

663.15

FERMENTATIETECHNIKEN

NRLO-rapport nr. 92/10

Verslag van de NRLO-Themadag "Fermentatietechnieken, gehouden op 13 februari 1992 te Woerden, georganiseerd onder auspiciën van de Taakgroep Technologie van de NRLO-Sector-Kamer Verwerking en Marktvoorziening.



Nationale Raad voor
Landbouwkundig Onderzoek
Postbus 20401
2500 EK 's-Gravenhage

Programma NRLO-themadag "Fermentatietechnieken", 13 febr. 1992.
Plaats: Hoofdkantoor Divisie Melkunie van Campina Melkunie,
De Bleek 1, Woerden.

9.00 u Ontvangst

9.15 u Opening door Dr.Ir. J.M.P. Papenhuijzen

9.20 u Inleiding door Prof.Dr.Ir. C.T. Verrips

9.30 u **Blok 1: Solid state fermentatie**
 - Ir. J. Bol (TNO)
 - Mevr. Drs. M.L.D. Hagemans (URL)
 discussie

10.30 u **Blok 2: Split stream processing**
 - Ir. G. van den Berg (NIZO)
 - Ing. B.A.M. Hulshof (Campina-Melkunie)
 discussie

11.30 u koffie

11.45 u **Blok 3: Geïmmobiliseerde micro-organismen**
 - Dr. M.R. Smith, Prof.Dr. J.A.M. de Bont (LUW)
 - W. Swinkels (Bavaria)
 discussie

12.45 u lunch

13.30 u Rondleiding door MONA productiebedrijf

15.00 u thee

15.15 u **Blok 4: Membraan bioreactoren**
 - Prof.Dr.Ir. K.Ch.A.M. Luyben (TUD)

- Drs. F.A.M. Klaver (NIZO)
discussie

16.15 u Samenvatting door Dr. J.T.M. Wouters

16.30 u Sluiting door Dr.Ir. J.M.P. Papenhuijzen

Verslag NRLO-themadag "fermentatietechnieken", 13 febr. 1992.

Welkom en Inleiding:

De themadag werd geopend door Dr.Ir. J.M.P. Papenhuijzen. Na een woord van welkom werd nog eens kort het doel van de NRLO-bijeenkomsten zoals deze uiteengezet, nl. het bij elkaar brengen van participanten uit de industrie, instituten, universiteiten en overheid.

Hierna werd het woord gegeven aan Prof.Dr.Ir. C.T. Verrips die het programma voor deze dag inleidde met een korte algemene beschouwing van de vier onderwerpen welke aan de orde zouden komen. De afzonderlijke onderwerpen (solid state fermentaties, split stream processing, geïmmobiliseerde micro-organismen en membraan bioreactoren) werden belicht door de stand van zaken in de "past/present" te vergelijken met hetgeen verwacht kon worden voor de toekomst. De nadruk werd hiertoe gelegd op de toepassingsgebieden (met name produktie van metaboliëten, enzymen en levensmiddelen, alsook verwijdering van toxische stoffen uit bepaalde produkten). Na deze inleiding, waarbij de fermentatietechnieken in een kader van ontwikkeling werden geplaatst, werd begonnen met het wetenschappelijk gedeelte van deze dag: de voordrachten.

Samenvatting van de voordrachten:

Solid state fermentatie.

De heer Bol van TNO-voeding uit Zeist hield de eerste voordracht van deze dag. Hij ging in op de hernieuwde belangstelling voor de solid state fermentatie (SSF); waarop dit gebaseerd is, de betekenis voor landbouw en industrie, de knelpunten.

Het toepassingsgebied van SSF is vrij breed: van compostering van mest tot de produktie van fijnchemicaliën. Het zgn. Koji-proces (zie bijlage 2) werd als voorbeeld gegeven van een SSF waarbij

de overeenkomsten tussen andere SSF werd opgemerkt (bijv. vermouting van gerst in de bierbereiding). De voor- en nadelen van de SSF werden besproken. Specifieke voordelen zijn o.a. de lage A_w (dus beperkte droogkosten en een geringere kans op bacteriële contaminaties), eenvoudig verkrijgbaar medium, geen afvalstroom en groei van micro-organismen onder natuurlijke omstandigheden. Nadelen betreffen m.n. technologische problemen (meet en regeltechniek, moeilijk te controleren warmteproductie, beperkte stofoverdracht).

Nieuwe ontwikkelingen vinden plaats op het gebied van de modellering van SSF gebaseerd op laboratorium experimenten. Dit levert vaak waardevolle informatie op die leidt tot meer inzicht in de SSF. Vervolgens werden kort enkele toepassingen van SSF behandeld (in de milieusector, valorisatie, klassieke toepassingen zoals champignon-kwekerijen en compostering, agrificatie en de produktie van enzymen, farmaceutica etc.). Tot slot richtte de heer Bol de aandacht op het grote knelpunt waarmee het onderzoek SSF onderzoek de komende tijd mee te maken zal gaan krijgen, nl: het ontbreken van fundamenteel technologische kennis van veel toepassingen van SSF.

Hij benadrukte het belang van een goede samenwerking en een multidisciplinaire aanpak door zowel de landbouwsector als de industrie.

De tweede voordracht over het onderwerp solid state fermentaties werd gehouden door mevr. Hagemans van het Unilever Research Laboratorium, Vlaardingen. De voordracht begon met een beschrijving van de deegfermentatie en de specifieke eisen waaraan zo'n fermentatie moet voldoen voor de bepaalde produkten (zacht luxe brood, stokbrood, hard klein brood).

De samenstelling van deeg en met name de suikerfractie in de bloem werd besproken. De omzetting van deze suikers is bepalend voor de fermentatie. Niet alleen CO_2 , maar ook ethanol en andere flavourverbindingen worden door de in het deeg aanwezige gisten geproduceerd.

De deegfermentatie begint met het kneden. Tijdens de kneding worden S-bruggen tussen eiwitten (gluten) verbroken, wat

resulteerd in een "unfolding", gevolgd door uiteindelijk weer een "refolding". In feite wordt de structuur van het deeg zodanig veranderd dat het geschikt is om gas (CO₂) vast te houden. Tijdens het zgn "doorslaan" van het deeg wordt het aantal gascellen vermeerderd, wat resulteerd in een beter rijsgedrag en uiteindelijk in een veel betere structuur van het brood zelf. Tot slot werd uitgebreid stilgestaan bij het feit dat bij optimalisering van een broodproces sterk rekening gehouden moet worden met de wensen van de bakkers zelf! Als voorbeeld werd een dagplanning van een bakkerij getoond. Het bleek dat er eigenlijk weinig ruimte over was om een broodproces waarbij bijv. de rijstijd sterk verkort is, in te passen in een bestaande planning.

