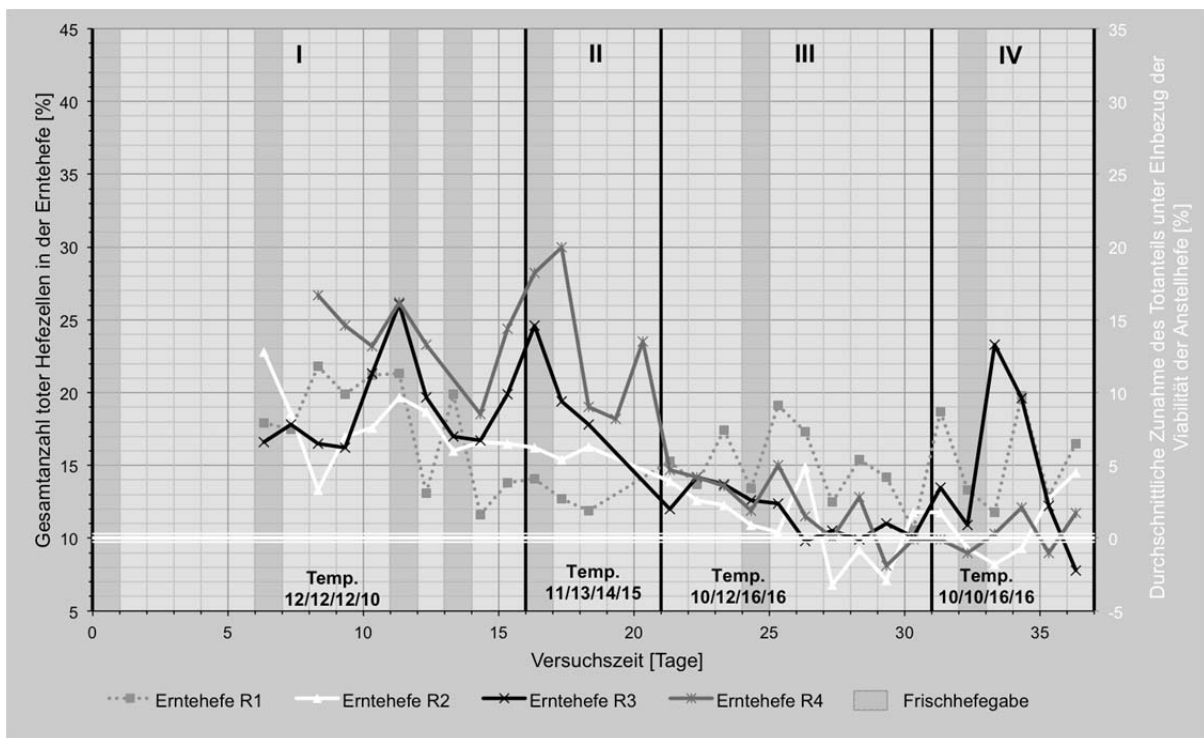


Abb. 57: Viabilitäten der Frisch- und Erntehefen (LV3)

In den Fluidproben waren die Totheefeanteile komparativ höher als in den Erntehefeproben, wobei sich auch hier eine klare Verbesserung des physiologischen Zustands der Organismen in den nachgeschalteten Phasen bemerkbar machte (Abb. 58).

Ferner wird deutlich, dass die Viabilität der Zellen in Schweben über den Kaskadenverlauf reduziert wurde.

Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die prozentuale Beurteilung von Lebend- und Totheefeanteilen keine Rückschlüsse auf Quantitäten ermöglicht.

Dennoch wurde der hohe Totheefeanteil im System als kritisch eingestuft; konnte jedoch aus logistischen Gründen kaum gezielt optimiert werden, da keine adäquate Menge einer vitaleren Population des gleichen Stammes kurzfristig zur Verfügung stand.

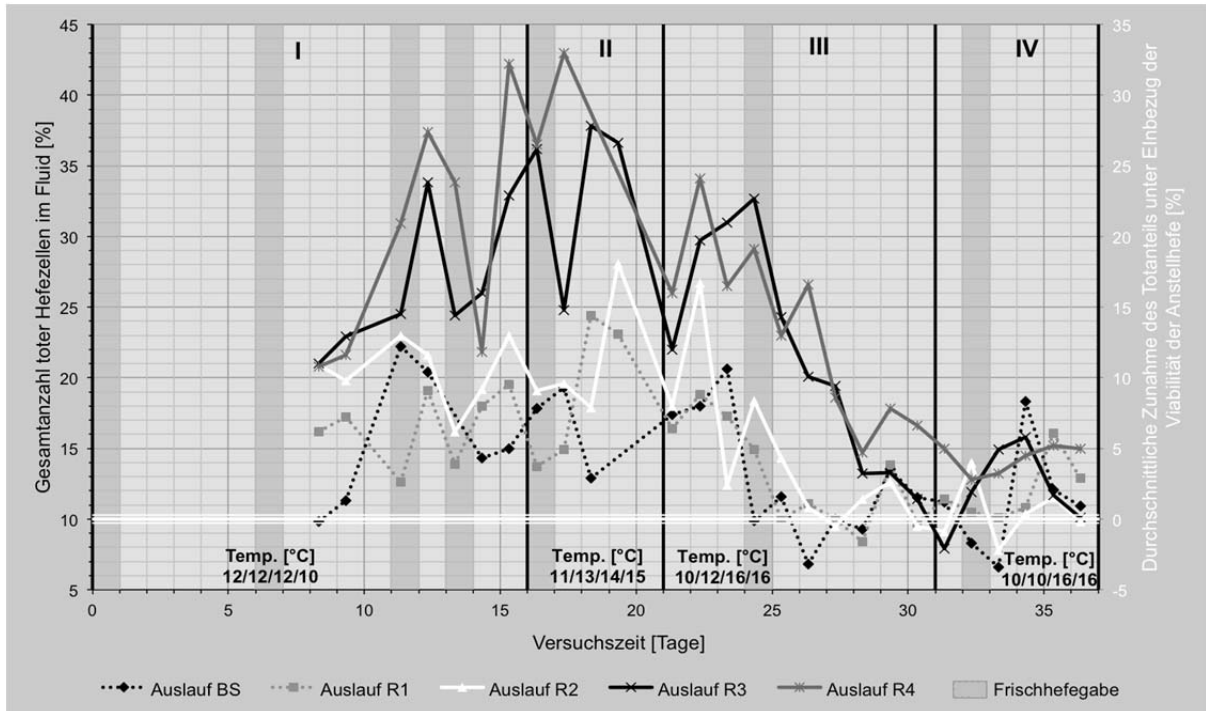


Abb. 58: Viabilitäten der Hefen in Schwebel (LV3)

Das kontinuierlich produzierte Bier wurde in dieser Versuchsreihe chargenweise in KEGs transferiert, auf 4 °C innerhalb von 24 Stunden gekühlt und das Produkt anschließend mithilfe eines Kieselgur-Schichtenfilters filtriert. Es folgte eine Abfüllung in Flaschen, sodass multiple Parameter des Filtrats analysiert werden konnten.

Die Abbildung 59 illustriert dabei einige Leitindikatoren zur Beurteilung der Produktqualität.

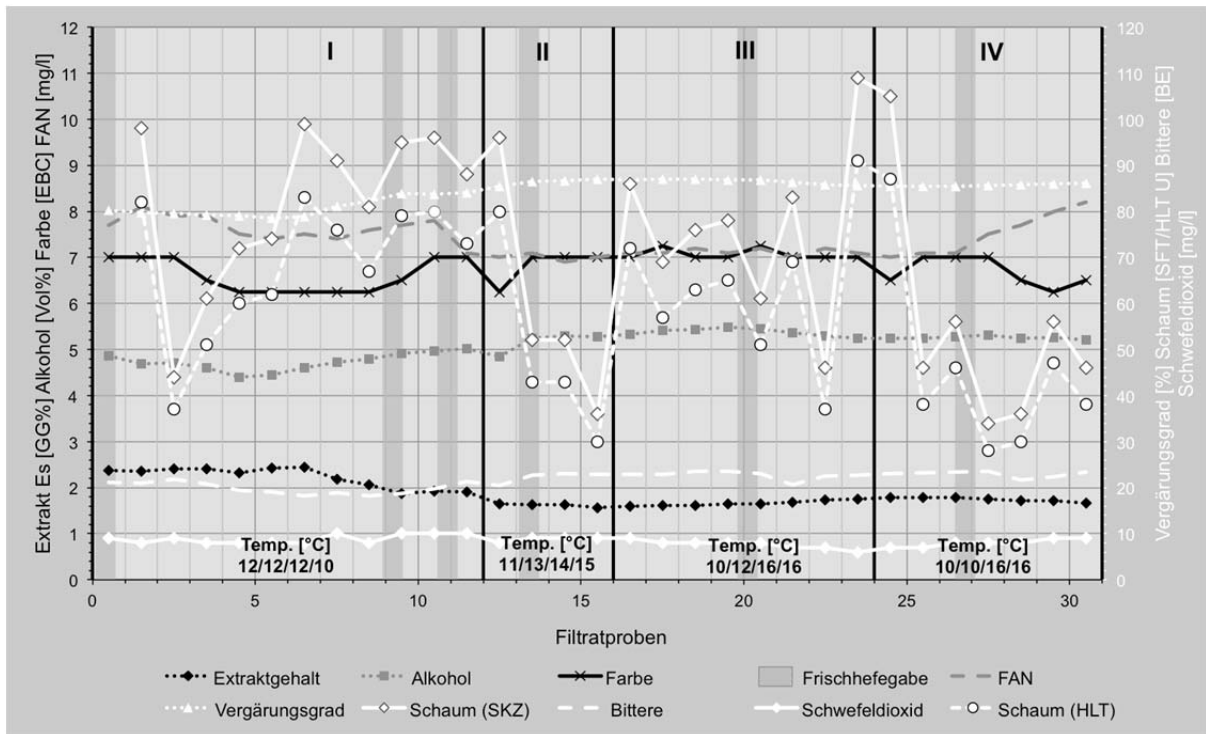


Abb. 59: Hauptärparameter (HGP) in der Pilotanlage (LV3)

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, resultierten geringere Restextraktgehalte und entsprechend höhere Alkoholmengen sowie Vergärungsgrade bei den Proben, die mit vergleichsweise wärmeren Temperaturen der nachgeschalteten Fermenter hergestellt wurden (Phase 2–4).

Diese technologische Maßnahme schien außerdem die Aufnahme des freien α -Aminostickstoffs zu begünstigen, wobei die 2-tägige anfängliche Kaltphase im Abschnitt 4 erneut zu einer reduzierten Gesamtaufnahme des FANs führte.

Prinzipiell ist die Schaumqualität aller Produkte als mäßig bis schlecht einzustufen. Ob dieser Effekt auf die regelmäßige Antischaummittelzugabe in der BS zurückzuführen ist, oder durch den hohen Totheferanteil (mit)verursacht wurde, konnte hier nicht abschließend geklärt werden, weshalb an dieser Stelle auf die Versuchsergebnisse des folgenden Langzeit-experiments (LV4) verwiesen wird.

In der Abbildung 60 sind die Gärungsnebenprodukte der Filtratproben illustriert. Wie aus der Darstellung hervorgeht, wurden durch die Temperaturerhebungen der nachgeschalteten Fermenter mehr Acetate, Ester und höhere Alkohole gebildet. Gleichzeitig verringerte sich der Gehalt an Acetaldehyd.

Am Ende des letzten Prozessabschnitts nimmt die Summe der Gärungsnebenprodukte tendenziell wieder ab, was vermutlich an der weitreichenderen Kühlung der Angärphase (Reaktor 1 und 2 auf 10 °C) liegt.

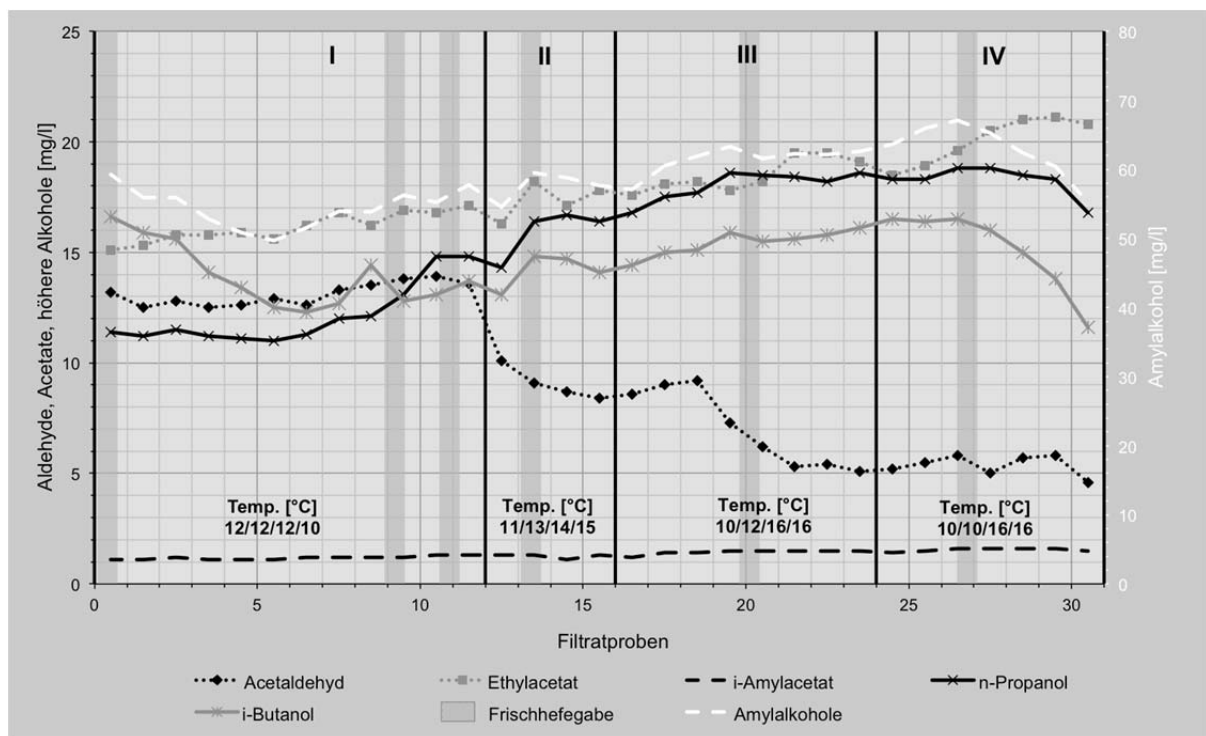


Abb. 60: Gärungsnebenprodukte (GNP) in der Pilotanlage (LV3)

Die in Abbildung 61 dargestellte Verkostungen der frisch filtrierten Biere nach DLG-Schema, die jeweils mit 10 zertifizierten Proband/innen durchgeführt wurden, ergab, dass die Qualität fast aller Produkte als gut bis sehr gut empfunden wurde.

Lediglich 3 Proben wurden im Mittel mit weniger als 4 Punkten benotet, da sie eine schwefelige Note aufwiesen. Abhängigkeiten zwischen implementierten Fermentations-temperaturen und dem organoleptischem Gesamteindruck konnten nicht detektiert werden.

Zudem sei erwähnt, dass trotz der geringen Hefeviabilitätsraten keine der Proben organoleptische Auffälligkeiten hinsichtlich charakteristischer Fehler – verursacht durch unsachgemäße Hefebehandlungen – aufwies.

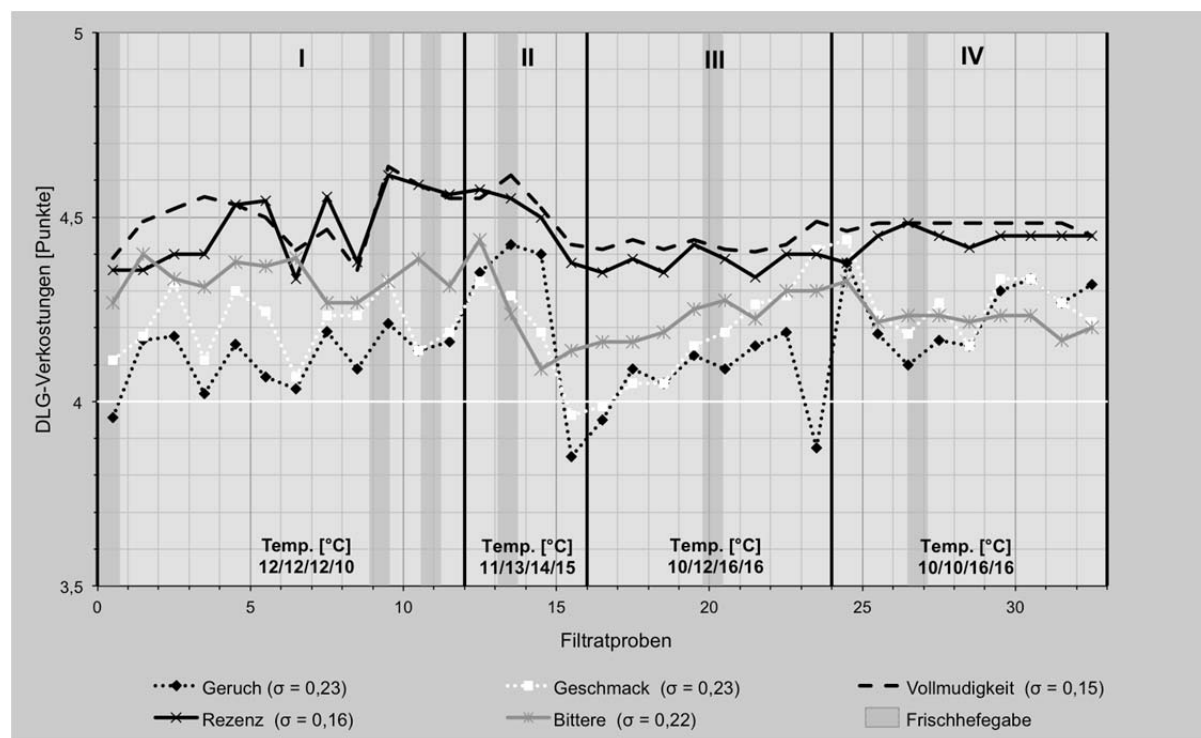


Abb. 61: Sensorischer Produkteindruck (LV3)

Nach einer Lagerzeit von einigen Tagen wurde der positive sensorische Gesamteindruck jedoch nach und nach durch eine Diacetylnote überlagert. Die Analyse des Gesamtdiacetyls (Abb. 62) bestätigte diesen organoleptischen Eindruck.

Obwohl in den Verkostungen der frisch filtrierten Biere zunächst kein Diacetyl detektiert werden konnte (vgl. Abb. 61), waren hohe Gehalte an transformierbaren Vorstufen vorhanden, sodass die Produktqualität im Nachhinein insgesamt als unzureichend eingestuft werden musste.

Die Verlängerung der kalten Angärphase und die Wahl wärmerer Nachgärtemperaturen, die in den Abschnitten 3 und 4 getestet wurden, bewirkte zwar tendenziell eine angestrebte Reduzierung der Diketongehalte im Produkt, jedoch nicht im benötigtem Maß.

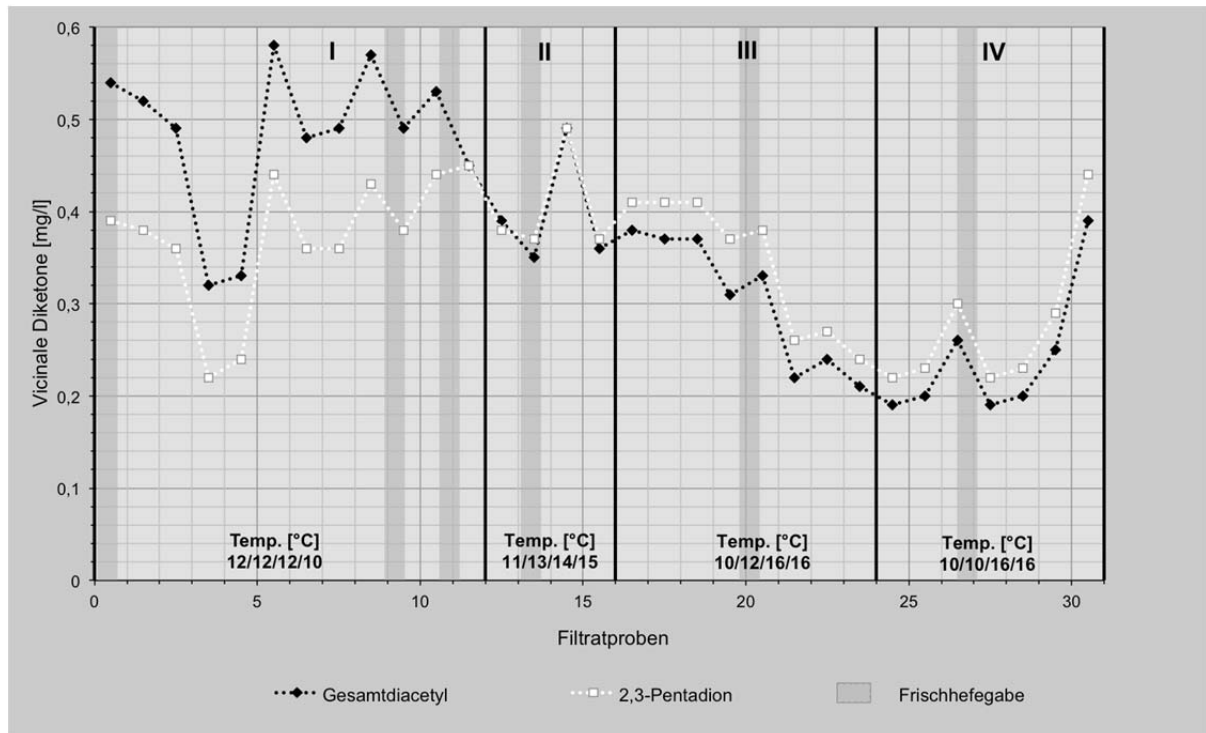


Abb. 62: Vicinale Diketone (VDK) in der Pilotanlage (LV3)

Trotz der täglichen Zugabe des silikonbasierten Antischaummittels in die Belüftungsstrecke resultierte ein verhältnismäßig hoher Anlagenverschmutzungsgrad (siehe Abb. 73, S. 113). Mögliche Ursachen dieses Phänomens werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen des folgenden Langzeitexperimentes (LV4) diskutiert.

6.2.4 Langzeitversuch 4 (LV4): [Laufzeit 57 Tage]

In den vorangegangenen Langzeitversuchen konnten qualitativ hochwertige, sensorisch ansprechende Produkte erzeugt werden. Da diese jedoch zu hohe Diketongehalte bzw. deren Vorläufersubstanzen enthielten und die Schaumhaltbarkeit unzureichend war, sollten beide Charakteristika in einer abschließenden Versuchsreihe optimiert werden. Ferner galt es, den Einfluss des silikonbasierten Antischaummittels auf den Anlagenverschmutzungsgrad und den Bierschaum abschließend zu eruieren, indem nun keine Gabe, jedoch zyklische Füllstandsvariationen vorgenommen wurden. Außerdem wurde in der letzten Versuchsphase des Experiments der bis dahin verwendete untergärrige Kulturhefestamm TUM 34/70 durch den ebenfalls untergärrigen Stamm TUM 193 ersetzt, um die Verweilzeitfunktion mithilfe der PCR-Kapillargelelektrophorese-Methode (vgl. Kapitel 5.4.3, S. 82) zu determinieren. Nach der Umstellung des Fermentationsorganismus wurde das Substrat zusätzlich über mehrere Wochen lang ausschließlich mit systemeigener Erntehefe (TUM 193) reinokuliert (keine Frischhefegabe), um Auswirkungen dieser Arbeitsweise auf den Betrieb und die Qualität zu ermitteln.

In der Abbildung 63 sind die Extraktentwicklungen während des Experiments dargestellt. Wie der Grafik entnommen werden kann, wurden nach einer Woche sukzessiv wärmere Verhältnisse gewählt als in den Versuchen zuvor. Dies hatte zur Folge, dass in den ersten beiden Reaktoren (TFM50-1 und TFM50-2R) mehr Substrat verstoffwechselt wurde.

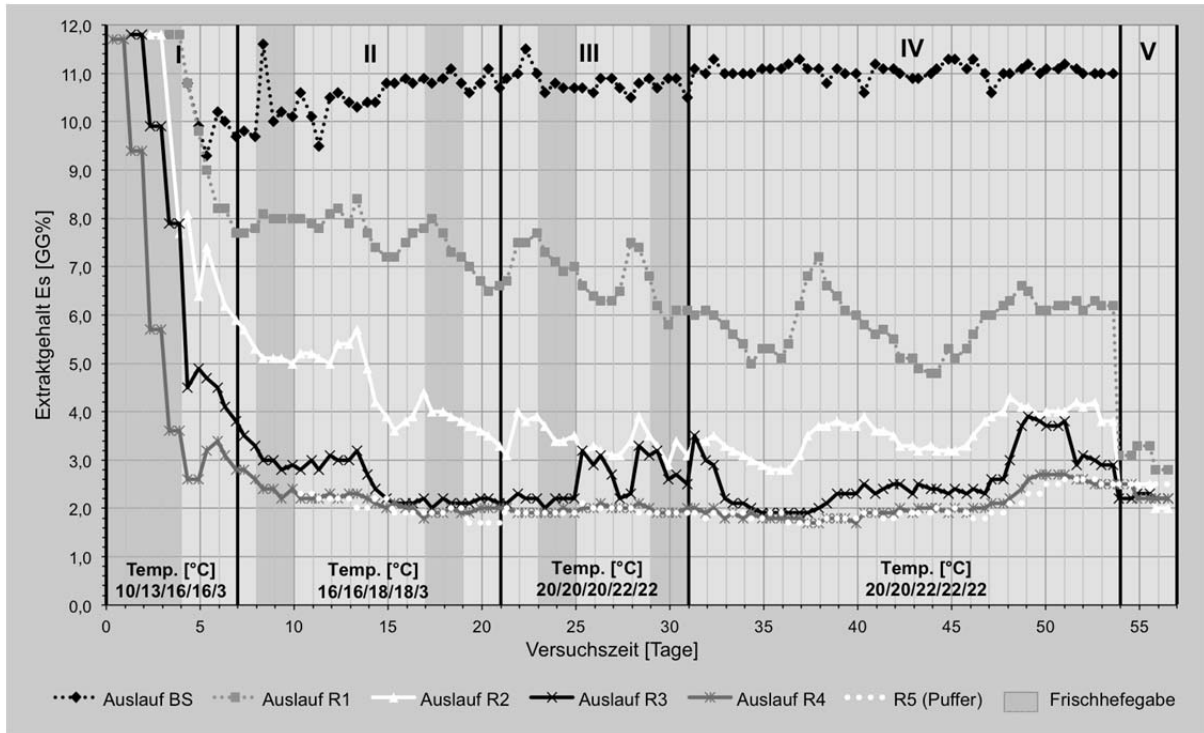


Abb. 63: Extraktgehalte in der Pilotanlage (LV4)

Die Auswertung der pH-Wertverläufe, die in der Abbildung 64 dargestellt ist, zeigt, dass sich bis zur Hefestammumstellung (von TUM 34/70 auf TUM 193) am 29. Betriebstag eine stetige Säuerung in den Reaktoren ergab. Der Wechsel des Fermentationsorganismus bewirkte jedoch einen geringen, temporären pH-Wertanstieg, bis eine erneute Säuerung – etwa eine Woche später – zu verzeichnen war.

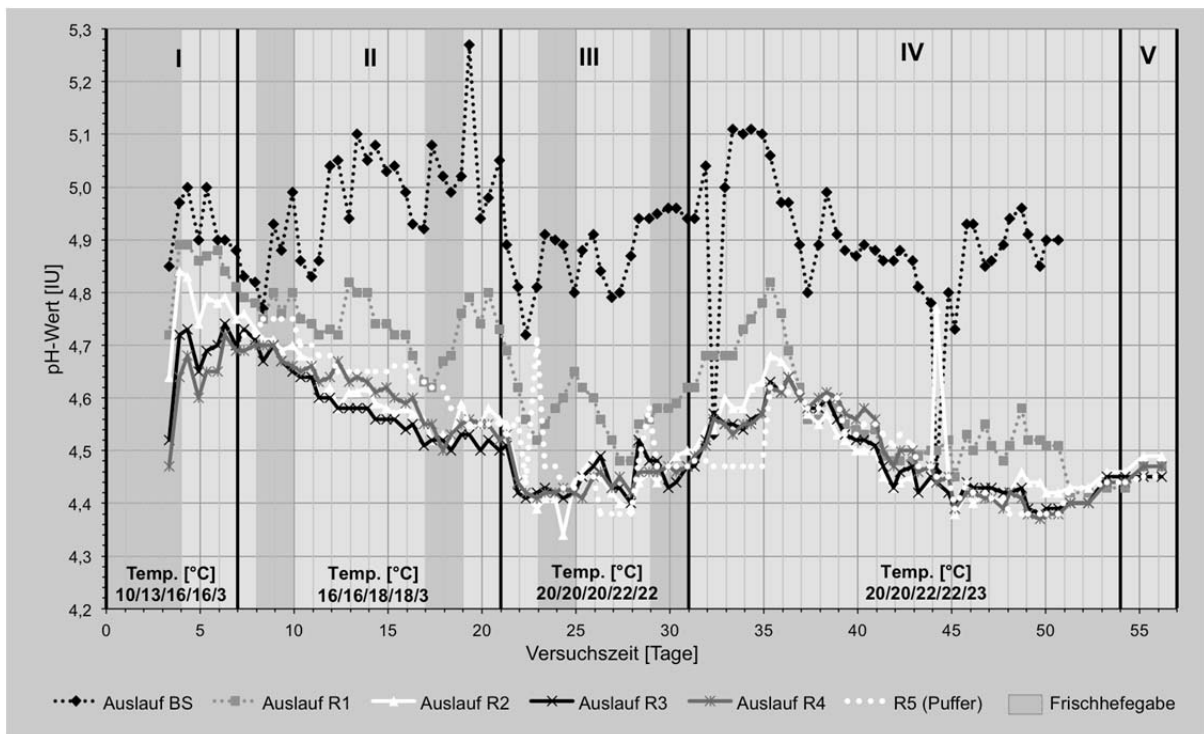


Abb. 64: pH-Wert-Verläufe in der Pilotanlage (LV3)

Aus der in der Abbildung 65 illustrierten Darstellung der Gesamtdiacetylgehalte geht hervor, dass wärmere Fermentationstemperaturen den Diacetylabbau beschleunigen. Ferner wird durch die Reduzierung der Diketongehalte in Reaktor 1 und 2 nach der Umstellung des Fermentationsorganismus in Phase 4 ersichtlich, dass Stamm TUM 193 tendenziell weniger Diketone bei identischen Temperaturen bildet als TUM 34/70 zuvor in Phase 3.

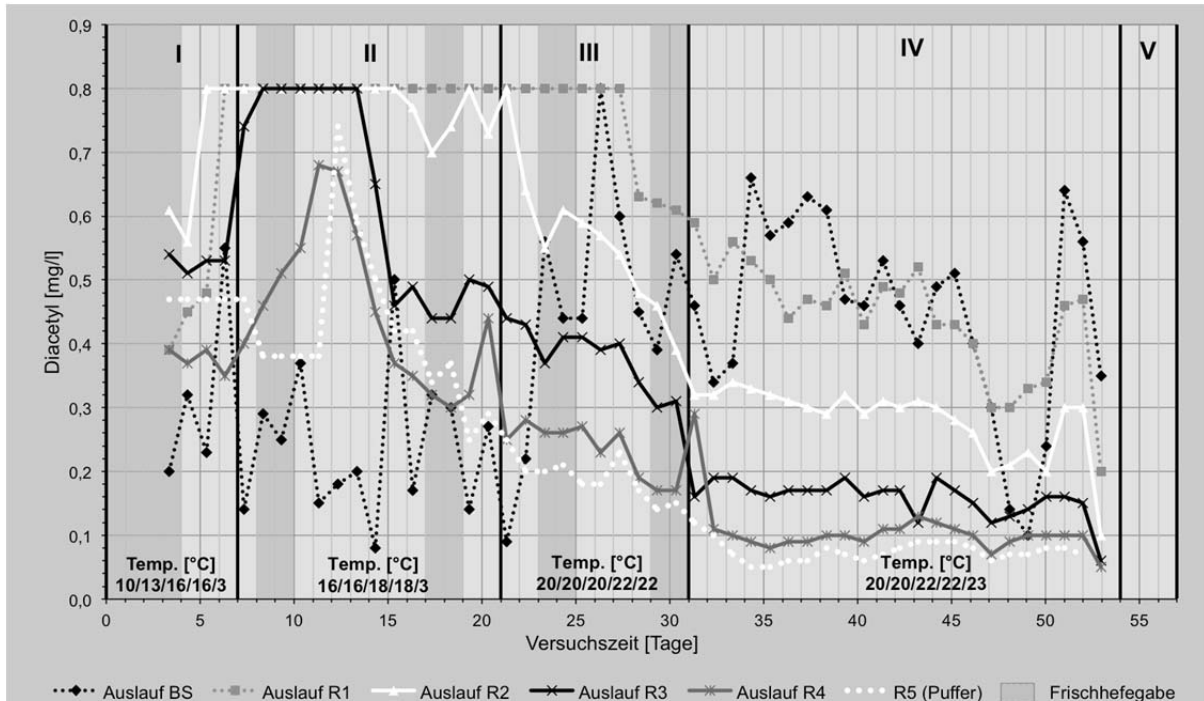


Abb. 65: Diacetylgehalte der Halbwaren in der Pilotanlage (LV4)

Ein ähnliches Verhalten ergibt sich für das Gesamt-2,3-Pentadion, dessen Verläufe in der Abbildung 66 dargestellt werden.

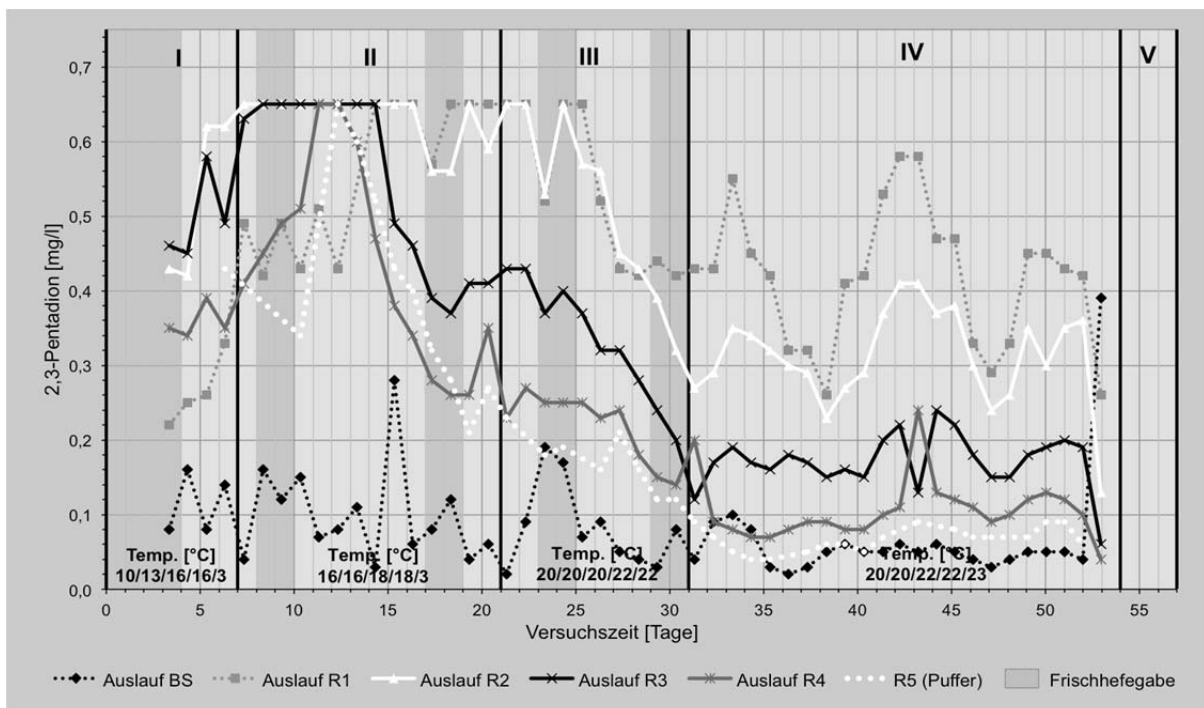


Abb. 66: 2,3-Pentadiongehalte der Halbwaren in der Pilotanlage (LV4)

Bei der durchschnittlichen Betrachtung der genannten Parameter in den Abbildungen 67–69 zeigt sich, dass die gewählten technologischen Maßnahmen in der Phase 2 (erste vollkontinuierlich betriebene Phase nach Inbetriebnahme) nicht ausreichen, um den Gesamtdiacetylgehalt auf ein angestrebtes Niveau von unter 0,1 mg/l zu reduzieren. Ferner wird ersichtlich, dass die durchschnittliche Viabilität der Erntehefe aus dem ersten Reaktor geringer ist als in den nachgeschalteten Fermentern.

Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Frischhefe beim Anstellen bereits etwa 10 % tote Zellen enthielt und das System bei der Reinokulierung erneut mit hohen Mengen an unviablen Zellen beimpft wurde.

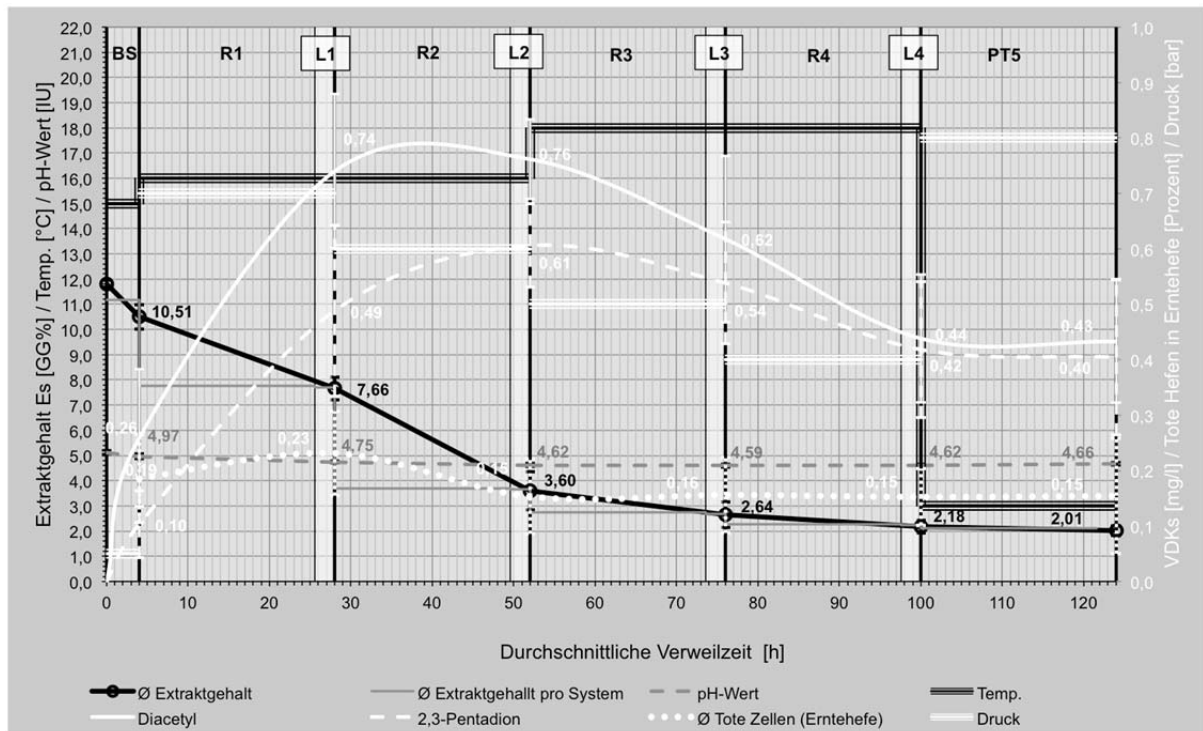


Abb. 67: Verfahrenseinstellungen (LV4: 16/16/18/18/3)

Durch die Anhebung der Gärtemperaturen zu Fermentationsbeginn (Abb. 68) erfolgte der Diacetylabbau früher (im 2. Reaktor (R2 = TSM50-2)), sodass deutlich geringere Diketongehalte im endvergorenen Unfiltrat resultierten. Ebenso ist der beschleunigte, weitreichende pH-Wert-Sturz als positiver Effekt dieser Maßnahme zu bewerten.

Wie bei dem zuvor gewählten Prozess finden sich in der Erntehefe des 1. Reaktors (R1 = TFM50-1) durchschnittlich etwas mehr tote Zellen als in den nachgeschalteten Einheiten. Dennoch steigt hier der Anteil an unviablen Organismen im Mittel nachfolgend erneut an.

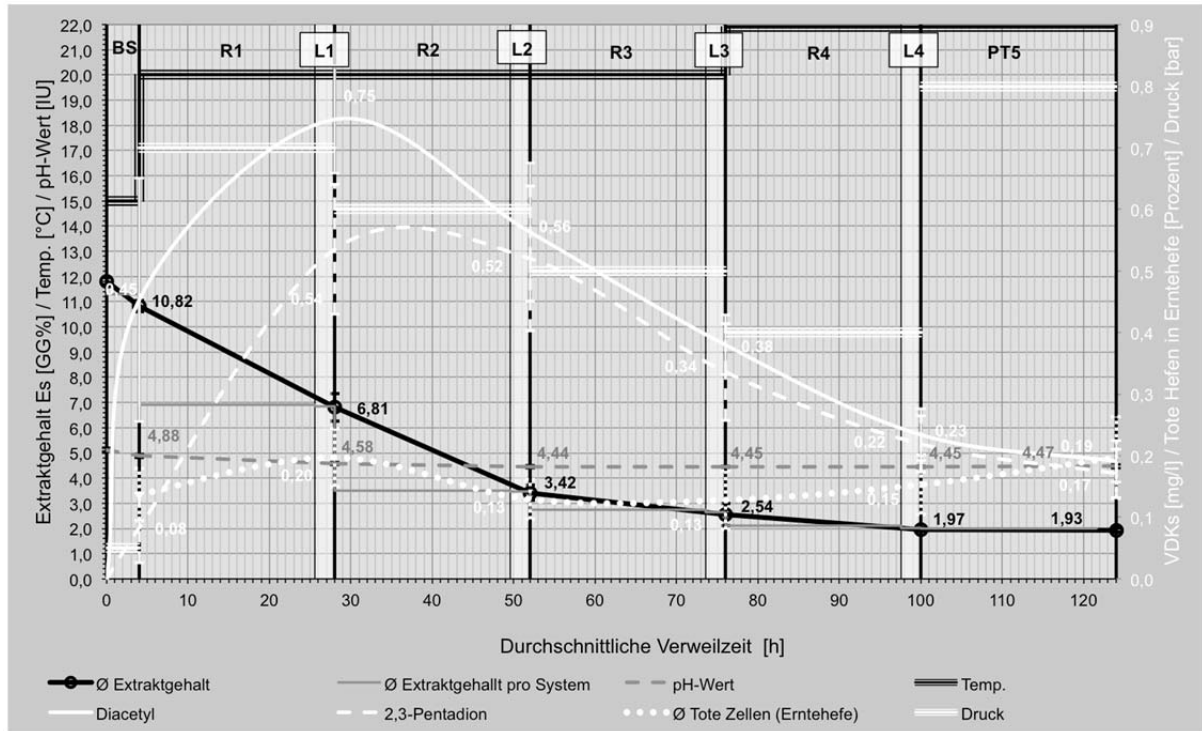


Abb. 68: Verfahrenseinstellungen (LV4: 20/20/20/22/22)

Die Umstellung des Kulturhefeorganismus TUM 34/70 auf den ebenfalls untergärigen Stamm TUM 193 bewirkte, dass der Diacetylgehalt bereits im 1. Reaktor (R1 = TFM50-1), der mit identischer Temperatur betrieben wurde, drastisch reduziert wurde, sodass bei gezeigten verfahrenstechnischen Einstellungen ein hinreichend geringer Gesamtdiketongehalt im Unfiltrat erreicht wurde (Abb. 69).

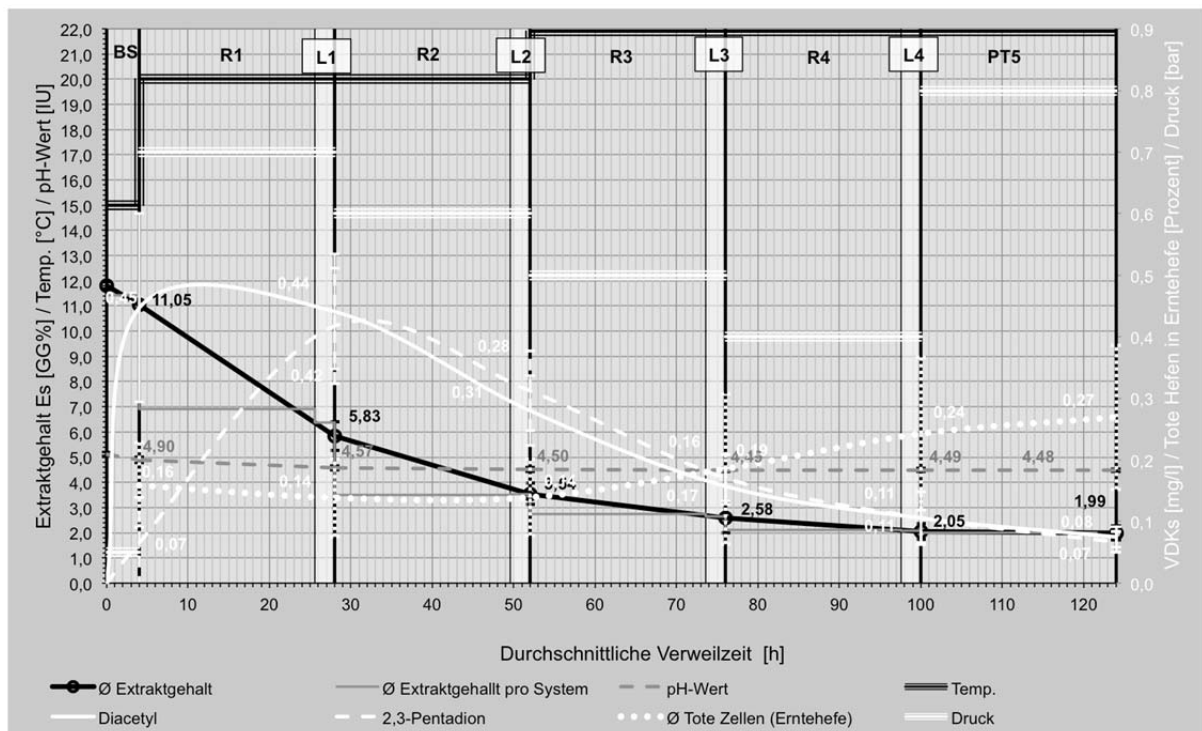


Abb. 69: Verfahrenseinstellungen (LV4: 20/20/22/22/22)

Obwohl der Anteil an toten Zellen in der Erntehefe in den nachgeschalteten Reaktoren stetig zunahm, verblieben die pH-Werte auf einem geringen und somit als positiv zu beurteilenden durchschnittlichen Niveau.

Bei der Bewertung der Viabilitäten muss beachtet werden, dass die Erntehefemenge über den Kaskadenverlauf abnahmen, sodass insbesondere im 4. Reaktor (R4 = TFM50-4) und im Puffer (PT5 = TFM50-5) kaum noch Biomasse sedimentierte.

Die vergleichende, systemspezifische Gesamtauswertung der Erntehefeviabilität (Abb. 70) verdeutlicht, dass durchschnittlich etwa 5–10 % mehr tote Hefezellen in der Erntehefe enthalten waren, als in der Anstellhefe, die nicht aus dem System stammte. Die Wiederverwendung und somit Reinokulierung mit erhöhten Totheefeanteilen erschwert jedoch eine exakte Beurteilung dieses Parameters.

Dennoch zeigte sich tendenziell, dass eine zu häufige Wiederverwendung durchaus Einflüsse auf den Lebendanteil im System haben kann. So sank der Gehalt an viablen Zellen in Phase 4 des Versuchs temporär ab, nachdem die Anlage über 2 Wochen lang nur mit systemeigener Erntehefe betrieben wurde. In diesem Zeitraum ist auch eine Verschlechterung der Bierschaumqualität zu beobachten, wie die Abbildung 71, S. 111, zeigt.