Discussie

Tijdens de discussie werd het probleem van uitdroging i.g.v. de aerobe SSF gesignaleerd. Volgens Bol kunnen echter door gebruik te maken van goede besproeiingstechnieken of door te aeren met met H₂O verzadigde lucht, de meeste problemen voorkomen worden.

Split stream processing.

De heer van den Berg van het NIZO hield een voordracht over de boterbereiding volgens het zgn. NIZO-proces. Hij begon zijn voordracht met de bespreking van het traditionele boterproces, waarbij als nevenproduct zure karnemelk werd verkregen. Als gevolg van oxidatieve processen was deze zure karnemelk slecht houdbaar. Hierdoor ontstond de vraag naar een ander proces. Gebonden aan een aantal voorwaarden waaraan voldaan moest worden (zowel technologisch als (markt)politiek), werd het zgn. Booser proces ontwikkeld. Zoete melk werd gekarnd, en er ontstond een zoete boter waardoorheen een aromatische zuursel werd gekneed. De aldus geproduceerde boter (Zwitterbutter) bezat echter geen aroma (diacetyl). Bij het NIZO-proces ging men uit van een zoete boter waaraan naast een aromatisch zuursel ook een

zuurselpermeaat werd toegevoegd. Het bleek dat de op deze manier bereide boter het meeste aroma (diacetyl) bezat wanneer de pH 5.3 bedroeg. Optimalisering van het proces werd verkregen door aan de zoete boter een sterk aromatisch zuursel tesamen met een zuurselpermeaat toe te voegen, en dan het geheel te kneden met nog een aromatisch zuursel. Het aldus ontwikkelde proces is het NIZO procedé wat "wereldwijd" gebruikt wordt voor de bereiding van ECHTE BOTER.

De heer Hulshof van Campina-Melkunie ging in zijn voordracht vooral in op de praktische kant van het NIZO boterbereidingsprocedé. Hij begon met een schematische weergave van het gehele procedé en vervolgens werden de restricties die gelden voordat het produkt "boter" mag heten, alsook het marktaandeel van de volgens het NIZO procedé bereide boter behandeld. De technische kant van het produktieproces werd middels schematische tekeningen uiteengezet. Specifieke aandachtspunten (het karnen van de room, de temperatuurscontrole in de karntank, de zuurselbereiding en de dosering van het toe te voegen zuursel) werden extra belicht. De voordracht werd besloten met een opsomming van voordelen van het NIZO procedé t.o.v. het traditionele proces.

Geïmmobiliseerde micro-organismen.

De voordracht van de heer Smith van de Landbouw Universiteit Wageningen startte met een algemeen inleidend verhaal over geïmmobiliseerde micro-organismen. De vormen van immobilisatie (door binding aan dragermateriaal, crosslinking, matrix "entrapment" en gebruik van semi-permeabele membranen (met als doel: cel retentie)) werden genoemd, waarbij de nadruk gelegd werd op matrix "entrapment". De voordelen van immobilisatie (continu processen, hoge celdichtheid, eenvoudiger product "recovery" etc.) alsook de nadelen ervan (kosten, massa-transport limitaties, aanwezigheid van vrije cellen (a.g.v. doorgroei) controleerbaarheid v.h. proces etc.) werden tegen elkaar afgezet.

De beperkte toepassing van geïmmobiliseerde cellen kan deels verklaard worden door de eventuele nadelen, echter, in veel gevallen zou het gebruik van deze techniek kunnen leiden tot verbetering van bepaalde processen.

Smith vervolgde zijn verhaal met mogelijke toepassingen van geïmmobiliseerde melkzuurbacteriën in de produktie van melkzuur, starter cultures, flavour-verbindingen (diacetyl), proteolytische enzymen en bacteriocines. Resultaten van de produktie van melkzuur door melkzuurbacteriën geïmmobiliseerd middels "entrapment" of adsorptie aan een drager, alsook middels membraan "confinement" werden gepresenteerd. Hieruit bleek dat t.o.v. produktie in batch fermentaties duidelijk meer melkzuur geproduceerd kon worden. I.g.v. de produktie van geconcentreerde starter cultures werd met name de "entrapment" van cellen als mogelijk alternatief voor de traditionele produktiewijze genoemd. Als voorbeeld voor de produktie van flavour verbindingen werd de diacetyl produktie door *L.lactis ssp lactis biovar diacetylactis* welke geïmmobiliseerd zijn door alginaat "entrapment", kort behandeld. Ten slotte werd de toepassing van geïmmobiliseerde melkzuurbacteriën voor de produktie van proteolytische enzymen en bacteriocines als mogelijk alternatief genoemd voor de huidige produktie processen.

Als tweede spreker over geïmmobiliseerde micro-organismen gaf de heer Swinkels van Bavaria bv een voordracht over het gebruik van geïmmobiliseerde gistcellen (op een vaste drager) in de bereiding van alcoholvrij bier. Door de aanwezigheid van iemand van de concurrent Heineken vertelde de heer Swinkels slechts een gedeelte van het geplande verhaal. Eerst vertelde hij iets over bier in het algemeen, gevolgd door een uitleg over de behandeling van de wort (vlbr extract van de mout), waarbij de verschillen in de behandelingswijze voor normaal- en alcoholvrij bier werden belicht. Wort bevat behalve een heel scala aan gewenste "bier-flavours" ook een aantal minder gewenste smaakcomponenten. Met name aldehyden hebben een negatieve smaakbijdrage. I.g.v. normaal bier worden deze aldehyden verwijderd door "wortboiling" en/of de fermentatie. Voor de bereiding van alcoholvrij bier worden de

aldehydes verwijderd door een reductie door gistcellen. Tijdens het contact tussen de wort en de gist treedt geen vergisting (dus geen alcohol productie!) op. Er zijn op dit gebied diverse methoden in gebruik, zoals o.a. het bekende "cold contact" procedé. Bij Bavaria wordt voor deze aldehyd reductie gebruik gemaakt van een als monolayer geïmmobiliseerde gist op een niet poreuze drager. Deze gist wordt aan de wort toegevoegd en het hele proces verloopt anaeroob (!). Het op deze manier gebrouwen alcoholvrije bier heeft een betere smaak dan wanneer het tijdens de fermentatie geproduceerde alcohol achteraf verwijderd wordt (middels membraansystemen of thermische systemen).

Het laatste deel van de voordracht werd gereserveerd voor een technische uiteenzetting van de voordelen van het door Bavaria gebruikte immobilisatie systeem.

Membraan bioreactoren.