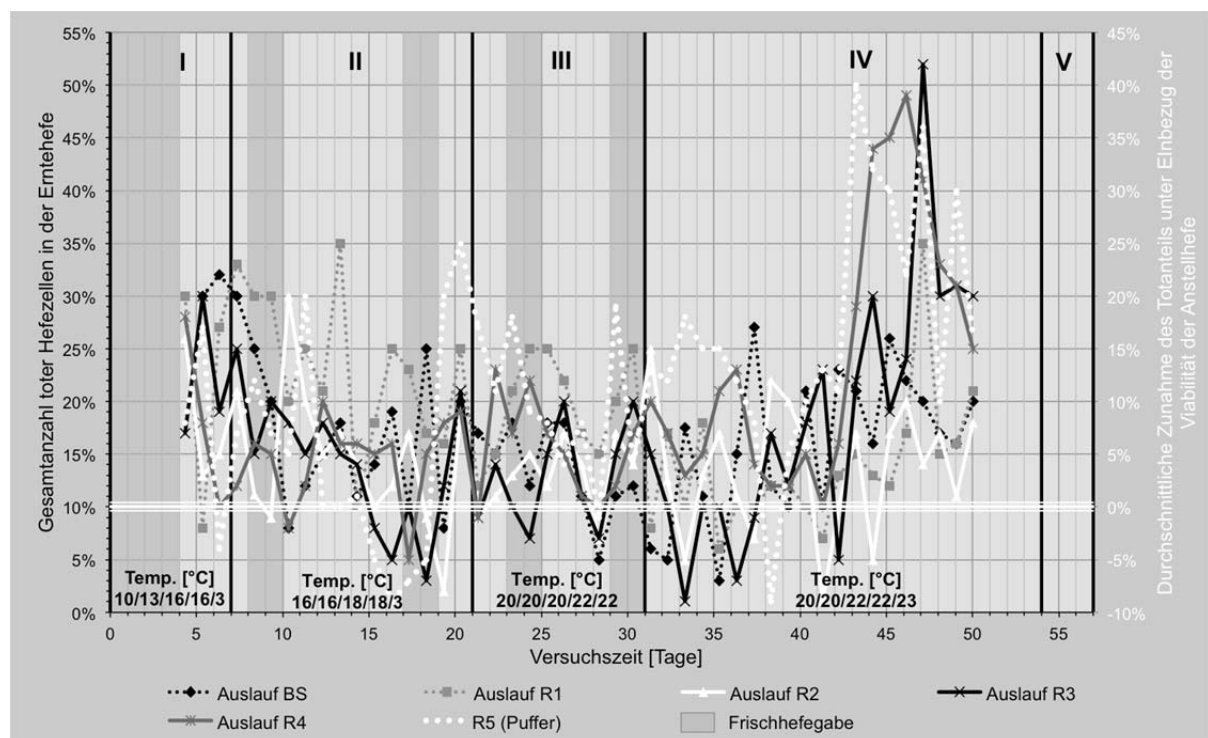


Abb. 70: Viabilitäten der Erntehefen (LV4)

Die Auswertung der Kapillargelelektrophoretetests zur Bestimmung der Verweilzeitfunktion ergab kein eindeutiges Ergebnis. Obwohl nach der Umstellung des Fermentationsorganismus in Intervallen von 2 Stunden Proben innerhalb von 48 Stunden entnommen wurden, um die Durchbrüche der DNA präzise zu erfassen, zeigte sich, dass bereits nach der ersten Probenentnahme 4 von 5 Analysen positiv waren, d. h. in Reaktor TFM50-(1-4) mindestens 0,5 % der neuimplementierten Hefen zu finden waren. Somit war das zuvor determinierte Probenintervall von 2 Stunden zu groß, um Rückschlüsse über das Strömungsverhalten ziehen zu können.

Nach der beschriebenen Produktherstellung wurden die Proben in KEGs abgefüllt, umgehend auf 4 °C innerhalb von 24 Stunden abgekühlt und anschließend mithilfe eines Kieselgurschichtenfilters filtriert, bevor eine Abfüllung in Flaschen vorgenommen wurde.

Die Abbildung 71 illustriert dabei Analysenergebnisse wichtiger Leitindikatoren zur Beurteilung der Produktqualität.

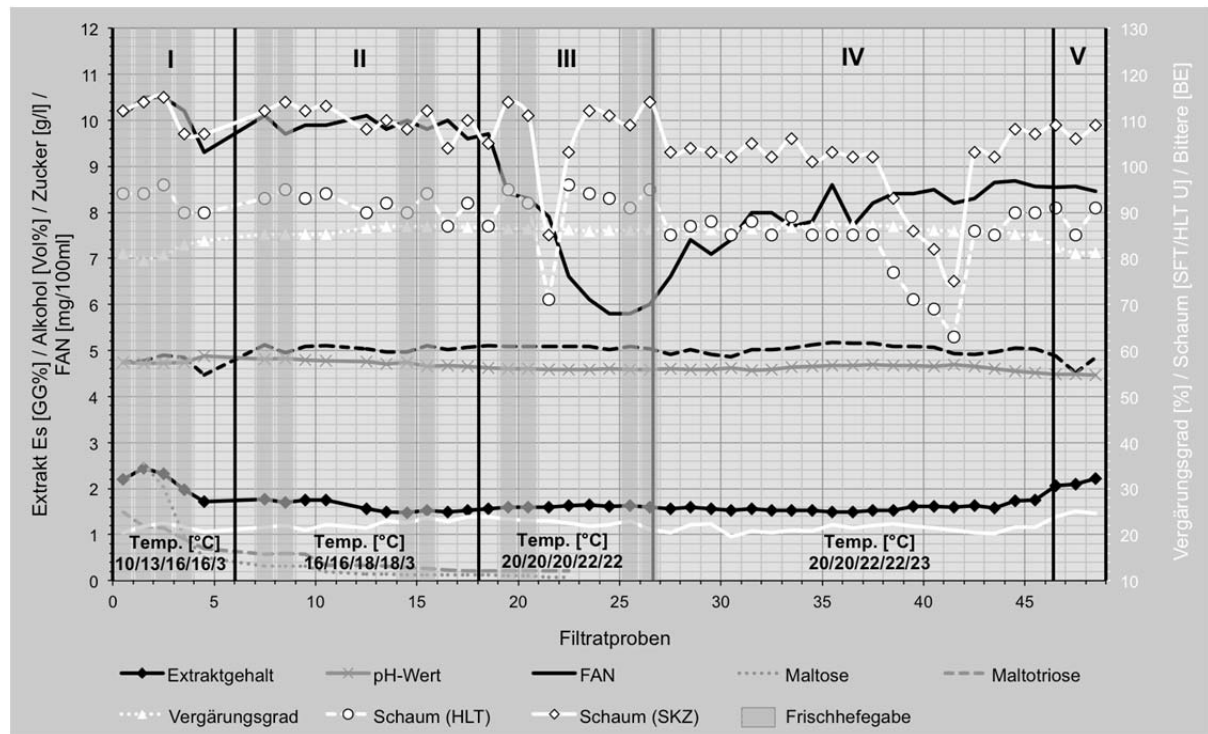


Abb. 71: Hauptgärparameter (HGP) in der Pilotanlage (LV4)

Wie der Abbildung 71 entnommen werden kann, wiesen die Filtratproben, die nach der kühleren Inbetriebnahme (Phase 1) in den Phasen 2 bis 4 entnommen wurden, konstante und qualitativ als gut zu bewertende Restextraktgehalte, Alkoholgehalte, Vergärungsgrade, pH-Werte und Bitterstoffgehalte auf.

Auch die Schaumqualität der Produkte konnte durch die implementierten Verfahren dieses Versuchs signifikant verbessert werden. Die temporäre Verschlechterung des Bierschaums nach etwa 38 Betriebstagen geht dabei mit einem kongruenten, temporären Viabilitätsverlust im Gesamtsystem einher (siehe Abb. 70).

Zudem wird ersichtlich dass die Aufnahme von freiem FAN durch warme Fermentationstemperaturen begünstigt wird.

Die Abbildung 72 illustriert den Diketongehalt in den Filtratproben. Dabei zeigt sich auch hier, dass die sukzessive Erhöhung der Fermentationstemperaturen zu einer Verminderung der freien und gesamten Diacetyl- sowie 2,3-Pentadiongehalten in den Bieren führte.

Ferner wird bei der Bewertung der 3-wöchigen Phase 4 ersichtlich, dass die angestrebten Diketonmengen von unter 0,1 mg/l (unterer Geschmacksschwellenwert) durch den Einsatz des Hefestammes TUM 193 bei entsprechend beschriebenen technologischen Einstellungen dauerhaft erreicht werden konnten.

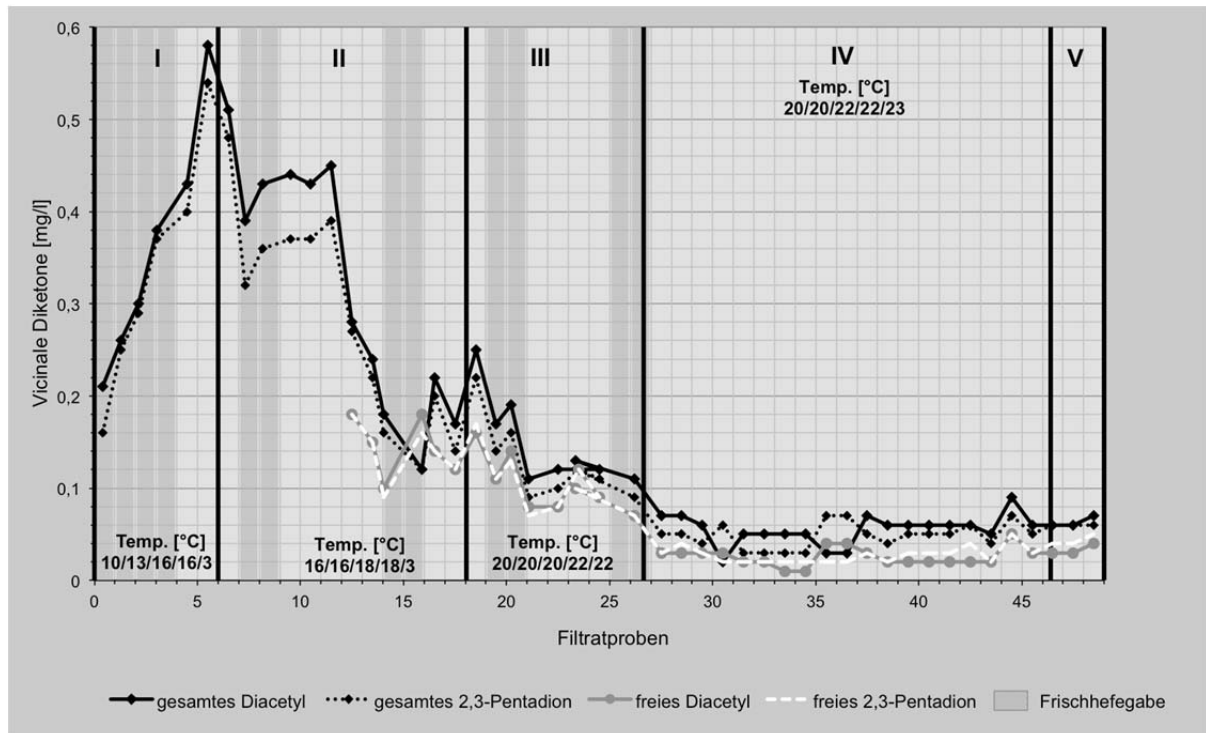


Abb. 72: Vicinale Diketone (VDK) der Fertigprodukte in der Pilotanlage (LV4)

Zur Qualitätskontrolle wurden zudem täglich Verkostungen aller Halb- und Fertigwaren durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass keine der Proben untypische Geschmacksfehler aufwies. Lediglich die Vollmundigkeit der Biere wurde komparativ als etwas geringer empfunden, was vermutlich auf die hohen Vergärungsgrade zurückzuführen ist.

Ab dem 22. Betriebstag konnte – unabhängig von der Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur der Filtrate – sensorisch kein Diacetyl in den filtrierten Proben detektiert werden.

Die Biere, die nach der Umstellung des Fermentationsorganismus mit dem Stamm TUM 193 hergestellt wurden, wurden von den DLG-Verkoster/innen als etwas fruchtiger und eleganter empfunden. Somit konnte keine negative organoleptische Beeinflussung durch die Anlagenbetriebszeit bestimmt werden.

In diesem Versuch wurde kein silikonbasiertes Antischaummittel zugegeben. Wie in der Abbildung 73 dargestellt wird, konnte dennoch der Verschmutzungsgrad – trotz längerer Betriebszeit – signifikant reduziert werden, indem der Füllstand der Reaktoren alle 3 Tage zyklisch um etwa 15 cm angehoben und anschließend um etwa 15 cm abgesenkt wurde.

Aus ökonomischen und qualitativen Aspekten ist daher diese Praxis einer Stoffzugabe zu bevorzugen.

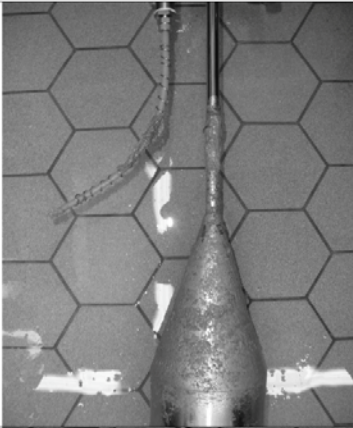
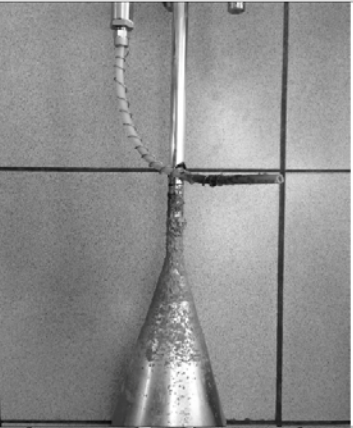
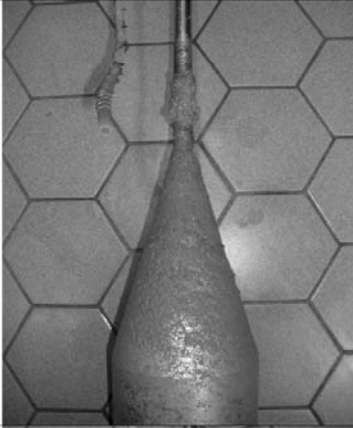

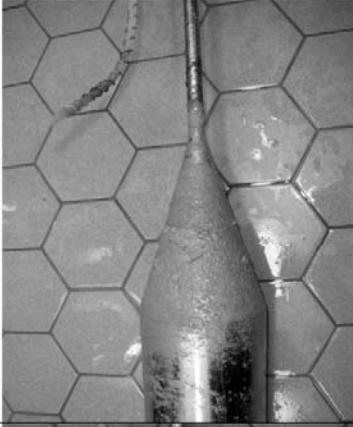

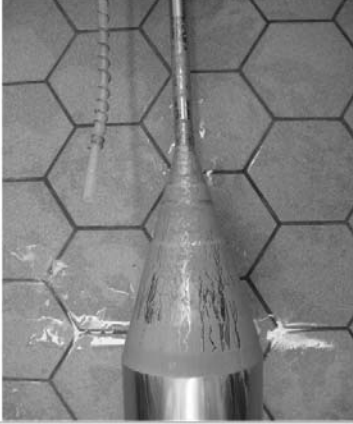
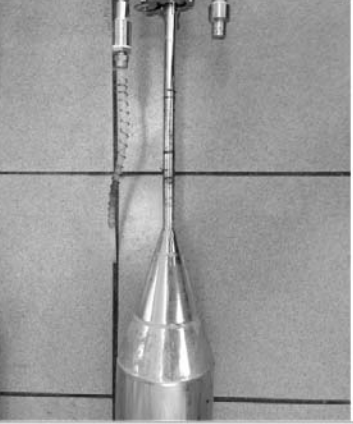
Reaktor	Versuch 3 Antischaummittelzugabe in Belüftungsstrecke (BS)	Versuch 4 Ohne Antischaummittelzugabe; mit Füllstandsvariationen
R1 TFM50-1		
R2 TFM50-2		
R3 TFM50-3		
R4 TFM50-4		

Abb. 73: Einfluss von Antischaummitteln und Verfahrensvariationen (LV3/LV4)

7 ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Kapitel werden separat die wichtigsten Erkenntnisse aus den vorangestellten Kapiteln zusammengefasst. Dabei wird zwischen Grundlagen, Basisexperimenten und den Versuchen zur kontinuierlichen Gärung differenziert.

7.1 Zusammenfassung Grundlagen

Da kontinuierliche Fermentationsverfahren zahlreiche potenzielle Vorteile bieten, gibt es seit der Industrialisierung des Brauprozesses Bestrebungen, derartige Verfahren auch für die Bierherstellung zu implementieren. Bisher gelang es jedoch nicht, qualitativ hochwertige Produkte dauerhaft und ökonomisch mit dieser Technologie zu fertigen.

Eine Vorstudie im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass sich derartige Herstellungsmethoden insbesondere für milch- und cerealienbasierte Getränke eignen.

Bei der Beurteilung des Standes der Technik zeigte sich indes, dass viele herkömmliche Vorrichtungen zu komplex waren, um ihren Einsatz unter wirtschaftlichen Aspekten zu rechtfertigen. Zudem wurde der Hefemetabolismus in den bisherigen Konzepten oftmals nicht ausreichend berücksichtigt.

Um diese Nachteile zu eliminieren und prozessbeeinflussende Variablen zu reduzieren, wurde daher ein alternatives Anlagen- und Verfahrenskonzept ausgearbeitet, das die Verwendung von freien Zellen vorsieht, auch um eine Vergleichbarkeit zu klassischen Batchgärungen zu ermöglichen.

Dabei basiert der Prozess vorzugsweise auf einer Reihenschaltung herkömmlicher ZKTs, die jeweils durch die Installation eines zentralen, nach unten geöffneten Leitrohres so modifiziert werden, dass das Fluid kontinuierlich von oben in den äußeren Tankbereich eingeleitet und durch das Rohr nach oben abgeleitet wird. Somit entstehen in jedem Tank 2 separate, jedoch direkt miteinander in Verbindung stehende Reaktionsbereiche, wodurch die Segregation optimiert werden soll.

Durch die zylindrokonische Form der Reaktoren können Sedimente von unten abgezogen und wahlweise verworfen oder behandelt und z. B. partiell wiederverwendet werden.

Basierend auf den theoretischen Kenntnissen der Reaktionskinetik sollten sich durch diese Konfigurationen turbulente Strömungen ergeben, deren Intensität sich über den Kaskadenverlauf sukzessiv abschwächt.

Der Fluidtransfer in dem einfach gestalteten Konzept sollte vorzugsweise über Druckgradienten erfolgen.

7.2 Zusammenfassung Basisexperimente

In vorangestellten Experimenten wurden zunächst Standardversuchsparameter definiert, um nachfolgend reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu generieren.

So ergaben Grundlagenversuche mit Sekundärwürzepräparaten, dass deren chemisch-physikalische Zusammensetzung sowie der organoleptische Charakter ihrer Fermentate zu

stark von industriell hergestellter Würze abweichen, weshalb diese für Experimente bevorzugt wurde.

Eine Einlagerung des Substrates führte jedoch zu temperaturabhängigen Variationen des Produktprofils, weshalb die Würze bei kühler Aufbewahrung innerhalb von einer Woche verwendet und wichtige Analysenparameter immer primär bestimmt werden sollten.

Um die generierten Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde der untergärige Hefestamm TUM 34/70 als Hauptversuchsorganismus ausgewählt, da dieser häufig in der Praxis eingesetzt wird und wissenschaftlich hinreichend genau beschrieben ist.

Um einen uniformen physiologischen Zustand der Populationen zu gewährleisten, wurden Propagations-, Kontroll-, und Verarbeitungsmethoden standardisiert.

Außerdem wurden 2 verschiedene Laborfermenter (KF und TF50) im Rahmen dieser Arbeit konzipiert und konstruiert, um praxisnahe Gärungen verschiedener Volumina simplifiziert vornehmen zu können.

Komparative Versuche dieser Systeme belegten, dass Fermentationen in den KF identisch wie in herkömmlich verwendeten EBC-Gärröhren verliefen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die beste Vergleichbarkeit zu industriell genutzten Reaktoren dann gewährleistet wird, wenn in den Laborfermentern (KF und TF50) ein Überdruck eingestellt wird, der etwa dem mittleren hydrostatischen Druck in den zylindrokonischen Großtanks entspricht.

Für beide Systeme, die auch untereinander eine hinreichend genaue Vergleichbarkeit aufwiesen, wurden anschließend standardisierte Betriebsmethoden definiert.

Es folgten Batchgärungen mit variierenden technologischen Parametern in den KF, um später den Einfluss der kontinuierlich betriebenen Reaktoren bzw. des Kaskadendesigns sowie das der gewählten Einstellungsparameter adäquat beurteilen zu können.

Durch Variationen der Inokulationsgehalte und der Fermentationstemperaturen konnten so Gesetzmäßigkeiten ermittelt und dadurch mathematische Zusammenhänge für den Extraktabbau, die Alkoholbildung, die Zeit zur Überwindung der Lag-Phase und des anfänglichen FAN-Abbaus innerhalb des ersten Fermentationstags beschrieben werden.

Außerdem wurde ersichtlich, dass eine temperaturunabhängige Relation zwischen Anstellzellzahl und Produktivität besteht.

Dieser Sachverhalt ermöglichte die Erstellung einer universellen Formel zur Vorhersage von Fermentationsverläufen mit den Variablen Zeit, Anstellzellzahl, Temperatur und Extraktgehalt.

Ein Einfluss der Belüftungsrate wurde durch die Versuchsanordnung nicht ersichtlich.

Weiterhin wurde der Systemdruck bei genannten Bedingungen systematisch erhöht. Da sich durch diese Praxis jedoch die biokinetischen Reaktionen der Hefe so stark verlangsamten, dass eine Implementierung derartiger Verhältnisse für weitere Experimente nicht infrage kam, wurde entschieden, diese Versuchsreihen nicht mit äquivalenter Anzahl an Repetitionen und somit statistischer Absicherung durchzuführen, weshalb auf eine mathematische Beschreibung der Analysenparameter verzichtet wurde.

Durch zyklische Variationen der Systeminnendrucke von Testfermentern (TF50) sollten zusätzlich Auswirkungen der Effekte evaluiert werden, die auf die Flüssigkeitssäule und Konvektionsströmungen in industriellen Tanks zurückzuführen sind. Außerdem wurden Versuche mit sukzessiv steigenden und fallenden Drücken durchgeführt. In beiden

Experimenten konnten jedoch keine signifikanten Folgen derartiger Praktiken im Vergleich zu isobaren, mittleren Referenzdrücken festgestellt werden.

Weil die Fermentationsorganismen maßgeblich die Anlageneffizienz beeinflussen und verantwortlich für den Produktcharakter sind, wurden alternative Verfahren entwickelt und getestet, um den physiologischen Zustand von Hefen vereinfacht und reproduzierbar bestimmen zu können.

Dabei zeigte sich, dass Stressoren messbare Einflüsse auf die Oberflächenladung und Gasbildung haben und dass durch die Ladungstitration und die Bestimmung der gebildeten Gärungskohlensäuremenge, z. B. in Einhorngärungssacharometern, Rückschlüsse auf die Vitalität der Population gezogen werden können.

Zur Verbesserung der Laborhandhabung und Erhöhung der Messwertgenauigkeit wurde die Methode so modifiziert, dass die Beurteilung des physiologischen Zustandes über den Druckaufbau während Standardfermentationen in einem vollautomatisierten System vorgenommen werden konnte, wodurch Korrelationen zu etablierten Messwertmethoden wie der intrazellulären pH-Wertbestimmung (ICP) ermöglicht wurden.

Um zu evaluieren, wie sich andere industriell verwendete Brauereihefestämme komparativ verhalten, wurde eine Methode entwickelt, die der Charakterisierung von Fermentationsorganismen dient. Hierbei zeigte sich, dass die Bezugnahme auf einen Referenzorganismus (hier: TUM 34/70) eine praxisnahe Vergleichbarkeit auch bei geringfügigen Modifikationen, bspw. Schwankungen der Substratqualität, mit hoher Präzision ermöglicht. So gelang es, relevante Merkmale von 6 anderen untergärigen Stämmen vergleichend zu erfassen.

Kontinuierliche Gärverfahren und Fermentationen mit hohen Stammwürzegehalten führen aufgrund längerer Verweilzeiten, gesteigerter osmotischer Drücke und Alkoholgehalten zu einer erhöhten Stressbelastung der Organismen. In einer Versuchsreihe wurde daher das natürliche Adaptionsvermögen des Stammes TUM 34/70 getestet. Hierbei zeigte sich, dass sich das Wachstumsvermögen sukzessiv veränderte, die Organismen jedoch trotz wiederholter Selektion keine signifikante Überlegenheit bei Fermentationen unter Stressbedingungen aufwiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass der verwendete Stamm genetisch stabil ist und der Einfluss von Mutationen – auch bei häufiger Wiederverwendung – vernachlässigbar ist.

Da die Substratsterilität und mikrobiologische Sicherheit bei kontinuierlichen Fermentationen obligat ist, wurden ferner Experimente durchgeführt, um zu testen, ob Nisin bildende Mikroorganismen (*Lactococcus lactis*) potenziell in brauereiüblichen Medien kultiviert und somit später zur Substrat- und Prozessstabilisierung innerbetrieblich gezüchtet und gezielt eingesetzt werden können.