De voordracht van de heer Luyben van de Technische Universiteit Delft ging over de toepassing van membraan bioreactoren in fermentaties. Na een korte algemene inleiding over het gebruik van membranen voor cel retentie (ultrafiltratie, microfiltratie), product "recovery" (pervaporatie, perstractie, electro-dialyse) en toevoeging van nutriënten ("belvrije" aeratie), werden de diverse aspecten van de membraan bioreactor belicht aan de hand van het voorbeeld van ethanolproductie met bakkersgist. De fermentatie betreft een fermentor gekoppeld aan microfiltratie voor celretentie en pervaporatie voor ethanolwinning. De ethanolproductie in verschillende systemen (alleen continu cultuur (CC), CC + microfiltratie (MF) en CC + MF + pervaporatie (PV)) zijn met elkaar vergeleken. Het gecombineerde CC + MF + PV proces leverde het beste resultaat op. Problemen die een rol spelen bij een dergelijk systeem (zoals verhoogde viscositeit a.g.v. de toename van de biomassa en het effect van de temperatuurshock die optreedt tijdens de pervaporatie) werden besproken. Vervolgens werd dieper ingegaan op het gebruik van een

capillaire viscositeitsmeter om de biomassa concentratie "on line" te meten. Tot slot werd iets verteld over de procesconfiguratie, opschalingsaspecten en de economische haalbaarheid van een dergelijk proces. Momenteel is een fermentatiesysteem wat bestaat uit CC + MF wèl economisch haalbaar, terwijl voor toepassing van pervaporatie membranen deze eerst verder verbeterd zouden moeten worden (betere selectiviteit, betere flux).

De laatste voordracht werd gehouden door de heer Klaver van het NIZO. In deze voordracht werden een aantal toepassingen van membraan bioreactoren (celrecirculatiereactor, dialysereactor) in de zuivelindustrie besproken. Achtereenvolgens werd de produktie van melkzuur en van biomassa (zuurselconcentraat) in een celrecirculatiefermentatie (CRF) besproken. De produktie van melkzuur door *Lactobacillus helveticus* is in een CRF een factor 10 hoger dan in een batchfermentatie (BF). Echter, de conc. in de produktstroom is minstens een factor 2 lager. Dit leidt ertoe dat bulk-productie van melkzuur met CRF geen economisch voordeel biedt t.o.v. de BF. Voor de produktie van biomassa geldt dit economische voordeel wel. Door het gevormde melkzuur, dat groeiremmend werkt, continu te verwijderen, kon men in een CRF een 6 maal hogere biomassa van *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (zuurselconcentraat) krijgen dan in een BF.

De membraandialysefermentatie (MDF) werd toegepast in de bereiding van yoghurt en karnemelk. I.g.v. yoghurtbereiding werd in twee compartimenten, gescheiden door een membraan dat uitwisseling van laagmoleculaire verbindingen bewerkstelligt, afzonderlijk *L. delbrückii* ssp *bulgaricus* en *Streptococcus thermophilus* gekweekt. Deze interactieve vorm van fermentatie leidde tot een synergisme dat normaal ook optreedt indien beide soorten gezamenlijk in melk worden gekweekt. Op deze manier kon yoghurt gemaakt worden dat een geringere nazuring tijdens opslag vertoonde. I.g.v. karnemelkbereiding trad eenzelfde synergistisch effect op wanneer men in twee afzonderlijke compartimenten resp. citraatvergistende- (*L. diacetylactis* of *Leuconostoc*) en niet citraatvergistende (*L. lactis* of *L. cremoris*) melkzuurbacteriën

liet groeien. Op deze manier kon een stabilisering van het uit citraat gevormde diacetyl bewerkstelligd worden.

Discussie

Tijdens de discussie over het blok "membraan bioreactoren" kwam het probleem van de vervuiling van de membranen nog eens naar voren. Met name in de celretentie toepassing speelt dit. Echter, volgens Luyben is het probleem niet zo heel groot. Reverse flow kan in veel gevallen al volstaan om verstopping van de membraan te voorkomen. Verder werd gesproken over de toekomstverwachtingen van verdere toepassing van membranen. Technisch moet het mogelijk zijn om membranen te maken met een hogere specifieke doorlaatbaarheid en/of met een verbeterd fluxpotentieel. Zulke verbeteringen zullen de toepasbaarheid van membraan bioreactoren zeker ten goede komen.

Samenvatting.

In het samenvattend betoog van Dr. J.T.M. Wouters werden de deze dag besproken onderwerpen als één geheel nogmaals tegen het licht gehouden. Hij greep terug naar de historie van de fermentatie en vergeleek deze met de huidige stand van zaken. De heer Wouters merkte op dat hoe complexer het fermentatie-produkt, hoe minder kennis er bestaat over de technologie en de fysiologie van die fermentatie. Hij onderstreepte dit door de op deze dag besproken (praktijk)voorbeelden van fermentaties nog eens op een rijtje te zetten. Naar oplopende complexiteit noemde hij fermentaties ter verkrijging van zgn. enkelvoudige produkten (ethanol, melkzuur, aroma (diacetyl), biomassa voor zuursels), de gefermenteerde voedingsmiddelen (bier, yoghurt, worst, brood, Koji) en als laatste de zeer complexe fermentaties zoals compostering en grondreiniging. Het blijkt zo te zijn dat de meest complexe processen vaak tot de oudsten behoren, terwijl tot voor kort juist veel effort gestopt is in de ontwikkeling van nieuwe, simpeler, fermentaties. Voor de ontwikkeling en begripvorming van zowel oude als nieuwe fermentatietechnieken onderstreepte Wouters

het belang van:

- * kennis over het uitgangsmateriaal
- * kennis van het biologisch agens
(bacteriën, gisten, schimmels)
- * kennis over de produkteisen

Tot slot werd er nog gesproken over het gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen in met name de voedingsmiddelen-industrie en de comotie die dit onder de consument teweeg brengt. Zonder het belang en de enorme mogelijkheden die de moleculaire biologie ons biedt uit het oog te verliezen, stelde Wouters dat het zinnig is om vooral ook te blijven zoeken naar van nature voorkomende gunstige eigenschappen van micro-organismen. Hij refereerde daarbij naar een uitspraak van Kluyver die zei:

"De natuur biedt ons van alles, het is voor ons mensen slechts zaak dit op te sporen...!"

Afsluiting.

Rond half vijf werd de NRLO themadag "fermentatietechnieken" afgesloten door Dr.Ir. J.M.P. Papenhuijzen. Hij sprak van een zeer nuttige bijeenkomst en onderstreepte nog eens het belang van dit soort NRLO-themadagen.

De heer Papenhuijzen bedankte iedereen die een bijdrage aan deze dag had geleverd en de aanwezigen voor hun aandacht.

Vlaardingen,
24 februari 1992.

Drs. D.J.C. van den Berg,
URL.

Lijst van deelnemers en genodigden themadag "Fermentatietechnieken"

Dr. S.A.G.F. Angelino	Hoofdgroep Voeding-TNO
Dr.Ir. G. Bakker	DSM Chemicals
Dr. Ir.P.V. Bartels	ATO Agrotechnologie
Dr.Ir.C.P. van der Beek	Gist-Brocades
Drs. D.J.C. van den Berg	Unilever Research Laboratorium
Ir. G. van den Berg	NIZO
Ir. J. Bol	Inst. Biotechnologie en Chemie - TNO
Prof.Dr. J.A.M. de Bont	LUW
Dr. A. Capelle	Cebeco Handelsraad
Dr. F.M. Driessen	Campina Melkunie
Mevr.Dr.Ir.K.J. Ganzeveld	RUG
Mevr.Drs. M.L.D. Hagemans	Unilever Research Laboratorium
Dr.H.J. Huizing	ATO Agrotechnologie
Ing. B.A.M. Hulshof	Campina Melkunie
Dr. A. Kerkenaar	Denka
Drs. F.A.M. Klaver	NIZO
Prof.Ir. B. Krol	RUU
Dr. S. Korver	BP Nutrition
Dr. C.G. de Kruif	NIZO
Dr.Ir. J.M.G. Lankveld	Campina Melkunie
Prof.Dr.Ir. K.C.A.M. Luyben	TUD
T.A. de Man	Heineken
Ing. E. Meersman	Bavaria
medewerker Mellema	Coberco Research Laboratorium
Dr.Ir. A.K. Muntjewerf	Nutricia
Ir. G. Nanninga	Purac
Dr.Ir. M.J.R. Nout	LUW
Dr.Ir. J.M.P. Papenhuijzen	NRLO
Dr.A.L.J. Peters	Quest International
Dr. P.H. Pouwels	Medisch Biologische Laboratorium-TNO
Ing. B. Reusken	Campina Melkunie
Dr.A. Rinzema	LUW
A.D. Ronteltap	Heineken
Mevr.Drs.C.O.M. Rijnders	Gist-Brocades
Dr. B.J. van Schie	Unilever Research Laboratorium
F. van der Schoot	SABA
Ir.J. Spaans	Norit
Dr.M.R. Smith	LUW
Dr.Ir. Th.H.M. Snoeren	Frico-Domo
Dr.E.J. Stamhuis	RUG
W. Swinkels	Bavaria
Mevr.Ir.H.P.J. Timmers	Unilever Vlees Groep
L. Tjalma	AVEBE
Ir.R. Tijssens	Campina Melkunie
B.A.J.M. Uitdewilligen	Beschuitfabriek A.A. ter Beek
Dr.Ir. P. Verlaan	IGMB-TNO
Prof.Dr.Ir. C.T. Verrips	Unilever Research Laboratorium
Prof.Dr.Ir.A.G.J. Voragen	LUW
Ir. F.J. Westerling	LNV
Dr. J.T.M. Wouters	NIZO

NRLO Themadag "FERMENTATIETECHNIEKEN"

Solid state fermentations:

Past/Present:

Local Raw Materials



Indigenous Fermented Foods

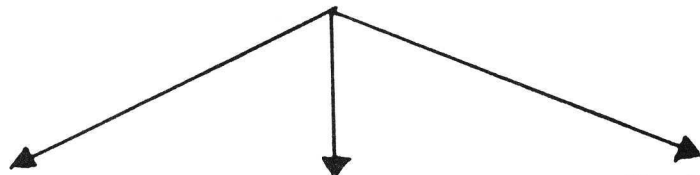
Present/Future:

Local Raw Materials

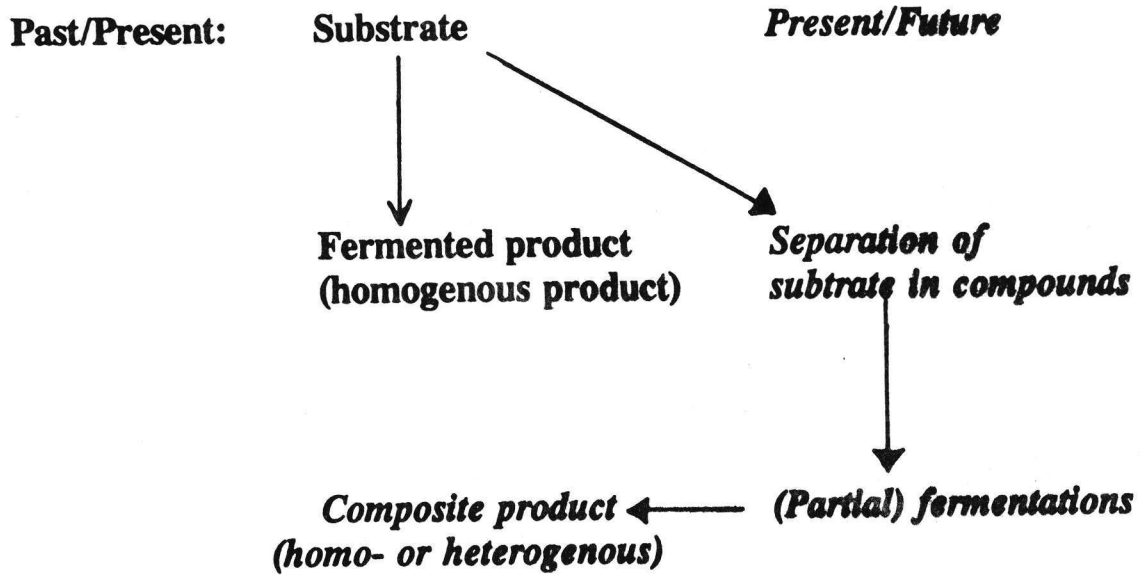
Removal of
toxic or anti-
nutritional compounds

Enzymes
Metabolites

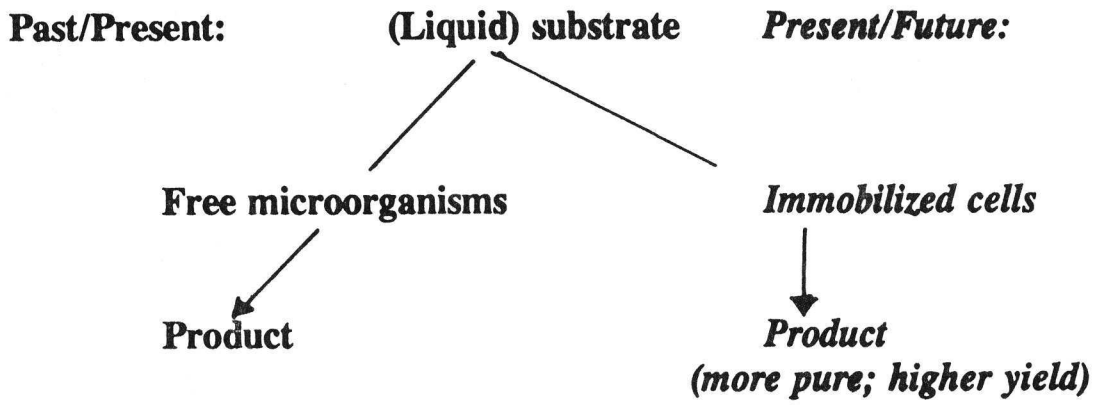
Healthy Foods



Split stream processing:



Immobilized cells



Membrane bioreactors:

Present/Future:

(Liquid) substrate



**Physical separation
of cells and substrate
or products**

**Product
(more pure; higher yields)**

Nieuwe mogelijkheden met solid-state fermentatie ?

Ir. J. Bol, Ing. W. Knol (TNO-Voeding, Zeist)

"Er is niets nieuws onder de zon", aldus een veel gebruikt gezegde. Dit kan ook gezegd worden met betrekking tot de hernieuwde belangstelling voor vast-bed fermentatie (veelal solid-state fermentatie, SSF genoemd). Het is inderdaad een van de eerste vormen van fermentatie.

Waarop is deze nieuwe belangstelling gebaseerd ? Welke betekenis heeft of kan SSF hebben voor landbouw en industrie in de komende jaren ? Wat zijn de knelpunten ?

Deze vragen vormen het centrale thema van deze lezing.

Wanneer we de diverse vormen van SSF indelen, zal blijken dat de verschillende applicaties (te karakteriseren op basis van vochtgehalte, selectiviteit, beheersbaarheid, e.d.) een breed toepassingsgebied bestrijken: van compostering van mest tot productie van fijnchemicaliën.

De betekenis van de voor- en nadelen van SSF hangt in sterke mate samen met de beoogde toepassing. Zo kunnen bijvoorbeeld specifieke ecologische omstandigheden verantwoordelijk zijn voor de inductie van een gewenst enzym of voor de vorming van speciale aroma's. Economische voordelen kunnen voortkomen uit het lage vochtgehalte (geringe droogkosten).

Technologisch gezien zijn de overeenkomsten bij de uiteenlopende toepassingen soms opvallend groot; in dit verband kan gedacht worden aan het vermouting van gerst en productie van enzymen (koji).

Afgaand op recent literatuuronderzoek zijn enkele nieuwe ontwikkelingen waarneembaar. Eigen SSF-onderzoek van TNO richtte zich tot voor kort eliminatie van 1) mycotoxinen en 2) Anti Nutritionele Factoren in veevoeder-grondstoffen. In hetzelfde kader (valorisatie van landbouwgrondstoffen of -reststromen) zijn er potentieel meer mogelijkheden: delignificatie, stabilisatie, eiwitverrijking, ontsluiting (verhoging verteerbaarheid, verhoogd rendement oliewinning), etc. Het belang van SSF bij agrificatie lijkt voor de hand te liggen. Nader onderzoek lijkt gewenst.

In de milieusector vormen compostering (huishoudelijk en GFT afval, champignons) en gebruik van compostfilters toepassingen, die meer en meer aandacht krijgen. Grondreiniging is tevens een goed voorbeeld.

Ontwikkelingen zijn gaande (o.a. bij TNO) om het SSF-principe te benutten als alternatief productiesysteem (enzymen, fijnchemicaliën).



Een belangrijk knelpunt, waarmee het onderzoek op dit terrein in toenemende mate mee te kampen zal krijgen is het ontbreken van fundamenteel technologisch inzicht en semi-technologische faciliteiten. Afgezien van veel empirische know-how m.b.t. compostering en vermouting, ontbreekt de technologische kennis voor veel toepassingen (procesbeschrijving, meet- en regelsystemen).

Een goede samenwerking en een multidisciplinaire aanpak zullen nodig zijn om de mogelijkheden van SSF (voor de landbouwsector en de industrie) goed te benutten. De afdeling Biotechnologie van IBC-TNO heeft voor de komende jaren ruimte in het onderzoekprogramma gecreëerd voor bovengenoemde aspecten van SSF. Er zal daarbij worden getracht gemeenschappelijke problematiek aan te pakken, dit in samenwerking met de industrie en de universiteiten. Initiatieven zijn genomen om belangrijke (maar zeer kostbare) semi-technische apparatuur voor het onderzoek beschikbaar te krijgen.



—

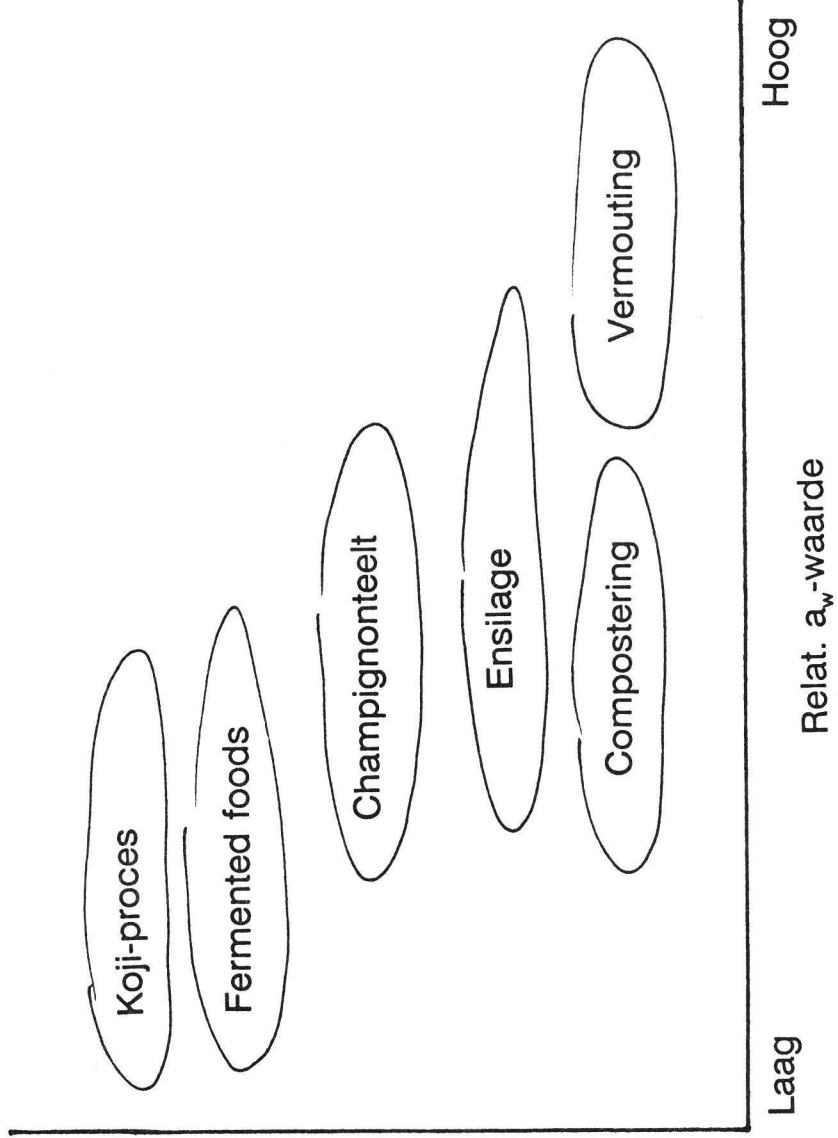
Nieuwe mogelijkheden met solid-state fermentatie?