Dabei erwies sich zunächst der Agar-Diffusion-Assay-Test als geeignete Methode, um die Wirkstoffkonzentration zuverlässig und präzise zu bestimmen. Die Experimente ergaben außerdem, dass alle getesteten Stämme hopfen- und alkoholsensitiv waren. Prinzipiell ist jedoch ein Wachstum und eine Nisinbildung in der Vorderwürze möglich – idealerweise bei Zuckerkonzentrationen von etwa 12–15 °Plato.

Weil Schaum die Anlageneffizienz verringert und die Langzeitauswirkungen von Brandhefen und anderen Biofilmen in den dauerhaft betriebenen Anlagen nicht abgeschätzt werden konnte, wurde außerdem ermittelt, welche Auswirkungen verschiedene Antischaummittel auf Fermentationen und den Anlagenverschmutzungsgrad haben. Hierbei zeigte sich, dass die

Schaumhöhe maßgeblich von der Reaktorgeometrie abhängt und dass in Batchverfahren eine Reduzierung der Ablagerungen durch die Gabe von Antischaummittel resultierte.

Abschließend wurde ein alternatives Verfahren entwickelt und getestet, um Verweilzeittests während der Produktion mit geringer Prozessbeeinflussung durchzuführen. Dazu wurden Hefestämme mit ähnlichen Extraktabbauraten als *Biotracer* verwendet, deren Gehalt in der Kulturhefepopulation quantitativ bestimmt werden konnte. So gelang es, das Strömungsverhalten in einem der kontinuierlich betreibenden Reaktoren (TFM50) zu bestimmen, der bei den implementierten Bedingungen eine nahezu ideale Durchmischungsrate aufwies.

7.3 Zusammenfassung über die kontinuierlichen Gärungen

Um Experimente im kontinuierlichen Modus adäquat durchführen zu können, wurde eine Versuchsanlage mit 50 Liter Fermentationsleistung pro Tag – basierend auf den zuvor generierten Erkenntnissen – konzipiert und konstruiert.

In 4 Langzeitversuchen zeigte sich dabei, dass die Konfiguration dauerhaft stabil betrieben werden konnte.

Die Stoffwechselraten entsprachen dabei in etwa denen aus Batchgärungen, die bei gleicher Fermentationstemperatur, jedoch mit doppelt so hoher Zellzahl angestellt wurden.

Ferner zeigte sich, dass sich das System bei Verkeimungen mit *Lactobacillus brevis* in gewissem Maße selbstständig stabilisiert, wenn keine Reinokulation mit infizierten Betriebsstoffen erfolgte. Zudem konnte durch die Zugabe von Nisin die vollständige Abtötung grampositiver Kontaminanten gewährleistet werden, ohne Einfluss auf die Fermentation zu nehmen.

Durch die Wahl der entsprechenden technologischen Parameter konnten – unabhängig von der Anlagenbetriebszeit und der geringen Hefeviabilität – qualitativ hochwertige Produkte hergestellt werden.

Dabei zeigte sich, dass konstant warme Gärtemperaturen um 20 °C anderen Temperatureinstellungen zu bevorzugen sind, um eine angestrebte Diketonreduzierung im Produktionszeitraum von 3–4 Tagen zu erreichen.

Bei diesen Bedingungen konnte die Produktqualität außerdem durch die Substitution des Hefestamms TUM 34/70 durch TUM 193 gesteigert werden.

Da sich der Totheanteil bei einer zu häufigen Wiederverwendung systemeigener Betriebshefe nach etwa 2 Wochen erhöhte und simultan die Bierschaumstabilitäten verringert wurden, ist von einer derartigen Praxis abzuraten.

Ferner zeigte sich, dass auf einen Einsatz von Antischaummitteln zur Reduzierung des Anlagenverschmutzungsgrads verzichtet werden kann, wenn die Füllstände zyklisch geringfügig variiert werden.

Die Ermittlungen der Verweilzeitfunktionen der Gesamtanlage scheiterten sowohl mithilfe des modifizierten Raffinostests als auch mittels der klassischen PCR-basierten Analyse. Dies lag vermutlich an einer inadäquaten Probenentnahme und Behandlung.

Abschließend kann festgehalten werden, dass es mit der entwickelten Anlagenkonfiguration und den entsprechenden Einstellungen nach 4 Versuchen gelang, kontinuierlich ein qualitativ hochwertiges Bier in einer mehr als 8 Wochen lang betriebenen Anlage herzustellen.

8 AUSBLICK UND DISKUSSION

In diesem Kapitel wird kontrovers diskutiert wie die wissenschaftlichen Erkenntnisse dieser Abhandlung zukünftig genutzt werden können.

8.1 Wirtschaftliche Betrachtung

Wie im Kapitel 3.3, S. 6 ff. beschrieben, kann die Anlageneffizienz durch kontinuierliche Fermentationsverfahren verbessert und somit die Wirtschaftlichkeit des Gärprozesses gesteigert werden.

Da die Vorteile jedoch maßgeblich von den innerbetrieblichen Gegebenheiten abhängen und sich nur wenige Faktoren pauschalisieren lassen, ist eine verallgemeinernde Beurteilung der Wirtschaftlichkeit schwierig.

Um trotzdem eine Vergleichbarkeit eines klassisch dimensionierten Batchkellers mit dem hier entwickelten Anlagekonzept für industrielle Applikationen zu ermöglichen, werden nachfolgend ausschließlich eindeutig bestimmbare Maßnahmen bei der Evaluierung des ökonomischen Nutzens berücksichtigt.

8.1.1 Kapitalkostenreduzierungen (Capex)

Auch wenn sich Schnellgärverfahren mit entsprechenden Inokulationsgehalten, Fermentationstemperaturen und Spundungsdrücken aufgrund logistischer und konstruktiver Einschränkungen nur bedingt in konventionellen Batchanlagen realisieren lassen, wird diese Annahme dennoch getroffen, um einen Vergleich zu ermöglichen.

Ferner wird angenommen, dass die Tanks, unabhängig von der Betriebsweise, eine äquivalente Menge an Produkt, z. B. eine Tagesproduktion, fassen, wengleich dies, bei klassischer Betriebsweise aus technologischen Aspekten nicht zu empfehlen ist, da die Befüll- und Entleerdauern verhältnismäßig an die Gärzeiten angepasst und somit bei beschleunigten Methoden mehr Reaktoren mit geringerem Volumen bereitgestellt werden sollten.

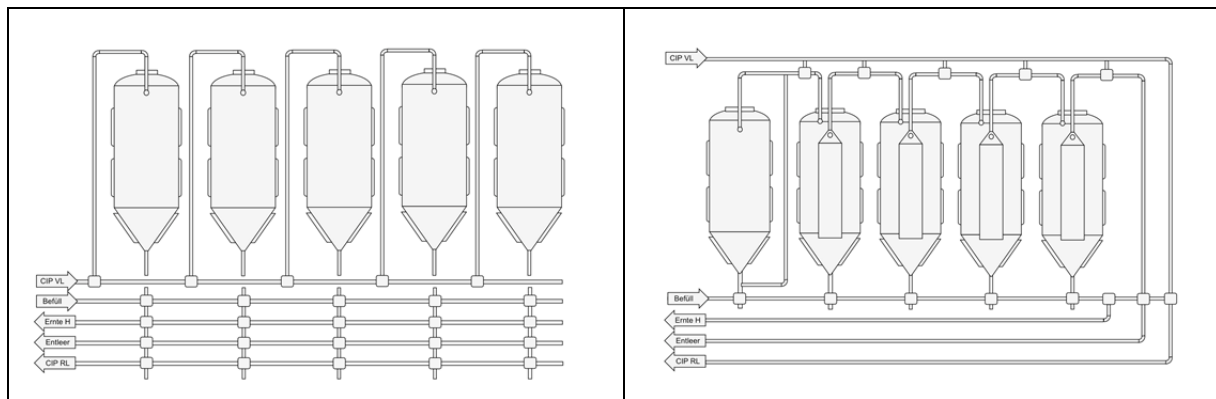


Abb. 74: Prozessanbindung der herkömmlichen und alternativen Technologie

Wie die Abbildung 74 vereinfacht illustriert, wird die benötigte Reaktoranzahl im kontinuierlichen Betrieb dennoch um mindestens 1–2 Reaktoren verringert, weil in jedem Fall die Rüstzeiten (Befüllung, Entleerung, und Reinigung) entfallen. Außerdem können die Reaktorvolumina um 10–15 % reduziert werden, da bei kontinuierlichen Prozessen eine schaumoptimierte, permanente Befüllung erfolgen kann.

Demgegenüber stehen jedoch zusätzliche Investitionen für Modifikationen herkömmlicher Tanks, in diesem Fall einschließlich der Installation der Leitrohre. Zudem müssen je nach Betriebsgegebenheit Pufferbehälter im kontinuierlichen Modus vorgesehen werden.

Somit sind die Kosten für die Reaktortechnologie, auch bei Annahmen, die sich als technologisch unvorteilhaft für den Batchbetrieb auswirken würden, als etwa äquivalent einzuschätzen. Allerdings ist der Raumbedarf für eine kontinuierlich betriebene Anlage geringer.

Signifikante Kapitalkosteneinsparungen können sich zudem insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Anbindungsarten ergeben. So werden herkömmliche Batchfermenter in der Regel mit separaten Befüll-, Entleer-, Erntehefe-, CIP-Vor- und CIP-Rücklaufleitungen verbunden, was im kontinuierlichen Modus nicht notwendig ist. Dadurch verringert sich die Anzahl der Ventile, Pumpen und Armaturen sowie der Aufwand für deren Prozesseinbindung (vgl. Abb. 74). Außerdem können die Nennweiten bei kontinuierlichem Modus partiell reduziert werden.

Kapitalkosteneinsparungen bei Verfahrensumstellungen sind somit wahrscheinlich, insbesondere wenn berücksichtigt wird, dass die klassische Reaktortechnologie an Schnellgärverfahren angepasst werden sollte.

8.1.2 Betriebskostenreduzierung (Opex)

Wohingegen im Batchmodus nach jeder Tankbelegung Reinigungen erfolgen, werden kontinuierlich betriebene Anlagen nur zyklisch nach etwa 3–6 Monaten Betriebszeit entleert und gesäubert. Selbst unter der Annahme, dass der Puffertank einer kontinuierlich betriebenen Fermentationsanlage 3-mal wöchentlich gereinigt wird und dass das Gesamtsystem intensiver gesäubert werden muss, ergeben sich dennoch vergleichsweise deutliche Einsparungen bei der kontinuierlich betriebenen Technologie. So müssen geringere Mengen an Laugen, Säuren, Desinfektionsmitteln, Wässern, CO₂ und Druckluft verwendet werden. Außerdem verringern sich die Anforderungen an die Logistik und die Reinigungs-, Aufbereitungs-, und/oder Produktionsanlagen können effizienter konzipiert werden. Darüber hinaus werden weniger Strom und Wärme für den Prozess benötigt.

Weitere Einsparungen ergeben sich insbesondere aufgrund der Verringerung von Produktverlusten. So bleibt nach jeder Tankentleerung eine bestimmte Menge an Flüssigkeit an den Reaktorwandungen haften und geht somit verloren. Dabei ist die Haftmenge maßgeblich von der Oberfläche, der Oberflächenbeschaffenheit – insbesondere der Rauigkeit –, der Temperatur und der Viskosität der Produkte abhängig.(284) Obwohl die kontinuierlich betriebenen Reaktoren hier eine verhältnismäßig größere Oberfläche durch das zentral installierte Leitrohr aufweisen, resultieren bei ihrem Betrieb deutlich weniger Haftverluste, da Entleerungen seltener erfolgen. Schließlich werden die Transferverluste verringert, die aufgrund von Wasservorlagen und Nachschüben durch Mischphasen entstehen.

Durch diese allgemeingültigen Einsparungspotenziale wird verdeutlicht, dass die permanente Anlagenausnutzung in jedem Fall die Gesamtwirtschaftlichkeit des Prozesses erhöht.

In einem konkret berechneten Beispiel konnte so belegt werden, dass Investitionsersparnisse (Capex) von über 35 % und jährliche Mindestersparnisse (Opex) von über 100.000 €/a bei einer Kapazitätserweiterung von 300.000 hl/a resultieren. Dabei wurden die Tanks nur für die Fassung einer halben Tagesproduktion und 6 Betriebstagen/Woche ausgelegt, weshalb ein Puffer vorgesehen wurde und somit der kontinuierliche Betrieb nicht maximaleffizient konzipiert werden konnte.

Somit können bei einer Prozessumstellung von einem chargenweisen Betrieb auf eine kontinuierliche Arbeitsweise signifikante, makroökonomische Vorteile realisiert werden.

8.2 Industrielle Umsetzung des Konzeptes

Nach einer Pressemitteilung der TUM im Jahr 2013 wurde das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren durch das *Deutsches Institut für Erfindungswesen* für die *Dieselmedaille* in der Kategorie *Nachhaltigste Innovationsleistung* nominiert.(285)

Um zu evaluieren, ob sich die Ergebnisse und möglichen Vorteile auch auf einen industriellen Maßstab übertragen lassen, wurde daraufhin 2014 ein wissenschaftliches Kooperationsprojekt zwischen der Krones AG und dem Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität (TUM) initiiert.(285)

Durch die Vorstellung des gemeinsamen Vorhabens anhand eines Modelles auf der *BrauBeviale* in Nürnberg (286) wurde schließlich ein geeigneter 3. Partner für erste großtechnische Versuche gefunden, der aus vertragsrechtlichen Gründen ungenannt bleibt.



Abb. 75: Messemodell zur kontinuierlichen Biergärung

2015 folgte die detaillierte, spezifische Planung und Auslegung der Testanlage mit 5.000 l Bier/d Ausstoßleistung. Die Abbildung 76 zeigt den dabei vorgeschalteten Systemteil.

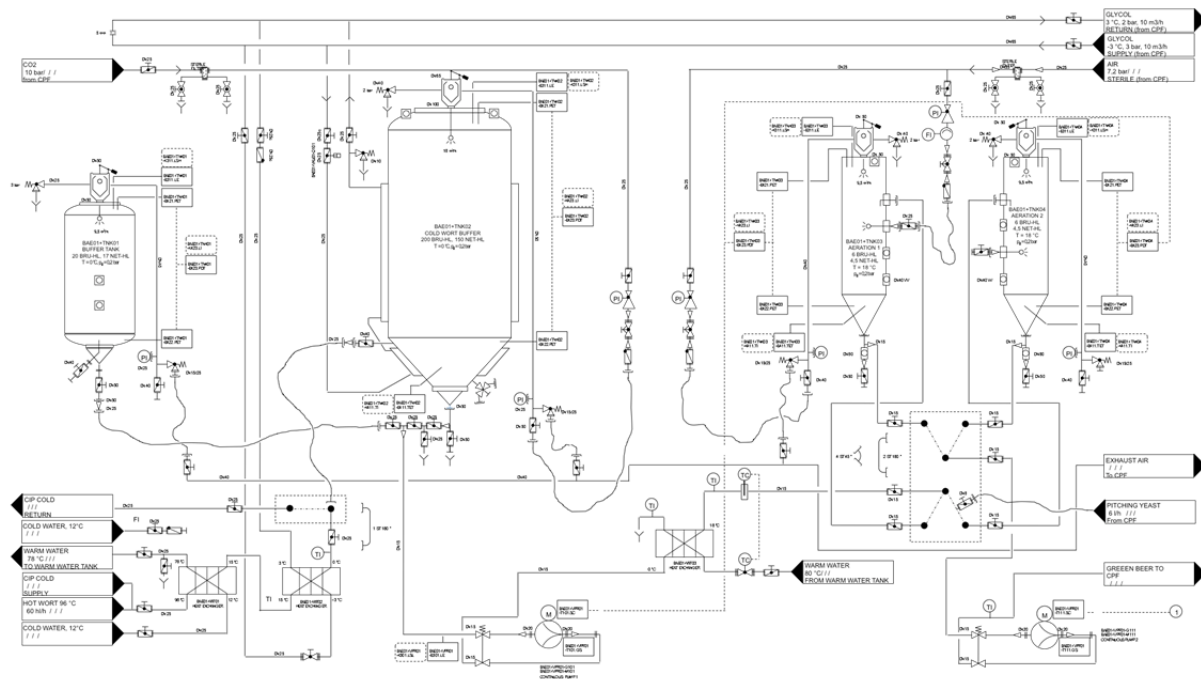


Abb. 76: Würzepuffer und Vorreaktoren zur kontinuierlichen Fermentation

Wie der Abbildung 76 entnommen werden kann, wird die benötigte Menge an Heißwürze zunächst in einem zweistufigen Plattentauscher abgekühlt und in einem Puffertank kalt zwischengespeichert. Dabei erfolgt die Befüllung des Puffertanks vorzugsweise über den seitlich angeordneten Zulaufstutzen, wohingegen die Entleerung und der Trubabzug klassisch von unten vorgenommen werden. Um Veränderungen des Substrates zu vermeiden, wird der Tank zunächst mit Kohlensäure beaufschlagt, wobei Alternativen zukünftig getestet werden sollen.

Der Würzetransfer über einen Plattentauscher in die Vorreaktoren wird mithilfe einer Schlauchpumpe realisiert, sodass eine Erwärmung auf Anstelltemperatur erfolgen kann. Dabei wird das Substrat am Panel mit Hefe beimpft, wodurch eine Homogenisierung gewährleistet werden soll.

Die Belüftung erfolgt anschließend im Vorreaktor. Die schlanken Behälter werden von oben befüllt und zentral begast, um im höher gelegenen Reaktorteil eine Durchmischung, Sauerstoffsättigung und Schaumabscheidung zu erreichen. Im unteren Reaktorteil hingegen wird eine heterogene Pfropfenströmung angestrebt, da eine Produktinhibition insbesondere in der Adaptionsphase vermieden werden soll.

Weil die Behältergeometrie und die aktive Begasung Schaumbildungen begünstigen, werden 2 gleichartige Behälter vorgesehen, die wahlweise singulär autark, parallel oder in Reihe geschaltet betrieben und gereinigt werden können. Außerdem können auch hier Sedimente separat am Konusauslauf abgezogen werden.

Das Jungbier wird anschließend mithilfe einer Schlauchpumpe in den ersten Reaktor geleitet, indem Überdrücke variabel eingestellt werden können. Dabei wird die Förderleistung mithilfe von Füllstandsmessern im ersten Reaktor geregelt. Der Konstruktionsplan (Abb. 77) zeigt den nachgeschalteten Systemteil.

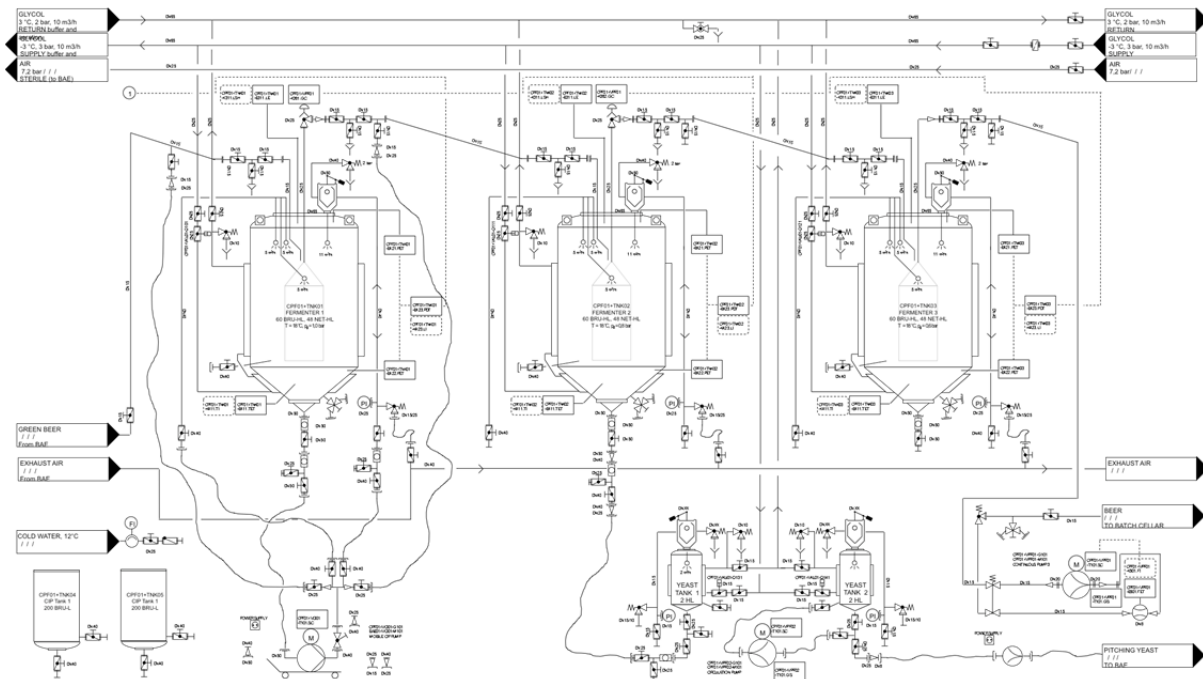


Abb. 77: Hauptreaktoren zur kontinuierlichen Fermentation

Um Brandhefeablagerungen am Leitrohr zu verhindern, wird das Fluid dabei – anders als in der Laboranlage – über den oberen, konischen Teil der zentral installierten Konstruktion geleitet. Ferner werden 3 Spritzköpfe im Mantelbereich sowie ein separater Spritzkopf im Leitrohr (L) vorgesehen.

Die Flüssigkeitsüberführung in die beiden nachgeschalteten, identisch gestalteten Reaktoren erfolgt aufgrund der fallenden Druckgradienten, vorzugsweise ohne Primärantriebe. Dabei wird die Förderleistung über die füllstandgesteuerten Regelventile in den Transferleitungen eingestellt.

Das fertige Produkt kann anschließend optional zwischengespeichert oder direkt kontinuierlich in einen klassisch betriebenen Fermenter eingeleitet und somit verschnitten werden.

Die Hefeerte erfolgt manuell in kleine zylindrokonische, kühlbare Tanks. Diese sind mit Umwälzleitungen ausgestattet und dienen auch als Dosagebehälter zur Inokulation der Würze.

Eine Realisierung dieses Konzeptes erfolgte im Frühjahr 2016. Nach störungsfreier Inbetriebnahme wurde das erfolgreiche Verfahren aus dem hier vorgestellten, 4. Langzeitversuch (LV4) eingestellt (einschließlich der Verwendung des Hefestamms TUM 193), um die Versuchsergebnisse zukünftig besser vergleichen zu können.

Bisher läuft die Anlage (mehr als 50 Tage lang) stabil, wobei eine Vergleichbarkeit zu den hier generierten Ergebnissen bisher dadurch erschwert wird, dass nun Würze mit 15,1 °Plato Stammwürze verwendet wird.

Dennoch ist die Produktqualität und die Hefevitalität konstant gut und entspricht den Erwartungen und Anforderungen der Projektpartner.

Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 78–Abb. 80) illustrieren die industrielle Testanlage.



Abb. 78: Industrielle Versuchsanlage zur kontinuierlichen Fermentation



Abb. 79: Links: Belüftungsstrecke und Erntehefetanks



Abb. 80: Rechts: Leitrohr im Reaktor mit kräusenbedecktem Bierspiegel

8.3 Fokus weiterer Forschungsarbeiten

In weiteren systematischen Versuchen sollen insbesondere folgende Themen bearbeitet werden:

8.3.1 Manipulation der Substrateigenschaften

Bekanntermaßen beeinflusst die Substratzusammensetzung nicht nur das Gärungsnebenproduktspektrum, sondern auch den physiologischen Zustand der Hefen. Daher kann die Zugabe von Wuchs- oder Nährstoffen von entscheidender Bedeutung sein und idealerweise zu einer Erhöhung der Vitalitäts- und Viabilitätsraten führen.

Zudem gilt es, Experimente mit unterschiedlichen Stammwürzegehalten vorzunehmen, um Auswirkungen der Produktinhibitionen zu ermitteln.

Ferner sind Versuche zur Stabilisierung des Substrates vorgesehen. So soll beispielsweise genauer untersucht werden, ob und wie nisinbildende Kulturen effizient und ökologisch genutzt werden können, um Bakterizide innerbetrieblich herstellen und wirksam einsetzen zu können.

8.3.2 Optimierung der Würzelagerung

Hierzu sollen Experimente durchgeführt werden, bei denen das kalte Substrat zur Lagerung mit Hefe angestellt wird, um dadurch die mikrobiologische Sicherheit zu erhöhen.

Außerdem soll unter qualitativen, wirtschaftlichen, logistischen und technologischen Aspekten getestet werden, wie und mit welchem Gas der Pufferbehälter vorzugsweise zu beaufschlagen ist.

Ferner gilt es zu eruieren ob eine primäre Kalttrubabscheidung der eingelagerten Würze obsolet ist.

8.3.3 Charakterisierung weiterer Hefestämme

Da die Hefe maßgeblich die Produktqualität beeinflusst, sollen zukünftig die Eigenschaften weiterer Stämme vergleichend bestimmt werden, um gezielt Prozess- und Qualitäts-optimierungen vornehmen zu können.