J. Bol & W. Knol (TNO-Voeding, Zeist)

- * achtergronden
- * huidige toepassingen
- * nieuwe toepassingen

DEFINITIE

.... microbiële groei en produktvorming op of in een vaste matrix in afwezigheid (of bijna afwezigheid) van vrij water



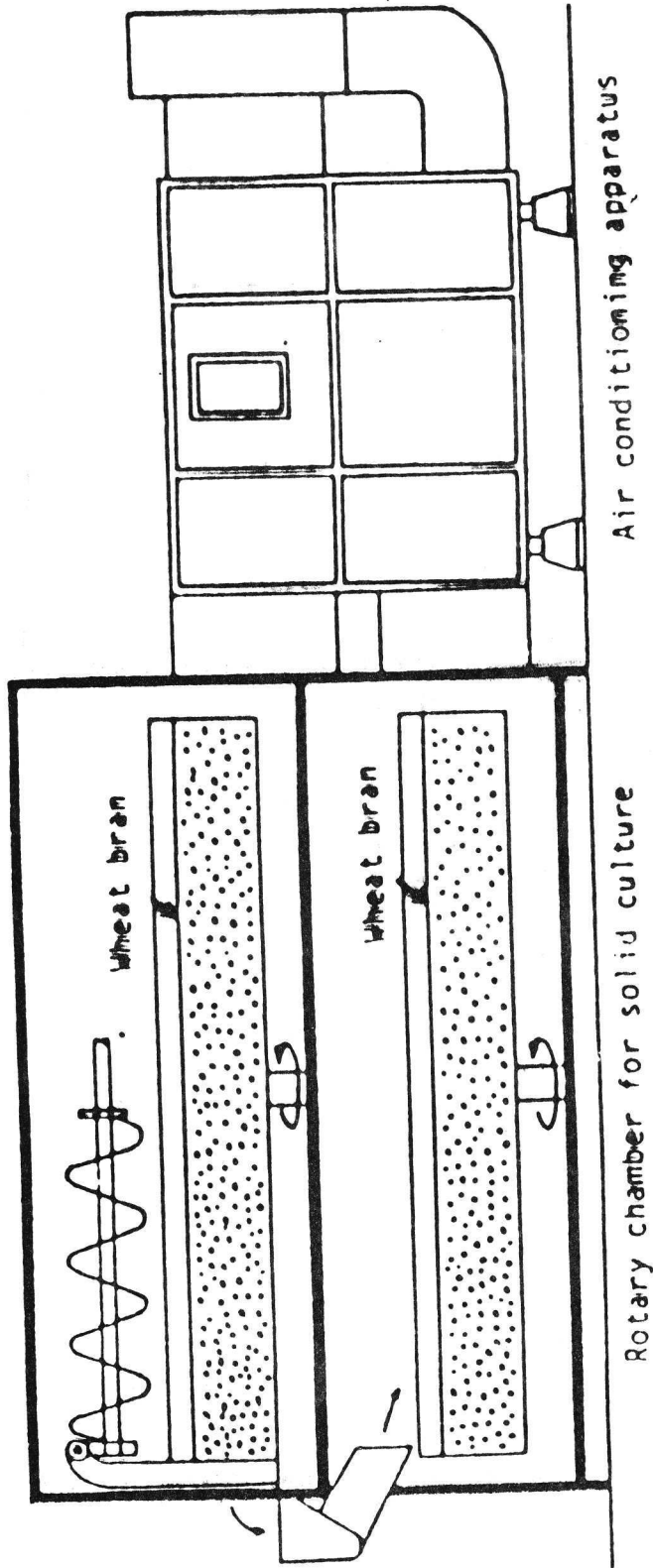


Fig. 2. Rotary automatic koji-making apparatus. The apparatus has a two-storeyed chamber. Each chamber has a rotary large tray on which wheat bran is heaped evenly. After inoculated fungus has grown sufficiently, the solid culture is transferred by a screw conveyor to the lower rotary tray. Solidified solid culture is loosened by a fixed stirrer in the rotary tray and is crushed by a crusher fitted in a hopper. The above two automatic koji-making apparatus are being operated for the production of cellulase preparation using *T. viride*.

GUNSTIGE ASPECTEN

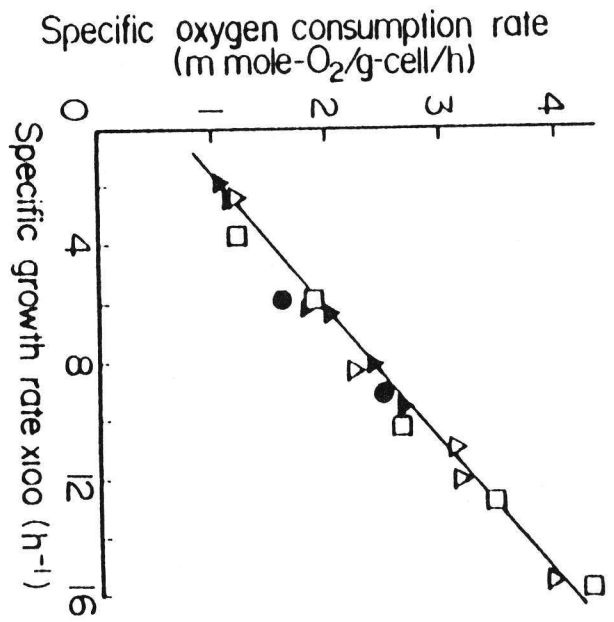
- eenvoudig medium
- geringe kans op bacteriële contaminatie vanwege selectieve wateractiviteit (A_w)
- reactorvolume gering
- organisme groeit onder natuurlijke omstandigheden
- geen afvalstroom
- laag solvent verbruik bij extractie

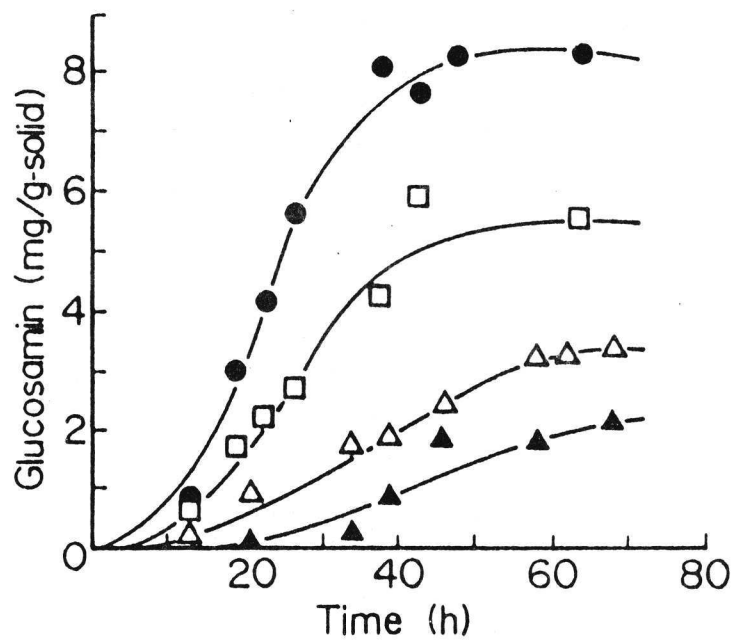
NADELIGE ASPECTEN

- meten en regelen is gecompliceerd
- warmteproductie is moeilijk hanteerbaar
- stofoverdracht is beperkt
- sterke mechanisatie maakt proces duur
- weinig gegevens beschikbaar m.b.t. technologie

$$W_g = \frac{Q_m - hA(T_2 - T_1)}{0.24(T_2 - T_1) + \lambda(H_2 - H_1)} \quad (1)$$

$$W_g = \frac{\frac{Q_0}{12} \left(\frac{1 - \eta}{\eta} \right) \sigma_b \gamma_b \mu X_0 e^{\mu t} - hA(T_2 - T_1)}{\lambda(H_2 - H_1) + 0.24(T_2 - T_1)} \quad (6)$$





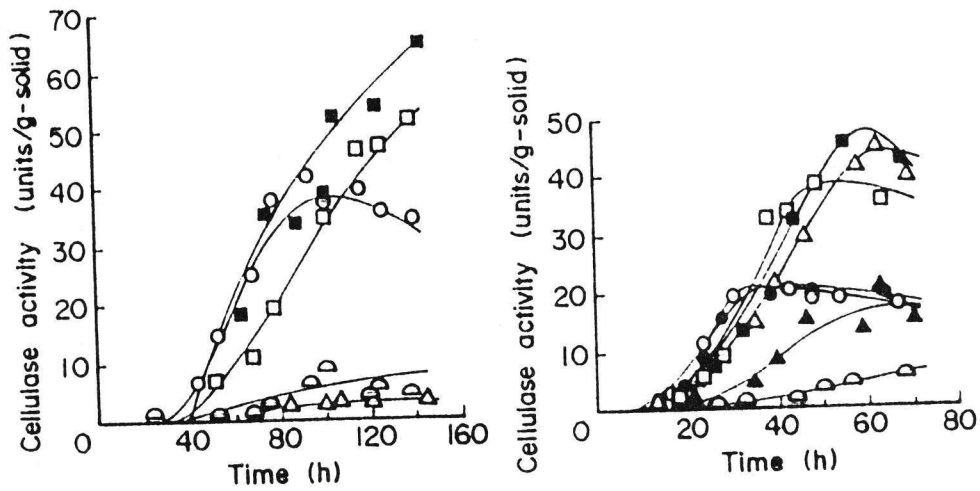
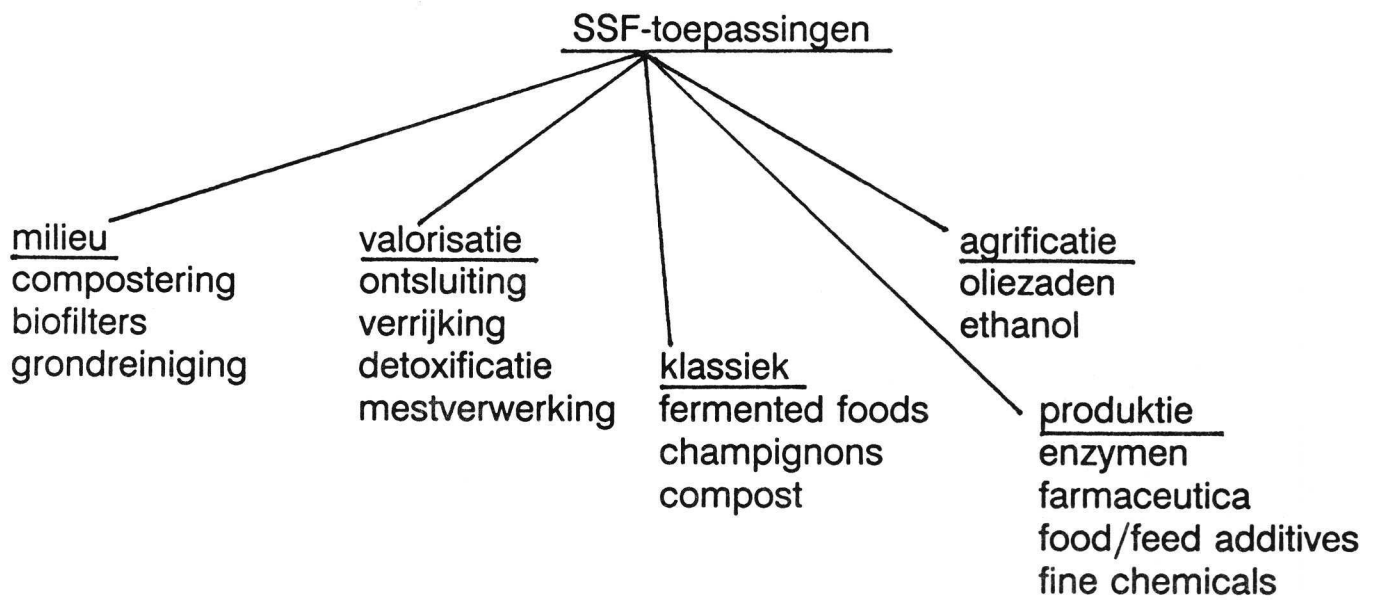
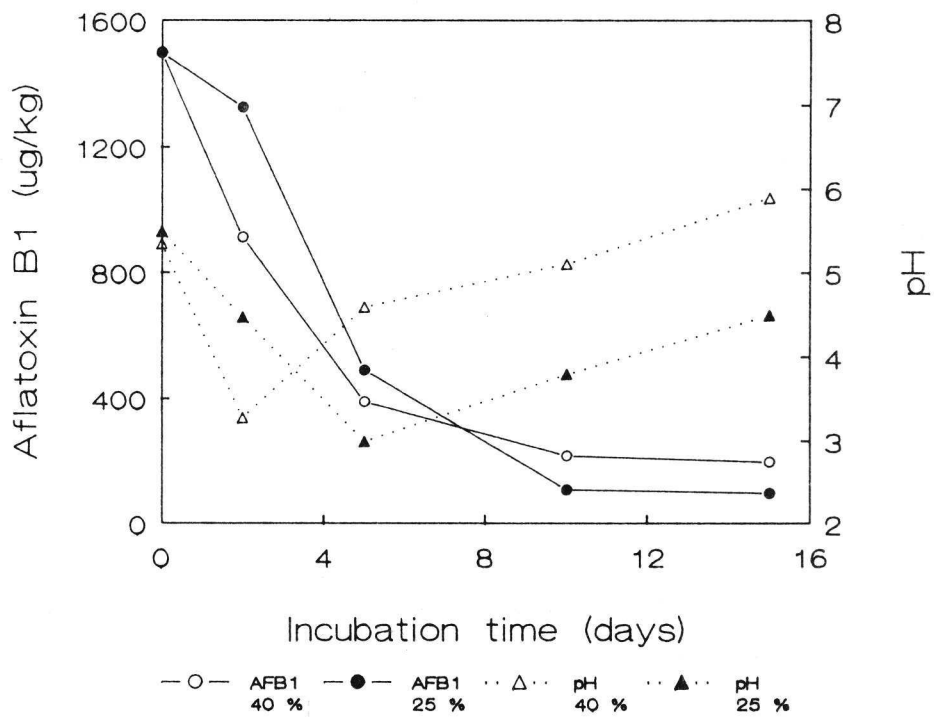