Ferner gilt es, weitere systematische Abhängigkeiten der Mikroben zu ermitteln und diese mathematisch zu beschreiben. Dabei sollten zusätzliche Parameter, wie variierende Stammwürzegehalte und Systemdrücke einbezogen und charakteristische Unterschiede bestimmter Phänotypen herausgearbeitet werden.

8.3.4 Optimierung des Anstellens

Weil sich bei den Versuchen der kontinuierlich betriebenen Kleinanlage gezeigt hatte, dass der Extraktgehalt in dem ersten, permanent belüfteten Vorreaktor (BS) deutlich schneller als in Batchgärungen abnahm, gilt es, die Einflüsse der Belüftungsintensitäten, Anstelltempera-

turen und Verweilzeiten in dieser Prozesseinheit zu variieren, um Gesetzmäßigkeiten zu detektieren.

Außerdem soll der verbleibende Sauerstoffgehalt nach der Belüftungstrecke (BS) mit erfasst werden, um die Konstruktion zukünftig so auszulegen, dass idealerweise reines CO₂ im 1. Reaktor für eine Wiederverwendung zur Verfügung steht.

8.3.5 Prozessüberwachung

Neben der üblichen Prozessleitdatenerfassung, die z. B. durch die automatisierte Bestimmung der Extraktgehalte, Leitwerte, Trübungsgehalte, Durchflussraten, Füllstände, Sauerstoffgehalte, etc. charakterisiert wird, und der analytischen Produkt- und Verfahrensbeurteilung durch klassische und hier entwickelte Methoden, gilt es, zukünftig alternative, berührungslose Möglichkeiten zur Vereinfachung von Prozessüberwachungen und Steuerungen zu testen.

So ermöglicht die Auswertung der Schaltspiele vorhandener Ventile und Sensoren potenziell, Zustandsveränderungen in Echtzeit zu erfassen und Rückschlüsse aufgrund von systematischen Korrelationen zu berechnen, um bei Bedarf Manipulationen gezielt vorzunehmen.

Im besonderen Fokus sollten dabei die Informationen zur abgeführten Gärungskohlensäure und Gärungswärme stehen, da diese bekanntlich in direkter Verbindung mit spezifischen Stoffwechselfunktionen der Hefen stehen.(256, 257)

8.3.6 Verfahrenstechnische und konstruktive Modifikationen

Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zwischen der hier getesteten Kleinanlage und der geplanten industriellen Konfiguration zu ermöglichen, müssen die Systeme konstruktiv zunächst möglichst identisch gestaltet sein und ähnlich betrieben werden.

In Abhängigkeit der Versuchsergebnisse sollen anschließend Modifikationen zur Effizienzsteigerung und/oder Qualitätsoptimierung vorgenommen werden.

Komponenten wie die Leitrohre (L), die Vorreaktoren (BS) und die Verrohrungen können daher in der Pilotanlage ausgetauscht bzw. in ihrer Form und Funktionalität verändert werden. Darüber hinaus lassen sich alle Gärungsparameter sowie die Durchflussraten und Strömungsrichtungen beliebig variieren. Die Betriebsdauer und Organismenbehandlung bzw. deren Einsatz erfolgt dabei ebenfalls in Abhängigkeit der experimentell eruierten Resultate.

8.3.7 Ergänzende und alternative Technologien

Im Rahmen dieser Abhandlung entstanden weitere Konzepte zu Verfahren und Vorrichtungen, um die Prozesse zukünftig weiter zu optimieren.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass das adäquate Hefemanagement ein Schlüsselement zur Erzielung der angestrebten Produktqualität ist. So sollten die Organismen regelmäßig aus dem Prozess entnommen, entsprechend behandelt und nur begrenzt häufig wiederverwendet werden.

Üblicherweise erfolgt der Sedimentabzug aus den Fermentationstanks dazu mit deutlich reduzierten Geschwindigkeiten, um Kanalbildungen in der Partikelschicht zu vermeiden. Dennoch können Inhomogenitäten nicht immer vollständig verhindert werden, sodass partielle Ablagerungen von Sedimentschichten temporär an den Tank(boden)wandungen verbleiben und spätere Prozesse behindern können.

Weil derartige Effekte bei dauerhaftem Betrieb unbedingt zu vermeiden sind, wurde hier die Installation eines Verdrängungskörpers in den unteren Tank(boden)bereich in Betracht gezogen.

Durch die Form des Elementes, die individuell angepasst werden kann, werden die Strömungen seitlich abgeleitet, wodurch sich Ablagerungen schneller, gleichmäßiger und effektiver entfernen lassen sollen. Die Ausführung (Abb. 81) zeigt dabei eine bevorzugte Bauform, die z. B. in die demontierbaren Konusteile der zylindrokonuschen Fermentationstanks integriert werden kann.

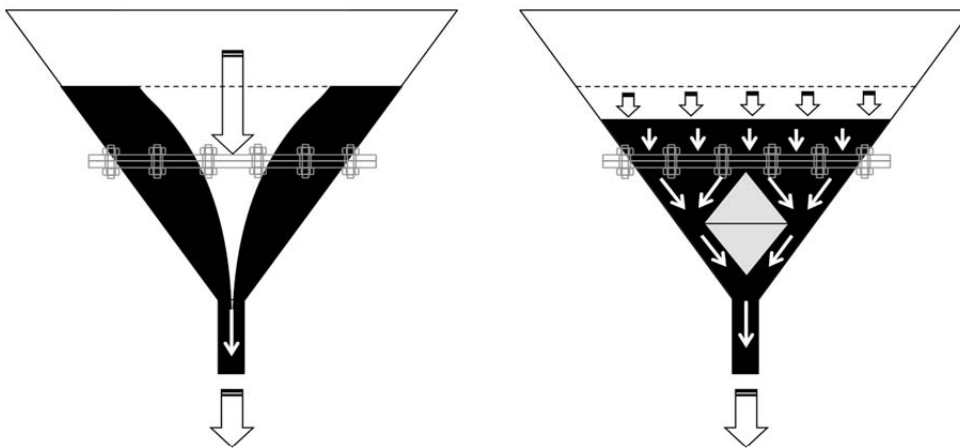


Abb. 81: Funktionsschema der Verdrängungselemente

Zudem können die Verdrängungskörper weitere funktionelle Elemente beinhalten. So kann bspw. die Form so gewählt werden, dass gezielt Rotationsbewegungen bei der Befüllung und/oder Entleerung resultieren (siehe Abb. 82).

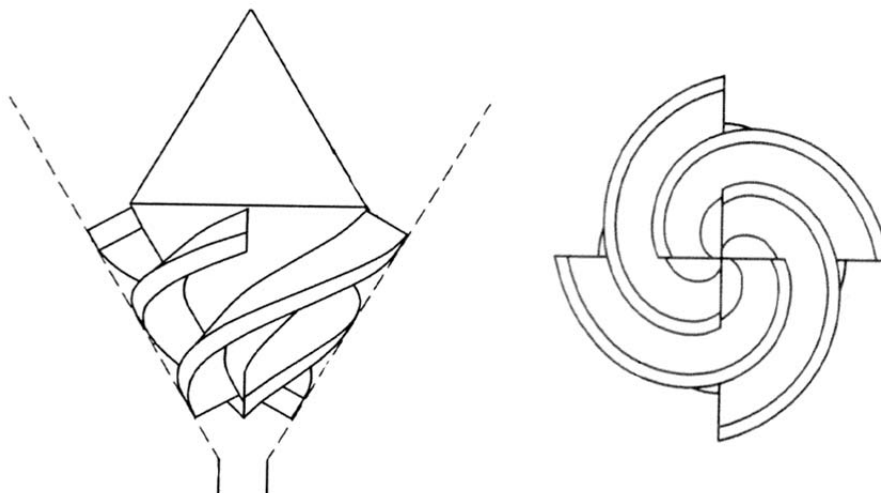


Abb. 82: Verdrängungskörper mit Drallelementen

Die Integration von Rohrleitungen kann zudem dazu genutzt werden, um Umwälzverfahren, z. B. in den Pufferbehältern zu realisieren. Die Abbildung 83 illustriert dabei ein Verfahren, bei dem die Strömungsrichtung aufgrund einer entsprechenden Ventilschaltung variabel verändert werden kann.

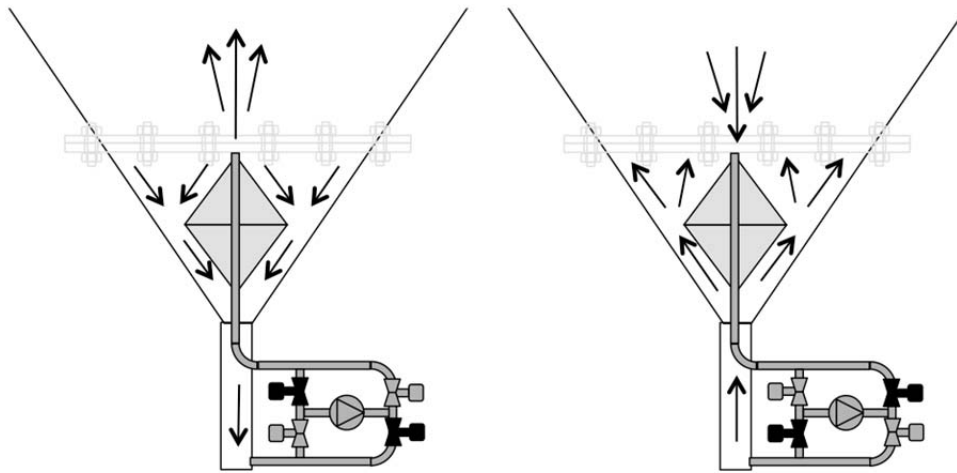


Abb. 83: Verdrängungselement in Kombination mit Umwälzvorrichtungen

Erste Berechnungen, Simulationen und Vorversuche ergaben, welche Bauformen und Konfigurationen präferiert werden sollten. Im Rahmen der Praxisversuche in der Pilotanlage werden daher die Auswirkungen derartiger Konstruktionen auf Prozesse im industriellen Maßstab getestet.

Ferner wurde ein Entwurf zu modifizierten Tankleitungsführungen ausgearbeitet, die eine simultane Partikelabscheidung und Umwälzung ermöglichen und optional zu einer Kaskade kombiniert werden können. Durch diese Konfiguration sollen später die Leitrohre in den Reaktoren partiell ergänzt oder ersetzt werden, da die Einbringung der Bauteile bisher, insbesondere bei sehr großen Tanks, eine logistische, konstruktive und statische Herausforderung darstellt.

Eine mögliche Ergänzung des Konzeptes kann daher durch eine alternative Verrohrung, wahlweise in Kombination mit dem Verdrängungselement gewährleistet werden.

Wie die Abbildung 84 verdeutlicht, basiert der Entwurf dabei auf drei Rohrleitungen, die auf unterschiedlichen Niveaus in den Tanks installiert werden. Durch diese Konfiguration lassen sich Umwälzverfahren und/oder Sedimentationen zeitgleich realisieren.

Idealerweise erfolgt die Einbringung der gezeigten Rohrleitungen von unten, sodass bestehende Tanks mit der Technologie vereinfacht nachgerüstet werden können.

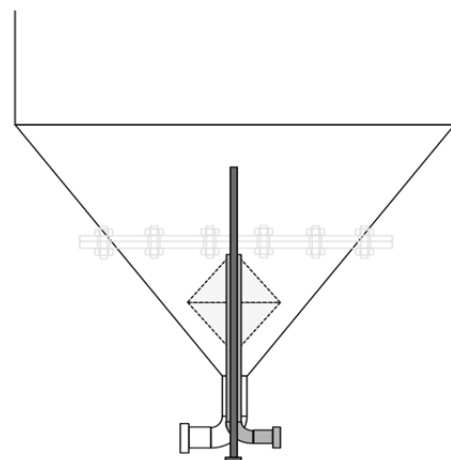


Abb. 84: Alternatives Tankverrohrungskonzept

Durch die Weiterleitung eines Teilstroms, z. B. aus den Umwälzleitungen, können die Prozesseinheiten zu Kaskaden verschaltet werden, wodurch ein kontinuierlicher Betrieb ermöglicht wird. Dieses Szenario ist in der Abbildung 85 dargestellt.

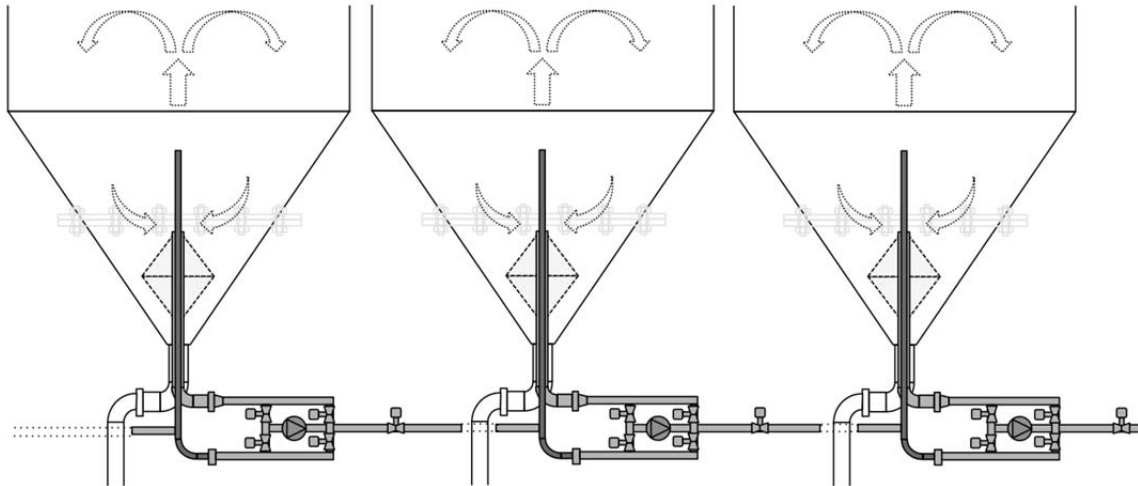


Abb. 85: Alternatives Tankverrohrungskonzept in Kaskadenschaltung

In vergleichenden Praxisversuchen soll zukünftig die Auswirkung derartiger Prozesse untersucht werden. Dazu werden Versuche im industriellen Maßstab angestrebt.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 86) zeigt die zu diesem Zwecke konstruierte Versuchseinheit.

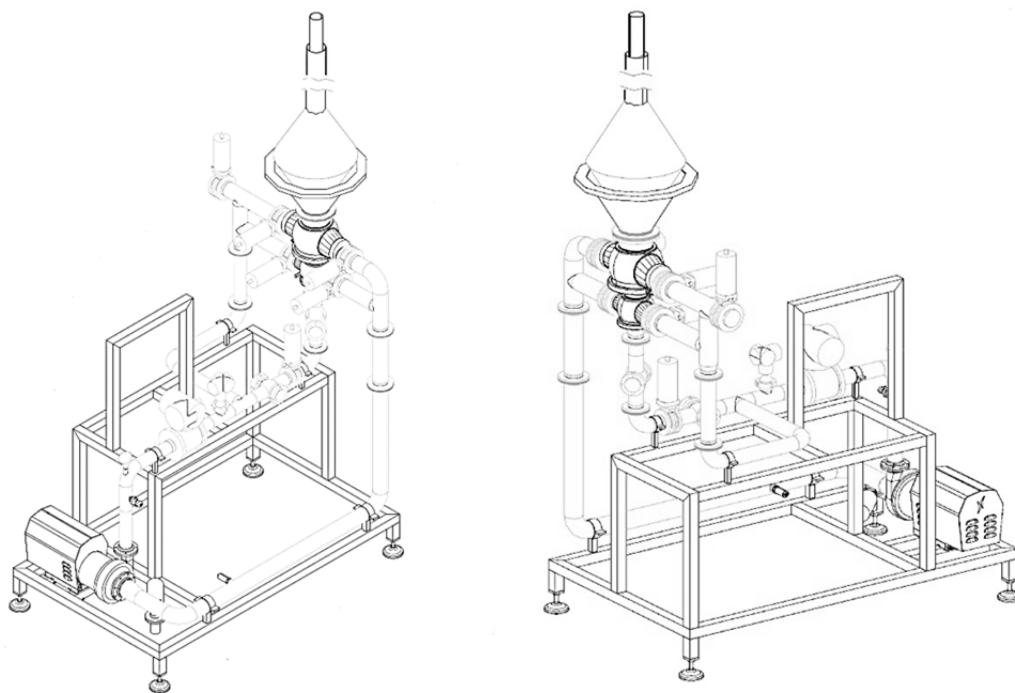


Abb. 86: Versuchsanlage zur Tankumwälzung u. kontinuierlichen Fluidweiterleitung

8.4 Fazit

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass kontinuierliche Fermentationsverfahren zukünftig keinesfalls die chargenweisen Herstellungsmethoden obsolet machen werden, sondern diese bestenfalls komplimentieren.

Da die Effizienz der Prozesse maßgeblich von spezifischen, innerbetrieblichen Faktoren abhängt, ist diese Technologie nur in ausgewählten Fällen zu präferieren.

Dennoch sollten die Forschungs- und Entwicklungsarbeiten auf diesem Gebiet weiterhin intensiviert werden, auch weil sich eine Vielzahl der Erkenntnisse auf andere Prozesse übertragen lassen.

Idealerweise sollte die Anlagentechnologie dabei so einfach wie möglich konzipiert sein und sich die Technologie in bestehenden Fermentern nachrüsten lassen.

Mischsysteme mit heterogenen und homogenen Komponenten haben dabei voraussichtlich das größte Potenzial.

Die dauerhafte Möglichkeit, eine gewünschte Produktqualität mithilfe von kontinuierlichen Fermentationsverfahren herzustellen, konnte in dieser Abhandlung bewiesen werden.

9 ANHANG

Alle Rohdaten zu den Einzelversuchen, sowie deren graphische Auswertungen werden im elektronischen Anhang (EA) dargestellt.

In diesem Kapitel werden lediglich die mathematischen Gleichungen, die in Tabelle 8, S. 55 beschrieben werden, pro abgebautem Grad Plato ($^{\circ}\text{P}$) dargestellt.

Dabei repräsentiert jede Kurve den Verlauf einer isothermen Temperatureinheit von 1°C . Der Abbaugrad [$^{\circ}\text{P}$] bezieht sich jeweils immer auf den durchschnittlichen initialen Stammwürzegehalt von $11,81^{\circ}\text{P}$.

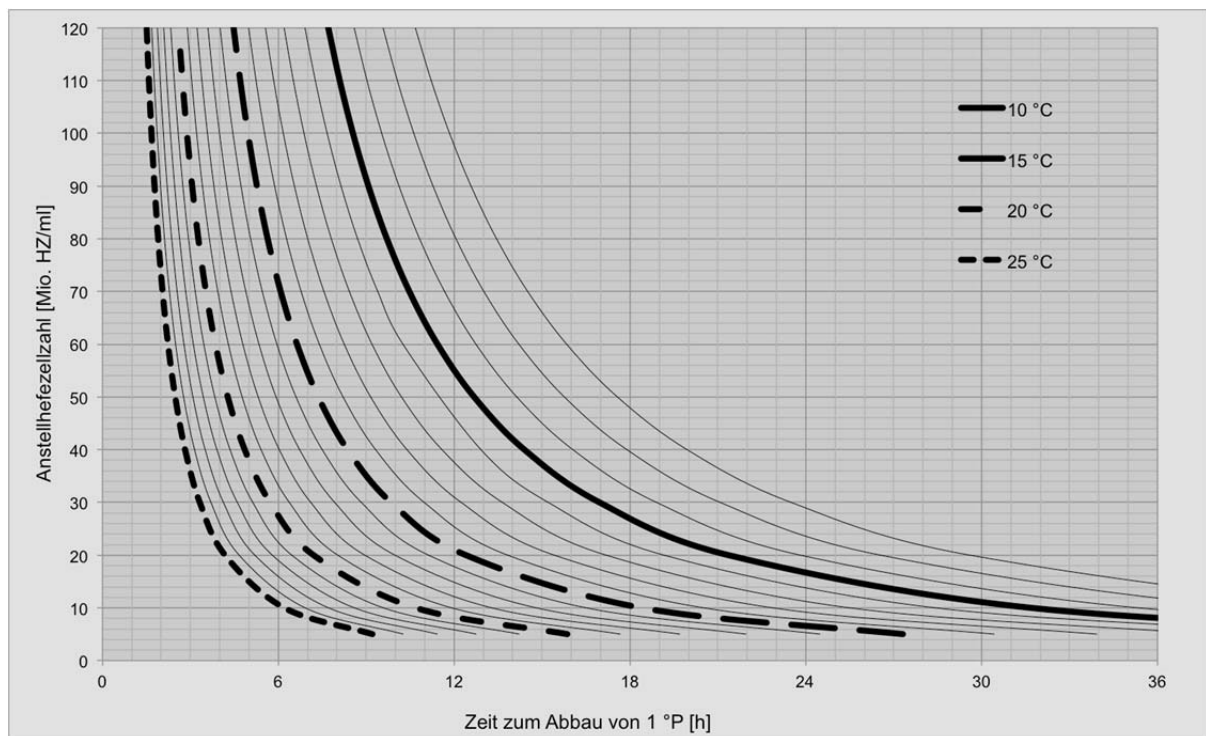


Abb. 87: 1°P Extraktreduktion ($11,8 \rightarrow 10,8^{\circ}\text{P}$) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

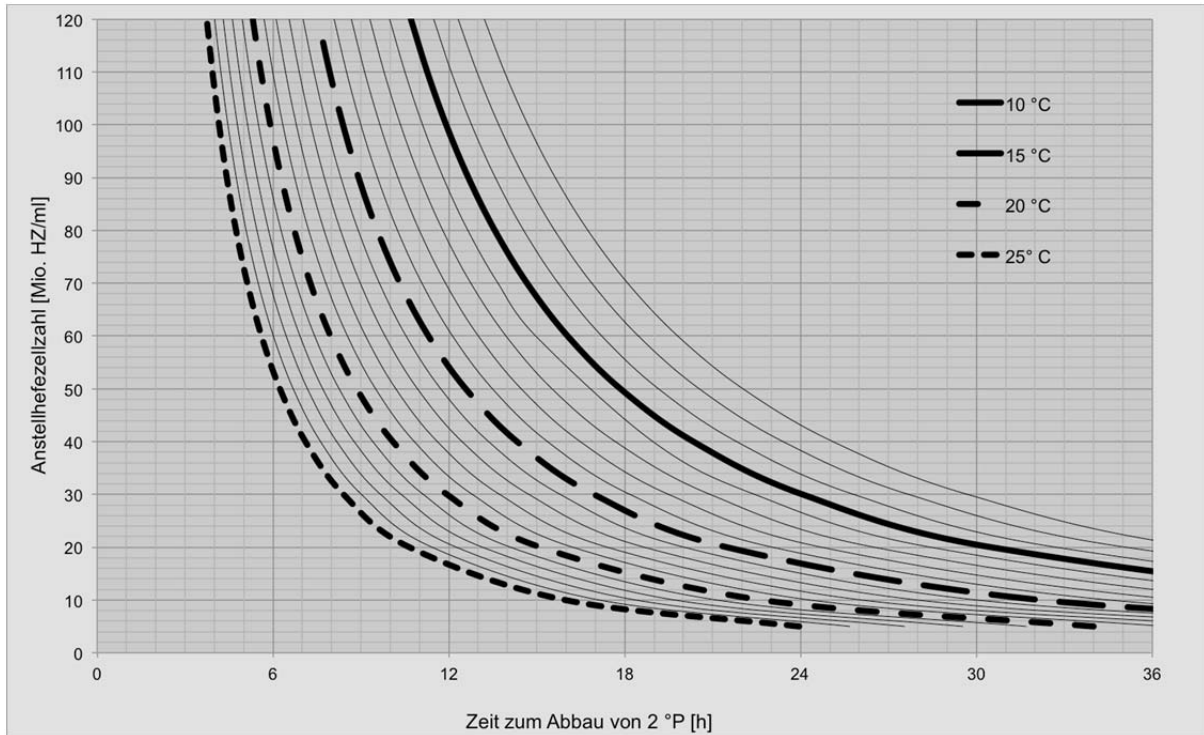


Abb. 88: 2 °P Extraktreduktion (11,8 → 9,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

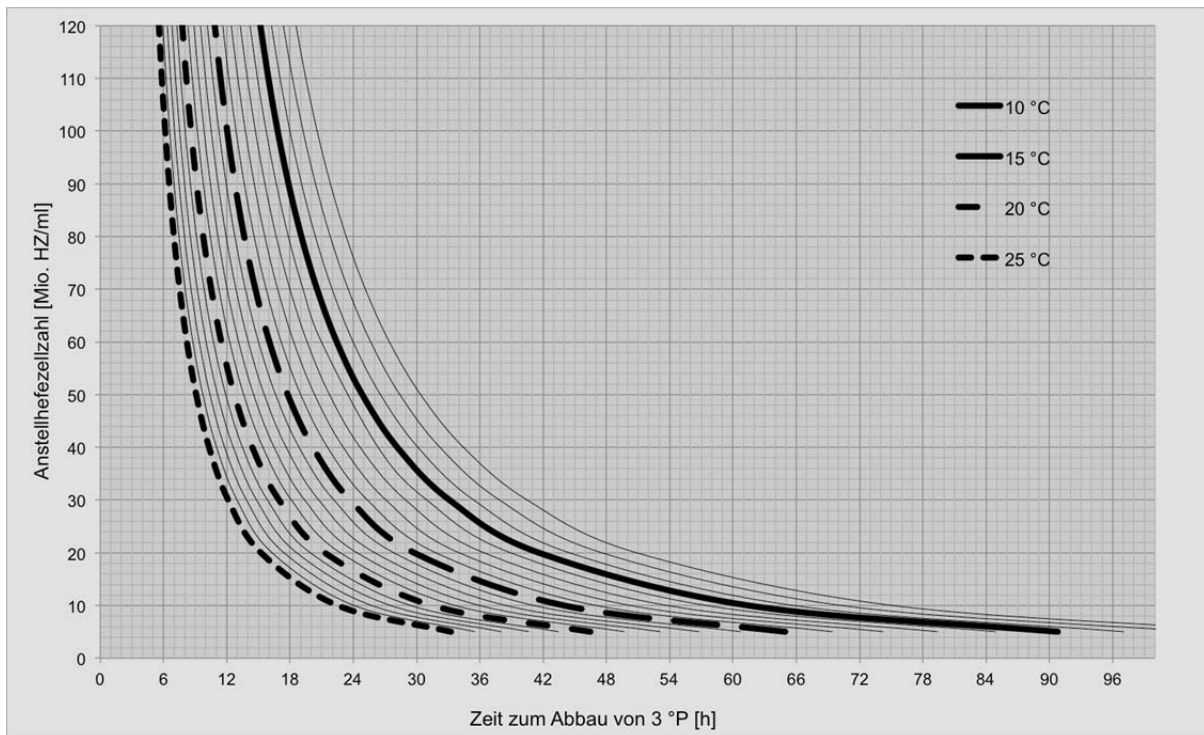


Abb. 89: 3 °P Extraktreduktion (11,8 → 8,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

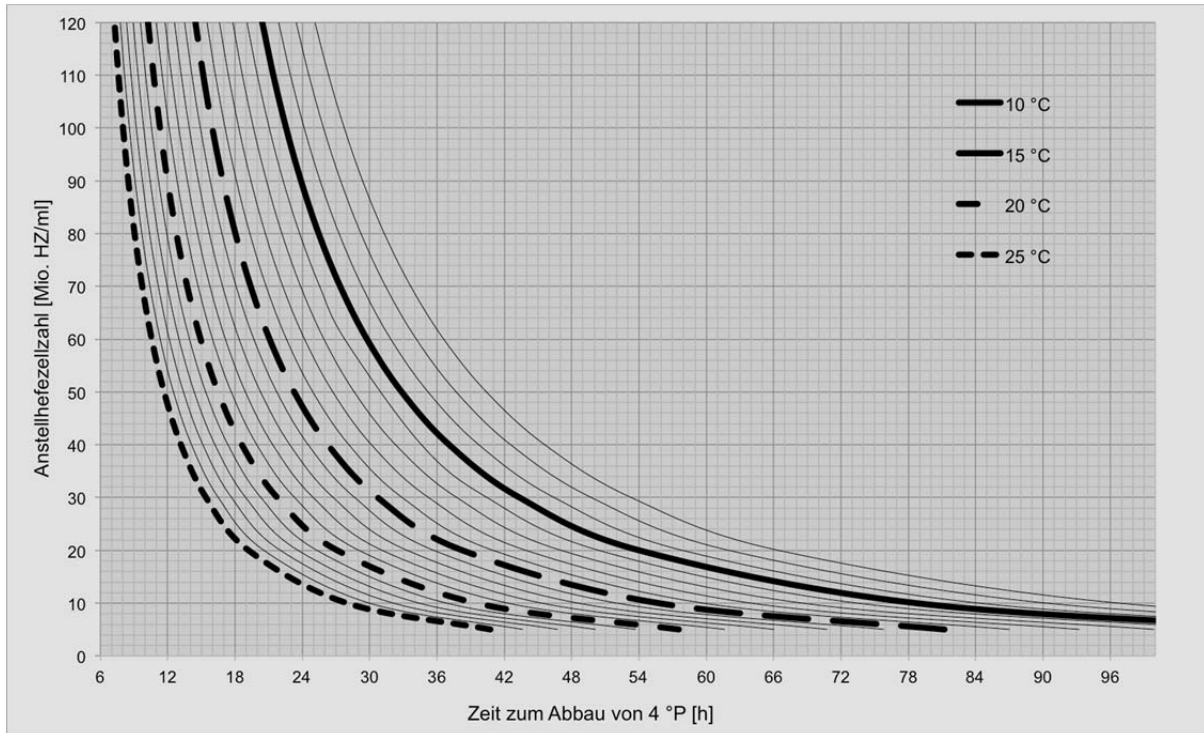


Abb. 90: 4 °P Extraktreduktion (11,8 → 7,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

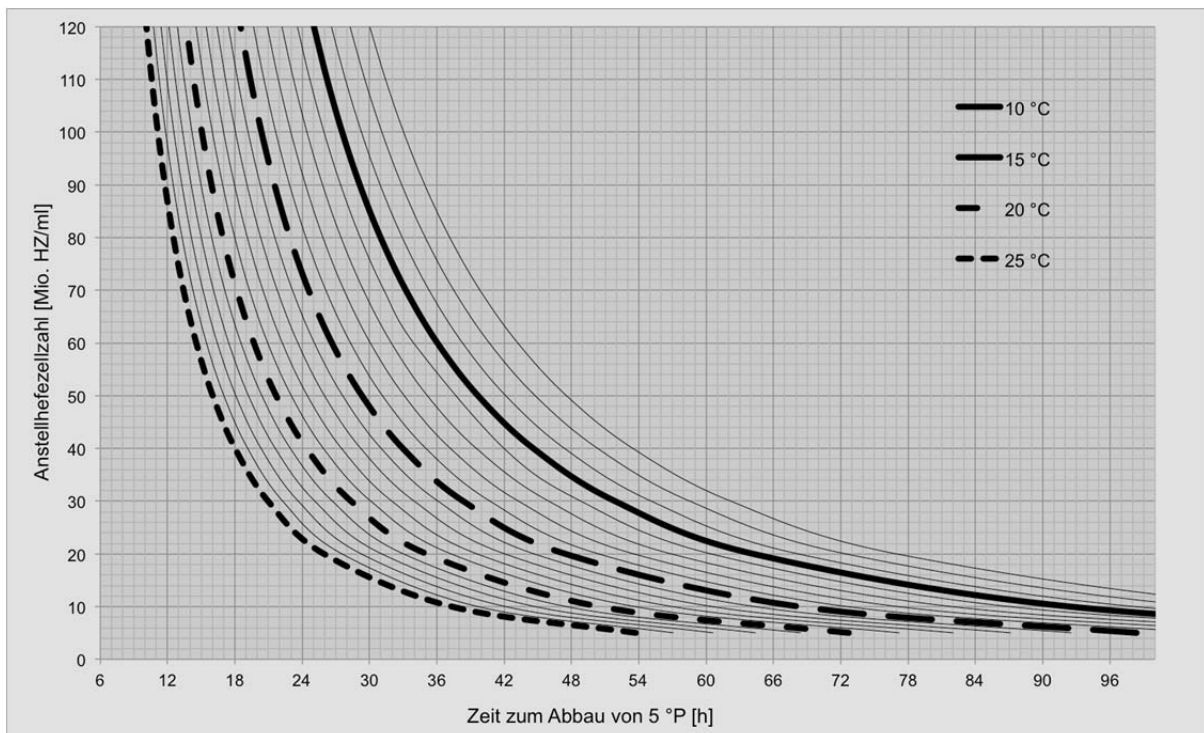


Abb. 91: 5 °P Extraktreduktion (11,8 → 6,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

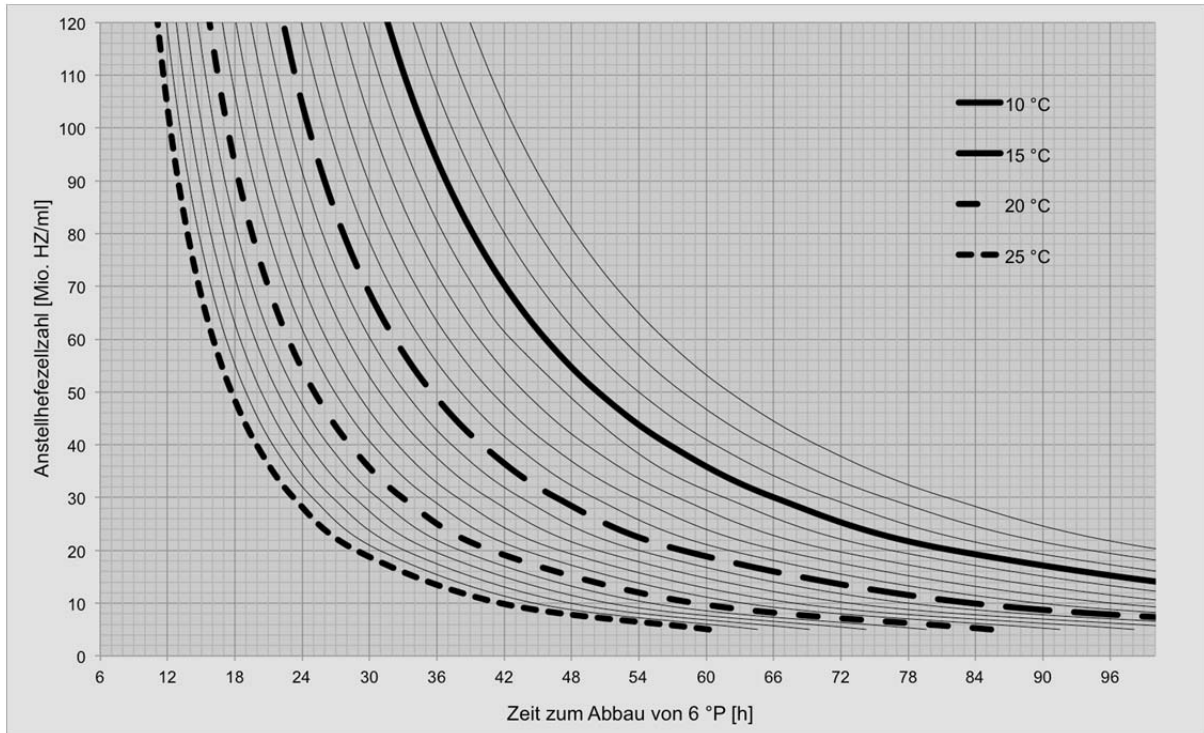


Abb. 92: 6 °P Extraktreduktion (11,8 → 5,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

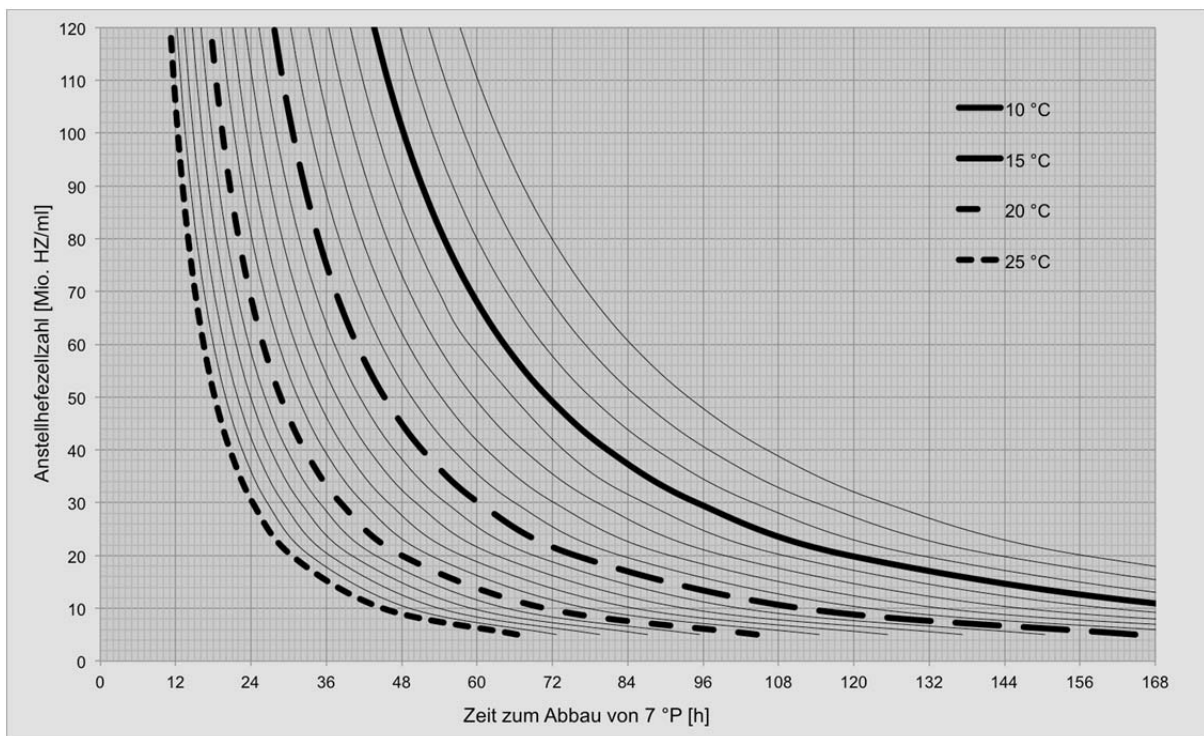


Abb. 93: 7 °P Extraktreduktion (11,8 → 4,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

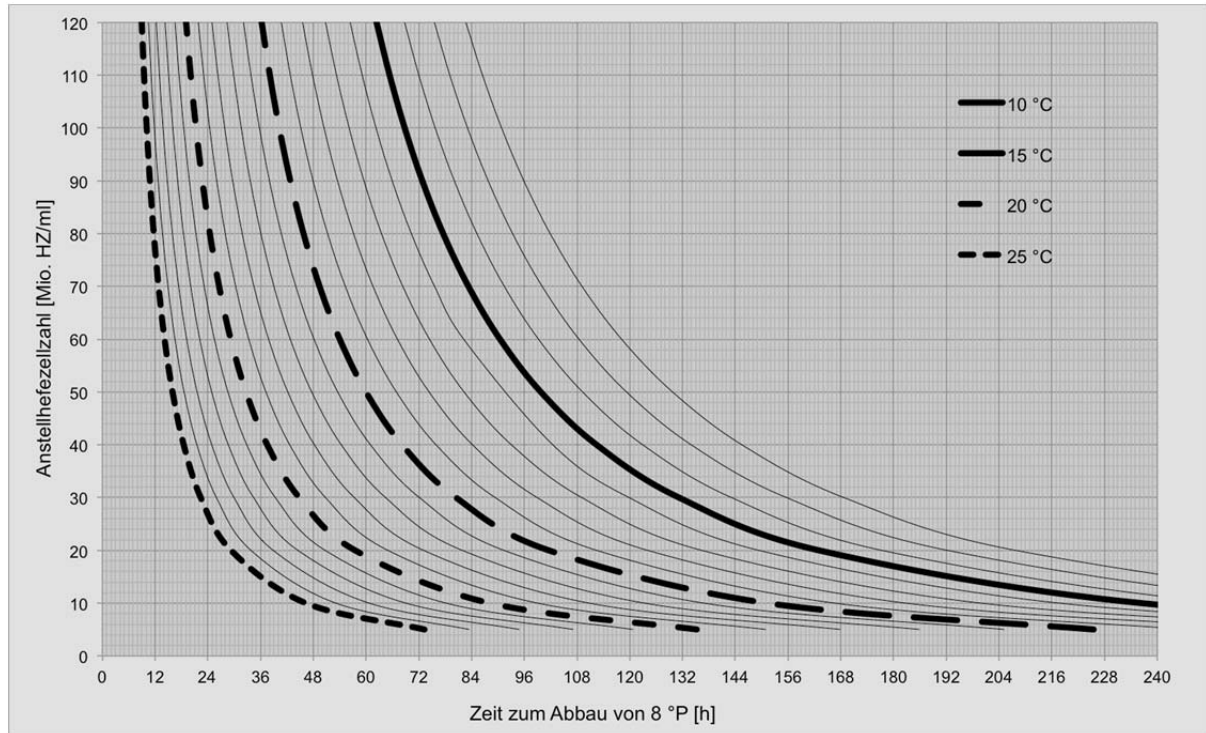


Abb. 94: 8 °P Extraktreduktion (11,8 → 3,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

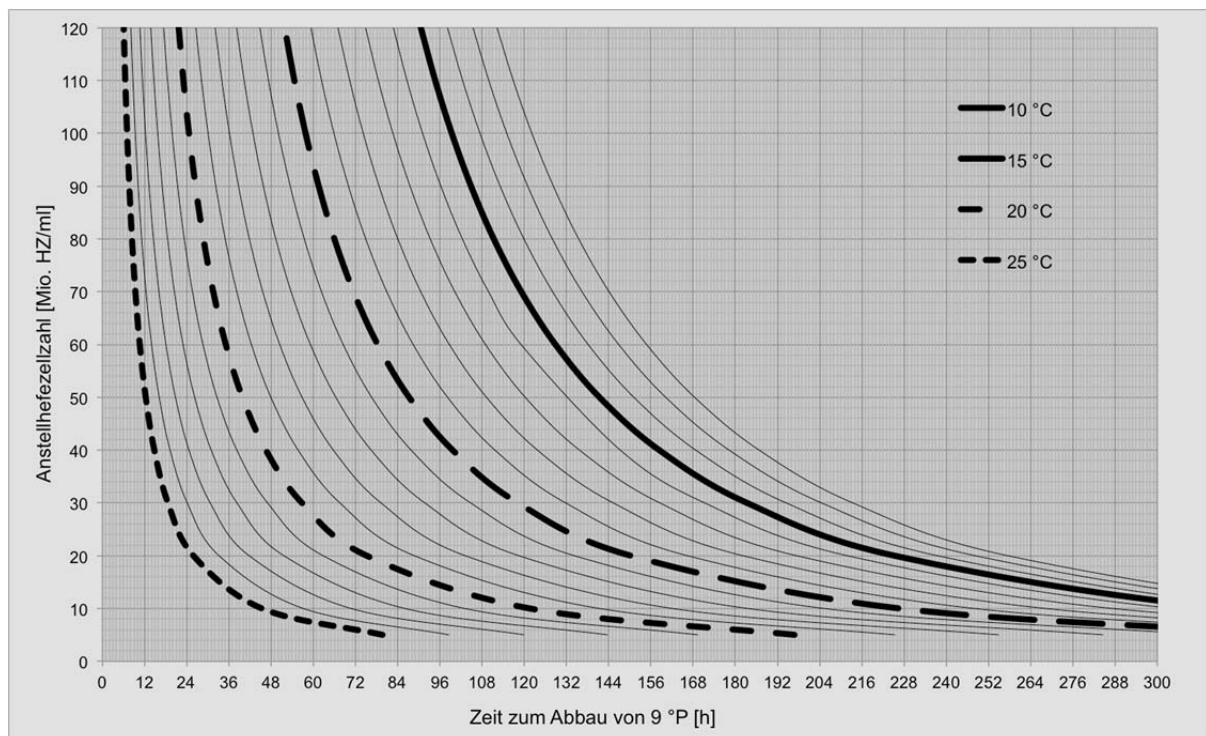


Abb. 95: 9 °P Extraktreduktion (11,8 → 2,8 °P) i. Abh. d. Anstellzellzahl und der Temp.

LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. Barbet, E.: *An improved manufacture of alcoholic spirits and apparatus therefore*, Britan, Patent: Brit. Pat. Nr. 16233, GB000189916233A, (28.04.1905).
2. Delbrück, M.: *Vortrag über Schnellgärung und das Arbeiten mit gefesselter Hefe*, Wochenschrift für Brauerei, 9, (1892), S. 695–699.
3. Thorne, R.S.W.: *Some observations on yeast mutations during continuous fermentation*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1968.tb03167.x), 74, 6, (1968), S. 516–524.
4. Portno, A.D.: *Continuous fermentation in the brewing industry – the future outlook*, Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph V, EBC Symposium: Fermentation and storage, (1978), Zoeterwoude, Holland, Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, S. 145–154.
5. Stewart, G.G., Russell, I.: *Centenary review. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry*, Journal of the Institute for Brewing and Distilling, 92, (1986), S. 537–558.
6. Kollnberger, P.: *Entwicklung von kontinuierlichen Bierherstellungsverfahren*, VLB Vorstudie, (1989).
7. Hyttinen, I., Kronlöf, J., Hartwall, P.: *Use of porous glass at Hartwall Brewery in the maturation of beer with immobilized yeasts*, European Brewery Convention, Monograph XXIV, Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, (1995), S. 65–66.
8. Pajunrn, E.: *The behaviour of immobilized yeast cells*, Cerevisia, 21, (1996), S. 33–37.
9. Van Dieren, B.: *Yeast metabolism and the production of alcohol free beer*, Nürnberg VHCG-F, European Brewery Convention, Monograph XXIV, Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, (1995), S. 65–66.
10. Virkajärvi, I.: *Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast*, [Dissertation], Helsinki University of Technology, (2001).
11. Sukatsch, D.A.: *Grundoperationen in der Fermentation*, Springer-Verlag, New York, Fermentation II, Rotenburger Symposium Bad Karlshafen, Fermentation. R.M. Lafferty (1981), S. 69–92.
12. Herbert, D.: *Continous culture of microorganisms*, Monograph No.12, (1961), S. 21–53.
13. Herbert, D.: *A theoretical analyses of continuous culture systems*, Continuous Culture of Microorganisms, Society of Chemical Industry, (1961), S. 21–53.
14. Portno, A.D.: *Continuous fermentation of brewer's wort*, Journal of the Institute of Brewing, London, 74, (1968), S. 55–63.
15. Portno, A.D.: *Theoretical and practical aspects of continuous fermentation*, Wallerstein Lab. Comm. 33, 112, (1970), S. 149–161.
16. Bryson, V., Szybalski, W.: *Microbial Selection, The Biological Laboratory*, Cold Spring Harbor NY, *Science* 116, (DOI: 10.1126/science.116.3003.45), (1952), S. 48–51.
17. Gerhardt, P., Bartlett, M.C.: *Advances in applied microbiology*, Academic Press Inc. New York and London, (1959), S. 215–260.
18. Monod, J.: *La technique de culture continue, theorie et applications*, Annales de l'Institut Pasteur, Paris, 79, (1950), S. 390–410.

19. Novick, A., Szilard, L.: *Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of Bacteria*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 36, (1950), S. 708–719.
20. Novick, A., Szilard, L.: *Description of the chemostat*, Science, 112, (1950), S. 715–716.
21. Novick, A., Szilard, L.: *Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria*, Eng. Communications, 48, (1951), S. 303–316.
22. Kulozik, U.M.: *Verfahrenstechnik kontinuierlicher Fermentationen – dargestellt am Beispiel der Milchsäure- und Biomassegewinnung im Rohrfermenter*, Technische Universität München, Habilitationsschrift, (1991).
23. Herbert, D.: *Some principles of continuous culture, recent progress in microbiology*, Stockholm, Wiksell, A., editor, Stockholm, (1959).
24. Monod, J.: *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann et Cie, Paris, (1942).
25. Bishop, L.R.: *A system of continuous fermentation*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1970.tb03279.x), 76, 2, (1970), S. 72–181.
26. Dummett, G.A.: *Modern brewing plant and process*, Brewers Guild Journal, 44, 8, (1958), S. 419–440.
27. Dummett, G.A.: *The engineering of continuous brewing*, Wallerstein Lab. Comm. 25, 86, (1962), S. 19–35.
28. Ehnström, L.K.J.: *Continuous production of wort. Various technical solutions and influence of most important process parameters*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 14, 3, (1977), S. 159–169.
29. Hough, J.S., Keevil, C.W., Marie, V., Philliskirk, G., Young, T.W.: *Continuous culture in brewing; 6 applications and new fields*, Dean, A.R., Ellwood, C.D., Evans, C.G.T., Melling, J., editor, Ellis Horwood Ltd., Chichester, (1976), S. 226–237.
30. Mac Donald, J., Reeve, P.T.V., Ruddlesden, J.D., White, F.H.: *Current approaches to brewery fermentations, progress in industrial microbiology*, Elsevier, Amsterdam, Bushell ME, Elsevier, Amsterdam, M. E. Bushell, (1984), S. 47–198.
31. Schaus, O.O.: *A simplified system for the continuous production of beer*, The Brewers Digest, 44, 9, (1969), S. 80–85.
32. Püspök, J.: *Der Einfluß einiger Gärbedingungen auf die Bierqualität*, Mitteilungen der Versuchsstation für das Gärungsgewerbe in Wien, 20, 1/2, (1966), S. 4–11.
33. Ricketts, R.W.: *Fermentation systems in modern brewing technology*, ed. Findlay WPK, Macmillan Press, London (1971), S. 83–119.
34. Schulze-Berndt, H.G.: *Kontinuierliche Verfahren in der Brauerei*, Tageszeitung für Brauerei, 13, 36/37, (1959), S. 308–316.
35. Smith, I.B.: *Yeast fermentation system: A review*, Brewers Guardian, 120, 3, (1991), S. 22–26.
36. Steward, G.G.: *Brewing and other industrial uses of yeast*, Advances in Applied Microbiology, 17, (1974), S. 233–266.
37. Steward, G.G.: *Some thoughts on the microbiological aspects of brewing and other industries utilizing yeast*, Advances in Applied Microbiology, 17, (1974), S. 233–264.
38. Woodland, L.R.: *Continuous fermentation and its potential application to the fermentation industry*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 4, 1, (1967), S. 125–131.

39. Maule, A.P., Thomas, P.D.: *Strains of yeast lethal to brewery yeasts*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1973.tb03515.x), 79, (1973), S. 137–141.
40. Müller-Auffermann, K., Thormann, J., Hutzler, M., Jacob, F.: *Fermentierte Getränke der Welt - Ein Überblick: Literaturliste*, Brauwelt, 30-31, (2013), S. 1–3.
41. Müller-Auffermann, K., Thormann, J., Hutzler, M., Jacob, F.: *Fermentierte Getränke der Welt - Ein Überblick; Teil 2: Cerealien- und pseudocerealienbasierte Getränke*, Brauwelt, 40-41, (2013), S. 1259–1263.
42. Müller-Auffermann, K., Thormann, J., Hutzler, M., Jacob, F.: *Fermentierte Getränke der Welt - Ein Überblick; Teil 3: Getränke aus anderen Rohstoffen*, Brauwelt, 42, (2013), S. 1322–1324.
43. Müller-Auffermann, K., Thormann, J., Hutzler, M., Jacob, F.: *Fermentierte Getränke der Welt - Ein Überblick; Teil 4: Auswertungsmöglichkeiten zu Marktforschungszwecken*, Brauwelt, 46-47, (2013), S. 1451–1452.
44. Müller-Auffermann, K., Thormann, J., Hutzler, M., Jacob, F.: *Fermentierte Getränke der Welt - Ein Überblick; Teil 1: Milch- und fruchtbasierte Getränke*, Brauwelt, 30-31, (2013), S. 902–905.
45. Masschelein, C.A., Andries, M.: *Future scenario of immobilized systems: Promises and limitations*, Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph XXIV EBC Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag: Nürnberg, (1995), S. 223–238.
46. Portno, A.D.: *Brewing Review*, 92, (1976), S. 170–175.
47. Okabe, M., Oda, A., Park, Y.S., Noguchi, K., Okamoto, T., Mitsui, S.: *Continuous beer fermentation by high cell density culture of bottom brewer's yeast*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 77, (1994), S. 41–45.
48. Zwietering, T.N.: *The degree of mixing in continuous flow systems*, Chemical Engineering Science, (DOI: 10.1016/0009-2509(59)80068-3), 11, (1959), S. 1–15.
49. Powell, E.O., Lowe, J.R., Malek, I., Beran, K., Hospodka, H.: *Theory of multi-stage continuous cultures*, Continuous Cultivation of Microorganisms, 2nd Int. Symposium, (1964), Prague, The publishing house of the Czechoslovak Academy of Sciences, S. 45–57.
50. Monbouquette, H.G.: *Models for high cell density bioreactors must consider biomass volumefraction: cell recycle example*, Biotechnology and Bioengineering, John Wiley & Sons, Inc., (DOI: 10.1002/bit.260290906), 29, (1987), S. 1075–1080.
51. Van De Winkel, L., Van Beveren, P.C., Borremans, E., Goossens, E., Masschelein, C.A.: *High performance immobilized yeast reactor design for continuous beer fermentation*, Proceedings of the 24th Congress of the European Brewery Convention, (1993), Oslo, RL Press: Oxford; S. 307–314.
52. Virkajärvi, I., Kronlöf, J.: *Longterm stability of immobilized yeast columns in primary fermentation*, Journal of American Society for Brewing Chemists, (DOI: 10.1094/ASBCJ-56-0070), 56, 2, (1998), S. 70–75.
53. Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashihara, T., Nakanishi, K.: *Beer brewing using an immobilized yeast bioreactor design of an immobilized yeast bioreactor for rapid beer brewing system*, Journal of Fermentation and Bioengineering, (DOI: 10.1016/0922-338X(94)90044-2), 78, 6, (1994), S. 443–449.
54. Ryder, D., Masschelein, C.A.: IRL Press O, *Immobilized yeast in brewing - A current review*, Proceedings of the 27th Congress of the European Brewery Convention, (1991), Cannes, France, S. 345–352.

55. Hilge–Rotmann, B., Rehm, H.J.: *Relationship between fermentation capability and fatty acid composition of free and immobilized Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology, Springer–Verlag, (DOI: 10.1007/BF00180578), 34, (1991), S. 502–508.
56. Kronlöf, J., Härkönen, T., Hartwall, P., Home, S., Linko, M.: *Main fermentation with immobilized yeast*, Proceedings of the 22nd European Brewing Convention Congress, (1989), Zurich, IRL Press: Oxford; S. 355–362.
57. Morrison, K., Suggett, A.: *Yeast handling, petite mutants and lager flavour*, Journal of the Institute of Brewing, London, 89, (1993), S. 141–142.
58. Van Iersel, M.F.M., Brouwer-Post, E., Rombouts, F.M., Abee, T.: *Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcoholfree beer*, Enzyme and Microbial Technology, (DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00140-X), 26, 8, (2000), S. 602–607.
59. Virkajärvi, I.: *Profiting from immobilized fermentation*, Proceedings of the Fifth Aviemore Conference of Malting, Brewing and Distilling, Aviemore, London: Institute of Brewing, (1999), S. 290–293.
60. Virkajärvi, I., Pohjala, N.: *Primary fermentation with immobilized yeast: some effects of carrier materials on the flavour of the beer*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.2000.tb00071.x), 106, 5, (2000), S. 311–318.
61. Willaert, R., Nedovic, V., Baron, G.V.: *Physiology of immobilised microbial cells*, Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology, Neatherlands, Nedovic V, Willaert, R. editor, Neatherlands, Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, (2004), S. 469–492.
62. Yamauchi, Y., Kashihara, T., Murayama, H., Nagara, A., Okamoto, T., Yoshida, M., Mawatari, M.: *Scale up of immobilized yeast bioreactor for continuous fermentation of beer*, Technical Quaterly of the Master Brewers Association of Americas, 31, 3, (1994), S. 90–94.
63. Maschelein, C.A., Vanderbussche, J.: *Current outlook and future prospectives for immobilized cell technology in brewing industry*, Brewers Guardian, (1999), S. 33–45.
64. Mensour, N.A., Magaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russel, I.: *New developments in the brewing industry using immobilized yeast cell bioreactor systems*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1997.tb00965.x), 103, 6, (1997), S. 363–370.
65. Norton, S., D'Amore, T.: *Physiological effects of yeast immobilization: Applications for brewing*, Enzyme and Microbial Technology, (DOI: 10.1016/0141-0229(94)90150-3), 16, 5, (1994), S. 365–375.
66. Pilkington, P.H., Magaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I.: *Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review*, Journal of the Institute of Brewing, London, 104, (1997), S. 19–31.
67. Narziß, L., Hellich, P.: *Ein Beitrag zur wesentlichen Beschleunigung der Gärung und Reifung des Bieres*, Brauwelt, 111, 67, (1971), S. 1491–1500.
68. Narziß, L., Hellich, P.: *Rapid fermentation and maturing of beer by means of the bio-reactor*, The Brewers Digest, 47, 9, (1972), S. 106–118.
69. Dembowski, K.: *Untersuchungen zur kontinuierlichen Biergärung am Beispiel des Gärfilterverfahrens*, Technische Universität München, Dissertation (1992).
70. Dembowski, K., Narziß, L., Miedaner, H.: *Technologisch optimierte Bierherstellung im Festbettfermenter bei sehr kurzer Produktionszeit*, Proceedings of the 24th Congress of the European Brewery Convention, (1993), Oslo, IRL Press, Oxford, S. 299–306.

71. Baker, D.A., Kirsop, B.H.: *Rapid beer production and conditioning using a plug fermentor*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1973.tb03570.x), 79, 6, (1973), S. 487–494.
72. Nakanishi, K., Onaka, T., Kubo, S.: *A new immobilized yeast reactor system for rapid production of beer*, Proceedings of the 20th Congress of the European Brewery Convention, IRL Press O, (1985), Helsinki, S. 152–157.
73. Yamauchi, Y., Kashihara, T.: *Kirin immobilized system*, Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph XXIV EBC Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Verlag Hans Carl Getränke–Fachverlag N, (1995), Espoo, Finland, S. 99–117.
74. Inoue, T.: *Development of a two-stage immobilized yeast fermentation system for continuous beer brewing*, Proceedings of the 25th Congress of the European Brewery Convention, (1995), Brussels, S. 25–36.
75. Dervakos, G.A., Webb, C.: *On the merits of viable cell immobilisation*, Biotechnology Advances, (DOI: 10.1016/0734-9750(91)90733-C), 9, (1991), S. 559–612.
76. Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncellet, D., Neufeld, R.J.: *Immobilization of cells for application in the food industry*, Critical Reviews in Biotechnology, (DOI: 10.3109/07388559409086963), 14, 2, (1994), S. 75–107.
77. Kronlöf, J.: *Immobilized yeast in continuous fermentation of beer*, Technical Research Center of Finland, VTT Publicarions 167, 96, (1994), S. 47.
78. Masschelein, C.A., Ryder, D.S., Simon, J.P.: *Immobilized cell technology in beer production*, Critical Reviews in Biotechnology, (DOI: 10.3109/07388559409086966), 14, 2, (1994), S. 155–177.
79. Moll, M., Duteurtre, B.: *Fermentation and maturation of beer with immobilized yeast*, Brauwelt International, (1996), S. 248–525.
80. Mensour, N.A., Magaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russel, I.: *"Gas lift" systems for immobilized fermentations*, Verlag Hans Carl Getränke– Fachverlag N, Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph XXIV EBC Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, Finnland, (1995), S. 125–132.
81. Mensour, N.A., Magaritis, A., Briens, C.L., Pilkington, H., Russel, I.: *Application of immobilized yeast cells in the brewing industry*, Science E, *Immobilized Cells: Basics and Applications*, Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Tramper, J., (1996), S. 661–671.
82. Pilkington, P.H., Magaritis, A., Mensour, N.A., Sobczak, J., Hancock, I., Russell, I.: *Kappa-carrageenan gel immobilization of lager brewing yeast*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00032.x), 105, 6, (1999), S. 398–405.
83. Van de Winkel, L., McMurrough, I., Van Beveren, P.C., Masschelein, C.A.: *Pilot scale evaluation of silicon carbide yeast systems for continuous alcoholfree beer production* Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph XXIV EBC Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, (1995), Espoo, Finland, S. 90–98.
84. Andries, M., Van Beveren, P., Goffin, O., Masschelein, C.: *Design of a multipurpose immobilized yeast bioreactor system for application in the brewing process*, Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph XXIV EBC Symposium: Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, (1995), Espoo, Finland, Verlag Hans Carl Getränke–Fachverlag, Nürnberg, S. 134–144.

85. Andries, M., Van Beveren, P., Goffin, O., Rajatte, P., Masschelein, C.: *First results on semi-industrial continuous top fermentation with Meura-Delta immobilized yeast fermentor*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 34, 2, (1997), S. 119–122.
86. Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D., Stassi, P.: *Immobilized yeast bioreactor for continuous beer fermentation*, Biotechnol. Prog., (DOI: 10.1021/bp980109z), 15, 1, (1999), S. 105–113.
87. Wackerbauer, K., Fitzner, M., Lopsien, M.: *Untersuchungen mit neuen MPI-Bioreactor-System*, Brauwelt, 46/47, (1996), S. 2250–2256.
88. Rajotte, P.: *Continuous fermentation with immobilized yeast cells*, American Brewer, 76, (1998), S. 42–43.
89. Maeba, H., Unemoto, S., Sato, M., Shinotsuka, K.: *Primary fermentation with immobilized yeast in porous chitosan beads. Pilot Scale Trial*, 26th Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section), (2000), Singapore, S. 82–86.
90. Shindo, S., Sahara, S., Watanabe, N., Koshino, S.: *Control of diacetyl precursor (alpha-acetolactate) formation during alcohol fermentation with yeast cells immobilized in alginate fibers with double gel layers*, Journal of Fermentation and Bioengineering, (DOI: 10.1016/0922-338X(93)90008-V), 76, 6, (1993), S. 199–202.
91. Shindo, S., Murakami, J., Koshino, S.: *Control of acetate ester formation during alcohol fermentation with immobilized yeast*, Journal of Fermentation and Bioengineering, (DOI: 10.1016/0922-338X(92)90281-X), 73, 5, (1992), S. 370–374.
92. Andersen, K., Bergin, J., Ranta, B., Viljava, T.: *New process for continuous fermentation of beer*, Proceedings of the 27th Congress of the European Brewery Convention, IRL Press O, (1999), Cannes, S. 771–778.
93. Pajunen, E., Ranta, B., Andersen, K., Lommi, H., Viljava, T., Bergin, J., Guercia, H.: *Novel process for beer fermentation with Immobilized yeast*, Proceedings of the 26th Convention Institute of Brewing Australia and New Zealand Section, (2000), Singapore, S. 91–94.
94. Pajunen, E., Viljava, T., Lommi, H.O.: *Novel primary fermentation with immobilized yeast system*, World Brewing Congress, (2000), Orlando.
95. Virkajärvi, I., Linko, M.: *Immobilization: A revolution in traditional brewing*, Naturwissenschaften, Springer Verlag, (DOI:10.1007/s001140050583), 86, 3, (1999), S. 112–122.
96. Virkajärvi, I., Lindborg, K., Kronlöf, J., Pajunen, E.: *Effects of the aeration on flavour compounds in immobilized primary fermentation*, Monatschrift für Brauwissenschaft, 52, 1/2, (1999), S. 9–12, 25–28.
97. Virkajärvi, I., Vauhkonen, T., Stogards, E.: *Control of microbial contamination in continuous primary fermentation by immobilized yeast*, Journal of American Society for Brewing Chemists, (DOI: 10.1094/ASBCJ-59-0063), 59, 2, (2001), S. 63–68.
98. Beetz, R.: *Kontinuierliche Gärung und Schnellgärung*, TU-München, Dissertation, (1967).
99. Hospodka, J.: *Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms*, Academic Press, New York, London, Malek J, Fencel, Z., editor, Academic Press, New York, London, (1966), S. 493–645.
100. Hough, J.S.: *Efficiency of fermentation in yeast*, EBC Proceeding, (1961), S. 160–171.
101. Hough, J.S.: *Estimation of the age of cells in a population of yeast*, Journal of the Institute of Brewing, London, 67, 11,12, (1961), S. 494–495.

102. Hough, J.S., Ricketts, R.W.: *Improvements in or relating to continuous brewing*, Great Britan, Patent: GB926906 (A), Erteilt: 22.05.1963, (1960).
103. Kleber, W.: *Mechanisierung, Automatisierung und kontinuierliche Verfahren in Mälzerei und Brauerei*, Brauwelt 102, 58/59, (1962), S. 1117–1140.
104. Beubler, A., Wassmuth, W.: *Eine moderne Anlage zur Herstellung von Bier nach einem kontinuierlichen Verfahren*, Chemische Technik, 24, 8, (1972), S. 498–501.
105. Lietz, P., Singer, G., Markgraf, K., Röser, G., Schmidt, M., Waßmuth, W.: *Anlage zur mehrstufigen kontinuierlichen Gärung und Reifung von Lagerbier*, Patent: DD83543 (A), (22.12.1969).
106. Vetter, D.R.: *Die kontinuierlich arbeitende Brauerei Gotha*, Lebensmittelindustrie, 21, 2, (1974), S. 73–5.
107. Hough, J.S., Rudin, A.D.: *Improvements in or relating to the brewing of beer*, Brit. Pat, Patent: GB863708 (A), Erteilt: 22.03.1961, (1957).
108. Hough, J.S., Rudin, A.D.: *Experimental production of beer by continuous fermentation*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1958.tb01404.x), 64, 5, (1958), S. 404–410.
109. Hough, J.S., Rudin, A.D.: *Beer production by continuous fermentation*, Brewers Guild Journal, 45, (1959), S. 289–301.
110. Hough, J.S., Rudin, A.D.: EBC Proceeding, (1959), S. 208–216.
111. Stewart, E.D., Laufer, S.: *Continuous fermentation in the brewing industrie*, 5. American Brewer, 93, 40, (1960), S. 40–48.
112. Parsons, R.: *Continuous fermentation. A review*, Brewers Guardian, 92, 5, (1963), S. 17–23.
113. Ramsden, R., Williams, R.P.: *A process and apparatus for the continuous brewing of beer*, Britan, Patent: GB943091 (A), Erteilt: 27.11.1963, (04.05.1960).
114. Ramsden, R., Williams, R.P.: *Continuous fermentation process and apparatus for beer production*, Britan, Patent: GB926847 (A), Erteilt: 22.05.1963, (28.03.1960).
115. Williams, R.P.: *A system of continous fermentation*, The Brewers Digest, 36, 4, (1961), S. 56–57.
116. Ash, M.E.: *Continuous fermentation process with sedimentable microorganisms*, USA, Patent: US000003227557A, (04.01.1966).
117. Geiger, K.H., Compton, J.C.: *Continuous fermentation process*, USA, Patent: US2967107 (A), Erteilt: 03.01.1961, (04.03.1957).
118. Geiger, K.H., Compton, J.C.: *Continuous fermentation process*, Canada, Patent: CA545867 (A), Erteilt: 10.09.1957, (16.05.1957).
119. Geiger, K.H.: *Advanced brewing methods – fermentation phase*, Technical Proceedings 74th Anniversary Convention of the Master Brewers Association of Americas, (1961), S. 8–14.
120. Green, R.: *Past and current aspects of continuous beer fermentation processes*, Communications of the Wallerstein Laboratories, 25, 88, (1962), S. 337– 347.
121. Purssell, A.J.R., Smith, M.J.: *Continuous Fermentation*, Proceedings of the 11th Congress of the European Brewery Convention, (1967), Madrid, S. 155–165.
122. Portno, A.D.: *New systems of continuous fermentation by yeast*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1967.tb03017.x), 73, 1, (1967), S. 43–50.

123. Portno, A.D.: *Vorrichtung zum kontinuierlichen Vergären von Bierwürze*, Patent: DE000001642584B, (11.04.1967).
124. Coutts, W.M., Ricketts, J., Selkirk, R.C.: *Characteristics of beer made from stabilized wort*, Technical Proceedings 68th Anniversary Convention of the Master Brewers Association of Americas (1955).
125. Coutts, M.W.: *Verfahren zur kontinuierlichen Koagulation und Entfernung von Heiss- und Kalttrub aus gehopfter Bierwürze*, Patent: DE000001204173B, (12.01.1961).
126. Coutts, M.W.: *An improved process for the manufacture of beer and the like*, Australien, Patent: Austr. Nr. 216618, (08.08.1958).
127. Coutts, M.W.: *A continuous process for the production of "beer"*, Patent: GB872391 (A), Erteilt: 07.12.1961, (26.07.1957).
128. Coutts, M.W.: *The many facets of continuous fermentation*, 9th Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section), (1966).
129. Miedaner, H.: *Kontinuierliche Gärung, Aktuelle Brautechnik*, Brauwelt, 127, 40, (1987), S. 1787–1789.
130. Otto, W.S.: *Die Praxis der kontinuierlichen Gärung*, The Brewers Digest, 43, 5, (1968), S. 84–88.
131. Stewart, E.D.: *Continuous fermentation in the brewing industry*, American Brewer, 92, 3, (1959), S. 37–42.
132. Cauwe, Y., Lethielleux, D.: *Ein besonderes System der kontinuierlichen Gärung und seine Anwendungen in der Brauerei*, Brauwelt, 108, 15, (1968), S. 217–222.
133. Lefrancois, I.: *Fermenteurs de grande capacité*, II Intern. Symposium d. Gärungsindustrie, Leipzig, (1968), S. 503–509.
134. Portno, A.D.: *Fermentation in a progressive continuous system*, Journal of the Institute of Brewing, London, 75, (1969), S. 468–471.
135. Hudson, J.R., Button, A.H.: *Proceedings of the 10th Congress of the European Brewery Convention*, (1965), Stockholm, S. 121–128.
136. Hudson, J.R., Button, A.H.: *A novel pilot brewery*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1968.tb03130.x), 74, 3, (1968), S. 300–304.
137. Karseh, W.: *Fermentation process*, Patent: US2155134 (A) Erteilt: 18.04.1939, (05.12.1935).
138. Karseh, W.: *Fermentation process*, Patent: US2155134 (A), Erteilt: 18.04.1939, (18.04.1939).
139. Scholler, H., Eickenmeyer, R.: *Method of fermenting solutions and producing yeast*, Patent: US2083347 (A), Erteilt: 08.06.1937, (1937).
140. Button, A.H.: *Continuous and rapid batch processes*, Brewers Guardian, 99, 7, (1970), S. 50–57.
141. Dietrich, K.R.: *Der Entwicklungsstand des kontinuierlichen Brauverfahrens*, Brauwelt, 103, 14/15, (1963), S. 197–203.
142. Alfa-Laval: *Production of volatile organic compounds by continuous fermentation*, Patent: DE2903273 (A1), Erteilt: 30.01.1975, (29.01.1979).
143. Dellweg, H., Offer, G., Engelbart, W.: *Continuous mash fermentation process – using a fermenter with internal shaft tapered to produce air lift actuated circulation*, Patent: DE2354556 (A1), Erteilt: 07.05.1975, (29.10.1973).
144. Gorbach, G.: *Method of an apparatus for continuous fermentation*, Patent: DE1767319 (A1), Erteilt: 25.11.1971, (25.04.1968).

145. Denshchikov, M.T.: *Development of apparatus for continuous beer fermentation*, Continuous Cultivation of Microorganisms, Symposium, Prag, (1962), S. 221–233.
146. Jonas, V., Koran, V.: *Gärbottich für kontinuierliche Gärung in Flüssigkeiten*, Germany, Patent: DE1015761 (B), Erteilt: 19.09.1957, (23.09.1955).
147. Bold, F.: *Verfahren und Einrichtung zum kontinuierlichen Gären von Bierwürze zu Bier*, Patent: DBP Nr. 1517801, DE000001517801A (25.08.1966).
148. Powell, E.O., Lowe, J.R.: *Theory of multistage continuous culture. Continuous cultivation of microorganisms*, Continuous Cultivation of Microorganisms, a Symposium, Prag, (1962), S. 56–57.
149. Dyr, J., Krumphanzl, V.: *Continuous alcohol fermentation in a new apparatus of the vertical type*, Continuous Cultivation of Microorganisms, a Symposium, Prag (1962), S. 199–203.
150. Alzola, F.: *Apparatus for continuous fermentation*, Patent: US2450218 (A), Erteilt: 28.09.1948, (05.09.1946).
151. Moser, A.: *Continuous wort fermentation - in tubular fermentation system with thin layer plug flow*, Patent: DE2261238 (A1), Erteilt: 20.06.1974, (14.12.1972).
152. Huppmann, F.H.L.: *Apparatus for the continuous fermentation and curing of beer*, Patent: US000003407722A, (29.10.1968).
153. Deger, H.M., Dorsemagen, B., Hofer, N., Wöhner, G.: *Process for the continuous fermentation of aqueous slurries for the production of alcohol and yeast biomass*, Patent: US4346113 (A), Erteilt: 24.08.1982, (24.08.1982).
154. APV Company L.: *Vorrichtung zum kontinuierlichen Vergären von Würze*, Patent: DE1209088 (B), Erteilt: 20.01.1966, (03.02.1961).
155. APV Company L.: *An improved brewing process, and apparatus therefore*, Patent: GB938173 (A), Erteilt: 02.10.1963, (04.02.1960).
156. APV Company L.: *Vorrichtung zum kontinuierlichen Vergären von Würze*, Patent: DE1207324 (B), Erteilt: 23.12.1965, (24.11.1961).
157. APV Company L.: *Method of and apparatus for continuous filtration of brewers' mash*, Patent: GB929835 (A), Erteilt: 26.06.1963, (1958).
158. APV Company L.: *Improvements in the filtration of brewers' mash*, Patent: GB951656 (A), Erteilt: 11.03.1964, (1960).
159. APV Company L.: *Improvements in the filtration of brewers' mash*, Patent: GB940239 (A), Erteilt: 30.10.1963, (1961).
160. Ault, R.G., Hampton, A. N., Newton, R., Roberts, R.H.: *Biological and biochemical aspects of tower fermentation*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1969.tb03211.x), 75, (1969), S. 260–277.
161. Blanken, J.G.: *The tower fermenter for larger production*, Brewers Guardian, 103, 10, (1974), S. 35–39.
162. Bruens, L.J.: *Continuous fermentation and the tower fermenter*, Technical Quaterly of the Master Brewers Association of Americas, 3, 4, (1966), S. 248–252.
163. Klopper, W.J., Ault, R.G., Roberts, R.H., Royston, M.G.: *Continuous fermentation in a tower fermenter*, Proceedings of the 10th Congress of the European Brewery Convention, (1965), Stockholm, S. 238–259.
164. Rieketts, R.W.: *Review of fermentation systems*, Brewers Guardian, 99, 7, (1970), S. 44–48.
165. Roberts, R.H.: *Brewers Guild Journal* 53, 5, (1967), S. 242–248.

166. Royston, M.G.: *Tower fermentation of beer*, Process Biochemistry, 1, 4, (1966), S. 215–222.
167. Seddon, A.W.: *Continuous fermentation in a tower*, The Brewer, 62, 737, (1976), S. 72–78.
168. Morris, G.G., Smith, E.L., Greenshields, R.N.: *Aeration in tower fermenters containing microorganisms*, Biotechnology and Bioengineering Symposium, No.4, (1973), S. 535.
169. Alfa-Laval: *Verfahren zum Durchführen kontinuierlicher Gärung*, Patent: DE2426120 (A1), Erteilt: 20.01.1975, (29.05.1974).
170. Kahler, M.: *Continuous fermentation*, Kvasny Prumysl, Czech 9, 5, (1963), S. 113–116.
171. Hall, R.D., Howard, G.A.: *Improvements in or relating to brewing of beer*, Patent: GB979491 (A), Erteilt: 06.01.1965, (06.01.1965).
172. Hall, R.D., Fricker, R.: *Continuous brewing*, Proceedings of the 9th Convention of the Australian Institute of Brewing, (1966), S. 45–79.
173. Hall, R.D., Howard, G.A.: *Continuous stream brewing process employing permeable yeast plug*, Patent: US3407069 (A) Erteilt: 22.10.1968, (1968).
174. Bosewitz, G., Ehlies, H., Dickscheidt, R., Lietz, P.: *Method and apparatus for continuous fermentation and maturing of beer wort*, Patent: DBP Nr. 1923593, GB000001262186A, (08.05.1969).
175. Hlaváček, F.: *Brauereihefen. Biologie und Biochemie der Hefezellen- Die Gärung in der Brauerei; Verwertung des Nebenproduktes Hefe*, (DOI: 10.1002/food.19630070114), VEB Fachbuchverlag, Leipzig, (1961).
176. Harris, J.O., Watson, W.: *Observations on some beer spoilage lactobacilli*, Patent: Brit. Pat. Nr. 11498/70, (1960).
177. Coutts, M.W.: *Verfahren zur halbkontinuierlichen oder kontinuierlichen Vergärung von Bierwürze*, Patent: DE1201795 (B), Erteilt: 30.09.1965, (02.08.1957).
178. Danckwerts, P.V.: *The effect of incomplete mixing on homogenous reactions*, Chemical Engineering Science, 8, (1958), S. 93–102.
179. Hough, J.S., Button, A.H.: *Continuous Brewing*, Progress in industrial microbiology, 11, (1972), S. 89–132.
180. Williamson, A.G., Brady, J.T.: *Development and operation of commercial continuous brewery*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 2, 1, (1965), S. 79–84.
181. Bishop, L.R.: *Brewing present and future*, Proceedings of the 11th Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section), (1970), Hobart, Australia, S. 113–116.
182. Whitear, A.L.: *The Laurence Bishop Silver Medal Inaugural Lecture. The Impact of Scientific Measurement on the Brewing Process*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1991.tb01053.x), 97, (1991), S. 47–51.
183. Dunbar, J., Campbell, S.L., Banks, D.J., Warren, D.R.: *Methabolic aspects of a commercial continuous fermentation system*, 20th Convention of the Institute of Brewing (Australia and New Zealand Section), (1988), Brisbane, Australia, S. 151–158.
184. Gibson, B., Lawrence, S., Leclaire, J., Powell, E.O., Smart, K.: *Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling*, FEMS Microbiology reviews, 31, (2007), S. 535–569.

185. Sreward, G.G.: *Fermentation - yesterday, today and tomorrow*, Technical Quaterly of the Master Brewers Association of Americas, 14, 1, (1977), S. 1–15.
186. Lüers, H.: *Die wissenschaftlichen Grundlagen von Mälzerei und Brauerei*, Verlag Hans Carl, Nürnberg (1950).
187. Slator, A.: *Studies in fermentation. I. The chemical dynamics of alcoholic fermentation by yeast*, Journal of the Chemical Society, Transactions, (DOI: 10.1039/CT9068900128), 89, (1906), S. 128–142.
188. Hough, J.S., Ricketts, R.W.: *New method of producing beer by continuous fermentation*, Journal of the Institute of Brewing, London, 66, 7/8, (1960), S. 301–304.
189. Emeis, C.C.: *Stabilität diploider und polyploider Kulturhefestämme*, Proceedings of the 10th European Brewing Convention (1965), Stockholm, S. 156–163.
190. Sommer, G., TU–Berlin, Academic Dissertation (1966).
191. Wackerbauer, K.: *Der Einfluß der Hefegabe auf Gärung und Bierqualität*, Monatsschrift für Brauerei, 22, 7, (1969), S. 211–216.
192. Back, W.: *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*, Fachverlag Hans Carl (2008), S. 142.
193. Narziß, L., Back, W.: *Die Bierbrauerei*, Die Technologie der Würzebereitung Wiley–VCH Verlag GmbH & Co.KG, (2009), S. 710–714.
194. Weinfurtner, F.: *Die Bierbrauerei*, F. Enke–Verlag, (1963).
195. Bosewitz, G., Ehliès, H., Dickscheidt, R.: *Verfahren und Anlage zur beschleunigten kontinuierlichen Vergärung und Reifung von Bierwürze sowie eine Anlage zur Durchführung dieses Verfahrens*, Patent: DE000001517812A, (02.08.1966).
196. O'Malley, W.P.: *Continous processing of beer*, Master Brewers Association of the Americas, 74th Anniversary Convention, Montreal, USA, (1961), S. 15–26.
197. Enari, T.M.: *Horace brown memorial lecture prospects of biotechnology for brewers*, Journal of the Institute of Brewing, London (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1987.tb04542.x), 93, 6, (1987), S. 501–505.
198. Narziß, L.: *Abriss der Bierbrauerei*, Wiley–VCH, editor (2005).
199. Schönenberg, S.: *Der physiologische Zustand und Sauerstoffbedarf von Bierhefen unter brauereitechnologischen Bedingungen – Optimierung der Propagations- und Anstelltechnologie in Hinblick auf die Gäreigenschaften und die Bierqualität*, TU–München, Weihenstephan, Dissertation, (2010).
200. De Clerk, J.: *Lehrbuch der Brauerei*, Versuchs– u. Lehranstalt für Brauerei. Berlin, (1964).
201. Annemüller, G., Manger H.J.: *Gärung und Reifung des Bieres - Grundlagen - Technologie - Anlagentechnik*, Versuchs– und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, (2009), S. 37.
202. Schröderheim, J.: *Factors influencing the primary fermentation in lager beer breweries*, Proceedings of the 3rd Congress of the European Brewery Convention, (1951), Brighton, S. 141–167.
203. Cowland, T.W.: *Some effecte of aeration on the continuous fermentation of hopped wort*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1967.tb03082.x), 73, 6, (1967), S. 542–551.
204. Hartwig, A.: *Optimierung der Hefetechnologie mit dem Ziel einer Verbesserung der Geschmacksstabilität im Praxismasstab*, TU–München, Weihenstephan, (2008).

205. Thiele, F.: *Einfluss der Hefevitalität und der Gärparameter auf die Stoffwechselprodukte der Hefe und auf die Geschmacksstabilität*, TU-München, Weihenstephan, Dissertation, (2006).
206. Portno, A.D.: *The influence of oxygen on the production of Diacetyl during fermentation and conditioning*, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1966.tb02990.x), 72, (1966).
207. Kahler, M., Hospodoka, J., Caslavsky, Z.: *Influence of the aeration of wort during continuous beer fermentation*, Annual Meeting of American Society of Brewing Chemists, (1965), St. Louis, USA, S. 112–116.
208. Mäkinen, V., Enari, T.M.: *Flavor compounds in continuous fermentation*, The Brewers Digest, 44, 5, (1969), S. 72–88.
209. Wackerbauer, K.: *Neuzeitliche Gär- und Reifungsverfahren im Wiederstreit*, Brauwelt 112, 80, (1972), S. 1641–1642.
210. Wellhoener, U.: *Beurteilung des physiologischen Zustands von Brauereihefe mittels Aktivitätsmessungen von Schlüsselenzymen bei der Propagation und Gärung*, TU-München, Weihenstephan, Dissertation, (2006).
211. Verstrepn, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R.: *Yeast flocculation: what brewers should know*, Applied Microbiology and Biotechnology, Springer-Verlag, 61, 3, (2003), S. 197–205.
212. Jones, R.P., Greenfield, P.F.: *Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation*, Enzyme and Microbial Technology, (DOI: 10.1016/0141-0229(82)90034-5), 4, 4, (1982), S. 210–223.
213. Renger, R.S.: *Carbon dioxide and its relevance to large-scale brewery fermentation*, Technische Universität Delft, Niederlande, Academic, (1991).
214. Devaux, F., Delvaux, F.R., Shen, H.-Y., Schrijver, S., Moonjai, N., Verstrepn, K.J.: *Effects of CO₂ on the fermentation of flavour volatiles during fermentation with immobilized brewer's yeast*, Applied Microbiology and Biotechnology, Springer-Verlag, 64, 5, (2004), S. 636–643.
215. Castelli, A., Littarru, G.P., Barbaresi, G.: *Effect of pH and CO₂ concentration changes on lipids and fatty acids of Saccharomyces cerevisiae*, Archiv für Mikrobiologie, Springer-Verlag, (DOI: 10.1007/BF00414661), 66, 1, (1969), S. 34–39.
216. Foth, G.: *Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung*, Wochenschrift für Brauerei 9, 4, 73–79 (1887), S. 305–306.
217. Foth, G.: *Über den Einfluß der Kohlensäure auf das Wachstum und die Gärtätigkeit der Hefe und ihre Bedeutung für die Konservierung des Bieres*, Wochenschrift für Brauerei 6, (1889), S. 263–279.
218. Rice, J.F., Chicoye, E., Helbert, J.R.: *Inhibition of beer volatiles formations by carbon dioxide pressure*, Journal of American Society for Brewing Chemists, (DOI: 10.1094/ASBCJ-35-0035), 1, (1977), S. 25–40.
219. Kumada, J., Nagami, K., Takahashi, T., Nakatani, K.: *Physiologische Aspekte der Druckgärung*, Brauwelt, (1979), S. 712–720.
220. Landaud, S., Latrille, E., Corrieu, G.: *Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.2001.tb00083.x), 107, 2, (2001), S. 107–117.
221. Lieske, R., Hofmann, E.: *Untersuchungen über Hefegärung bei hohen Gasdrücken*, Biochemische Zeitschrift, 210, (1929), S. 448.

222. Knatchbull, F.B., Slaughter, J.C.: *The effect of low CO₂ pressures on the absorption of amino acids and production of flavour active volatiles by yeast*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1987.tb04530.x), 93, 5, (1987), S. 420–424.
223. Renger, R.S., Van Hateren, S.H., Luyben, K.C.A.M.: *The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1992.tb01137.x), 98, 6, (1992), S. 509–513.
224. Zufall, C., Kunerth, S., Tietje, N., Wackerbauer, K.: *Beeinflussung der Hefevitalität durch physikalischen Druck*, Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, 3/4, (2000), S. 44–49.
225. Kumara, S., Fukui, N., Kojima, K., Nakatani, K.: *Regulation mechanism of Ester formation by dissolved carbon dioxide during beer fermentation*, Technical Quaterly of the Master Brewers Association of Americas, 32, 2, (1995), S. 159–162.
226. Kruger, L.: *Yeast metabolism and its effect on flavour: part 2*, Brewers Guardian, (1998), S. 27–30.
227. Arcay-Lesezma, G.J., Slaughter, J.C.: *The response of Saccharomyces cerevisiae to fermentation under carbon dioxide pressure*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1984.tb04242.x), 90, 2, (1984), S. 81–84.
228. Sepelova, G., Cvangroschova, M., Smogorvicova, D.: *Reduction of vicinal diketons by yeast in dependence of carbon dioxide pressure*, Monatsschrift für Brauwissenschaft, 56, 3/4, (2003), S. 44–47.
229. Miedaner, H.: *Optimisation of fermentation and conditioning in the production of lager*, EBC V, Fermentation and Storage Symposium, (1978), Zoeterwoude, S. 110–134.
230. Enari, T.M., Mäkinen, V.: *Über die wachstums- und gärungsbegrenzenden Faktoren bei der kontinuierlichen Gärung*, Brauwissenschaft, 14, 5/6, (1961), S. 253–256.
231. Nielsen, H., Hoybye-Hansen, I., Ibaek, D., Kristensen, B.J., Synnestverdt, K.: *Pressure fermentation and wort carbonation*, Technical Quaterly of the Master Brewers Association of Americas, 24, (1987), S. 90–94.
232. Drost, B.W.: *Fermentation an storage*, Proceedings of the 16th Congress of the European Brewery Convention, (1977), Amsterdam, Holland, S. 519–532.
233. Gaeng, F.E.: *Über beschleunigte Reifung des Bieres*, Brauwelt, 112, 22, (1972), S. 428–32.
234. Miedaner, H., Narziß, L., Wörgner, G.: *Über den Einfluß der Gärungsparameter Temperatur und Druck auf die Entwicklung einiger Gärungsnebenprodukte des Bieres*, Brauwissenschaft, 27, 8, (1974), S. 208–215.
235. Nordstedt, C., Bengtsson, A., Bennet, P., Lindström, I., Äyräpää, T.: *Technological measures to control the formation of esters during beer fermentation*, Proceedings of the 15th European Brewing Convention, (1975), Nice, Frankreich, S. 581–600.
236. Wellhoener, H.J.: *Schweizer Brau Rundschau*, 86, 1/2, (1975), S. 34–37.
237. Wellhoener, H.J.: *Ein kontinuierliches Gär- und Reifeverfahren für Bier*, Brauwelt, 49, 44, (1954), S. 624–626.
238. Wolter, H.C., Lietz, P.: *Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung einer kontinuierlichen, schnellen Gaerung und Reifung bei der Produktion von Bier*, Germany, Patent: DE1442241 (A1), Erteilt: 31.10.1968, (15.02.1965).

239. Haikara, A., Virkajärvi, I., Kronlöf, J., Pajunen, E.: *Microbiological contaminations in immobilized yeast bioreactors for primary fermentation*, Proceedings of the 26th Congress of the European Brewery Convention, IRL Press O, (1997), Maastricht, S. 439–446.
240. Kronlöf, J., Haikara, A.: *Contamination of immobilized yeast bioreactors*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.1991.tb01078.x), 97, 5, (1991), S. 375–380.
241. Mc Donald, J., Reeve, P.T.V., Ruddlesden, J.D., White, F.H.: *Progress in industrial microbiology*, Bushell ME, Elsevier, editor (1984), S. 47–198.
242. Meironke, H.: *Charakterisierung des Impuls und Wärmetransports in zylindrokonischen Gärtanks während der Gärung, Reifung und Lagerung mittels laseroptischer und Ultraschall-Messtechniken*, Monsenstein und Vannerdat, Academic, (2007).
243. Annemüller, G., Manger, H.J.: *Gärung und Reifung des Bieres, Grundlagen, Technologie, Anlagentechnik, 2*, (2013), S. 294.
244. Müller-Auffermann, K.: *Tank zur Fermentation sowie Verfahren, Vorrichtung und Verwendung zur Fermentation*, Germany, China, Europe, Patent: WO2011018473A2, (2009).
245. Annemüller, G., Manger, H.J.: *Gärung und Reifung des Bieres*, VLB Berlin, (2013), S. 424–425.
246. Sacher, B.: *Hefecharakterisierung anhand brautechnologischer Verhaltensmuster*, 3. Weihenstephaner Hefesymposium, Freising Weihenstephan, (2006).
247. Müller-Auffermann, K., Caldera, A., Hutzler, M., Jacob, F.: *Characterization of different bottom fermenting Saccharomyces pastorianus brewing yeast strains*, Brewing Science, 68, (2015), S. 46–57.
248. Hutzler, M., Geiger, E., Jacob, F.: *Use of PCR-DHPLC for the rapid differentiation of industrial Saccharomyces cerevisiae and pastorianus strains*, Journal of the Institute of Brewing, London, (DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00798.x), 116, 4, (2010), S. 464–74.
249. Tyrell, T., Exner, R., Folz, R.: *Further development of EBC fermentation testtubes*, Proceedings of the 33rd Congress of the European Brewery Convention, (2011), Glasgow, Schottland, S. 537.
250. Tyrell, T., Folz, R.: *Fermentation tests with improved EBC fermentation modules*, Brauerei Forum 9, (2011), S. 10–11.
251. Annemüller, G., Manger, H.J.: *Die Hefe in der Brauerei*, VLB-Verlag Berlin, (2003), S. 46–47.
252. Weinfurtner, F., Wullinger, F., Piendl, A.: *Die Kleingärapparatur, eine neue Untersuchungsmethode für die Gärtechnik*, Brauwelt, 101, 63, (1961).
253. Pajunen, E.: *Analytica-Microbiologica*, Hans Carl Verlag, European Brewery Convention, (2001).
254. Müller-Auffermann, K., Hutzler, M., Jacob, F.: *Methods and applications for the appropriate characterization of microorganisms*, World Brewing Congress, Portland, Oregon, USA, (2012).
255. Narziß, L.: *Vor- und Nachteile der Gärung in Großbehältern*, Brauwelt, 33, (1979), S. 1165–1170.
256. Balling, C.J.N.: *Die Bierbrauerei wissenschaftlich begründet und praktisch dargestellt, Die Gärungschemie 1*, 1, Prag, Calve, (1854).

257. Gay-Lussac, J.L.: *Lettre de M. Gay-Lussac a M. Clement, sur l'analyse de l'alcool et de l'éther sulfurique, et sur les produits de la fermentation, Annales de Chimie*, (231815), S. 203–215.
258. Böckh, M.: *Fluidmechanik: Einführendes Lehrbuch*, Stewart, G.G., editor, 2. Auflage, (2004).
259. Wan, N.: *Untersuchungen über den Einfluss verfahrenstechnischer Parameter auf die Temperaturverteilung und auf die Gärung in zylindrischen Gärtanks*, Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, TU-Berlin, Dissertation, (1995).
260. Delente, J., Akin, C., Krabbe, E., Ladenburg, K.: *Hydrodynamik der anaeroben fermentation*, Biotechnology and Bioengineering, 28, 4, (1969), S. 631.
261. Senge, I.: *Untersuchung des Durchmischungseinflusses auf die Gärgeschwindigkeit sowie die Messung der Strömungsgeschwindigkeit im 250m³-Bierfermenter als Beitrag zur Optimierung von Großraumfermentern*, Dissertation, (1980).
262. Hlavacek, F., Klasar, M.: *Semikontinuierliche Gärungen steriler Würzen*, Brauwissenschaft, 12, 1, (1959), S. 10–17.
263. Müller-Auffermann, K., Hutzler, M., Schneiderbanger, H., Jacob, F.: *Scientific evaluation of different methods for the determination of yeast vitality*, Brewing Science, 64, (2011), S. 106–118.
264. Hutzler, M., Koob, J., Riedl, R., Schneiderbanger, H., Müller-Auffermann, K., Jacob, F.: *Yeast identification and characterization*, Annie EH, Brewing Microbiology; Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste, Woodhead publishing series in food science, Technology and nutrition, (2015), S. 66–97.
265. Müller-Auffermann, K., Silva, W., Hutzler, M., Jacob, F.: *Hefevitalität direkt ermitteln; Entwicklung und Evaluierung eines alternativen Analyseverfahrens*, Der Weihenstephaner, 1, 82, (2014), S. 15–17.
266. Müller-Auffermann, K., Silva, W., Hutzler, M., Jacob, F.: *Evaluation and determination of an alternative analysis method for rapid determination of yeast vitality*, Brewing Science, 67, (2014), S. 72–80.
267. Stewart, G.G., Hill, A.E., Lekkas, C.: *Wort FAN – its characteristics and importance during fermentation*, Journal of American Society for Brewing Chemists, 71, (2013), S. 179–85.
268. Jenkins, C., Kennedy, A., Thurston, P., Hodgson, J., Smart, K.: *Serial repitching fermentation performance and functional biomarkers Brewing yeast fermentation performance*, Blackwell Science Ltd., Oxford (2003), S. 257–271.
269. Lentini, A., Rogers, P., Higgins, V., Dawes, I., Chandler, M., Stanley, G., Chambers, P.: *The impact of ethanol stress on yeast physiology, Brewing yeast fermentation performance*, Blackwell Science Ltd., Oxford, (2003), S. 25–38.
270. Piper, P.: *The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap*, FEMS Microbiology letters, 134, (1995), S. 121–127.
271. Ernandes, J., Williams, J., Russell, I., Stewart, G.: *Respiratory deficiency in brewing yeast strains: Effects of fermentation, flocculation, and beer flavor components*, Journal of American Society for Brewing Chemists, 51, (1993), S. 16–20.
272. Weber, E., Rooks, R., Shafer, K., Chase, J., Thorsness, P.: *Mutations in the mitochondrial ATP synthase gamma subunit suppress a slow-growth phenotype of ymel yeast lacking mitochondrial DNA*, Genetics, 140, (1995), S. 435–24.
273. Ibeas, J., Jimenez, J.: *Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in Saccharomyces yeasts*, Applied and environmental microbiology, 63, (1997), S. 7–12.

274. Jimenez, J., Inigo, E., Benitez, T.: *Induction of petite yeast mutants by membrane-active agents*, Applied and environmental microbiology, 54, (1988), S. 3126–3132.
275. D'Amore, T., Panchal, C., Russell, I., Stewart, G.: *Osmotic- pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation*, Journal of industrial microbiology, 2, (1988), S. 365–372.
276. Heggart, H., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R., Dowhanick, T., Russell, I.: *Factors affecting yeast viability and vitality characteristics*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 36, (1999), S. 383–406.
277. Jakobsen, M., Piper, U.: *Performance and osmotolerance of different strains of lager yeast in high gravity fermentations*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 26, (1989), S. 56–61.
278. Stewart, G.G.: *Recent developments in the characterization of brewery yeast strains*, Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas, 9, 4, (1972), S. 183–191.
279. Schulz, R.: *Historischer Entwicklungsweg der Hefegenetik von den Anfängen bis zur ersten Gentransformation in Brauereihefestämme*, Scientific– technical Economic Centre of Brewing and Malt Industry, (1989), S. 163–168.
280. Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F., Hutzler, M.: *Nisin and its usage in breweries: a review and discussion*, The Institute for Brewing and Distilling, (DOI:10.1002/jib.233), 1212, (2015), S. 309–319.
281. Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F., Hutzler, M.: *Nisin-producing microorganisms and their implementation in brewers` wort*, The Institute for Brewing and Distilling, (DOI:10.1002/jib.232), 121, (2015), S. 320–331.
282. Müller-Auffermann, K., Contreras, A., Dünzer, N., Jacob, F.: *Evaluation of the influence of antifoam products on yeast, tank cleaning and the chemical/physical properties of beer*, Brewing Science, 67, (2014), S. 48–59.
283. Müller-Auffermann, K., Hutzler, M., Riedl, R., Osnabrügge, F., Caro, M., Jacob, F.: *Alternative, biological methods in the flow profile: Characterization of bioreactors*, Brewing Science, 66, (2013), S. 123–134.
284. Kessler, H.G.: *Ansatzbildung- Reinigen- Desinfizieren- Werkstoffprobleme- Haften- Freispülen, Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik- Molkereitechnologie* (1996), S. 516–8.
285. Deutsches Institut für Erfindungswesen: Nominierung für die Dieselmedaille, Kategorie: Nachhaltigste Innovationsleistung. München, Deutsches Museum (2013).
286. Kronen: *Entwicklungsprojekt Kontinuierliche Gärung* world wide web (2014) [updated (01.01.2016,21:31:18)]. Webseite: <http://brau.kronen.com/de/entwicklungsprojekt-kontinuierliche-gaerung.php>.