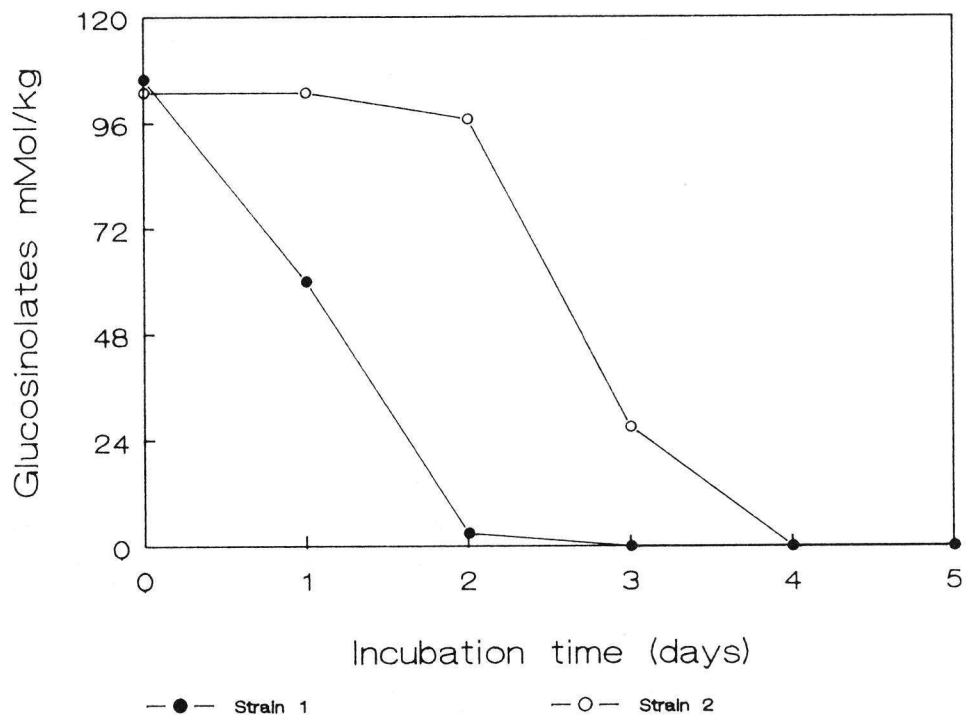
Figure 6. Profile of cellulase activity during the solid state cultivation of *T. reesei* QM9414 (left panel) and *S. cellulophilum* (right panel) at varying water contents. Symbols represent the experimental data and solid lines the estimated values based on the mathematical model. The symbols used for water content are the same as those used in Figure 3.



ONTWIKKELINGEN VAN NIEUWE SSF-PROCESSEN

Biomassa	Enzymen	Metabolieten
bietenpulp	cellulase(n)	gibberellinezuur
koffiepulp	β -glucosidase	aflatoxine
aardappelschillen	α -amylase	2-heptanon
banaanafval	glucoamylase	methylketon
citrusafval	xylanase	gluconzuur
tarwezemelen	pectinase	ethanol
roggestro	fytase	
sorgum	rennet	
cassave		
bagasse		





SOLID-STATE FERMENTATIE

- intrigerende fermentatie-techniek
- interessante mogelijkheden voor nieuwe en bestaande processen (natuurlijke additieven, agrificatie, schone technologie)
- veel (technologisch) onderzoek nodig
- gebruik maken van bestaande kennis (technologie vermomting, koji-processen)

M.L.D. Hagemans, Unilever Research Laboratorium

Titel : Fermentatie van brooddeeg

Tijdens het broodbereidingsproces verandert het deeg van een compacte visco-elastische stof naar een stof met schuimstructuur die tijdens het bakken overgaat in een stof met een sponsstructuur. Afhankelijk van het type (brood) deeg kan het 6 tot 13 keer in volume toenemen. Tijdens dit hele proces is het deeg onderhevig aan tal van (bio)chemische en fysische processen. Eén daarvan, de deegfermentatie, begint tijdens het kneden, gaat door tijdens de deegopmaak en het rijzen en eindigt in de laatste fase van het bakken.

De CO₂ produktie van de gist, oftewel de rijskracht, is het gevolg van de fermentatie van de in het deeg aanwezige vrije suikers. Daarnaast zorgt de gist voor de evenzo belangrijke geur- en smaakstoffen of precursors hiervan. In zuurdegen draagt vooral de fermentatie door melkzuurbacteriën in belangrijke mate bij aan de vorming van aromastoffen.

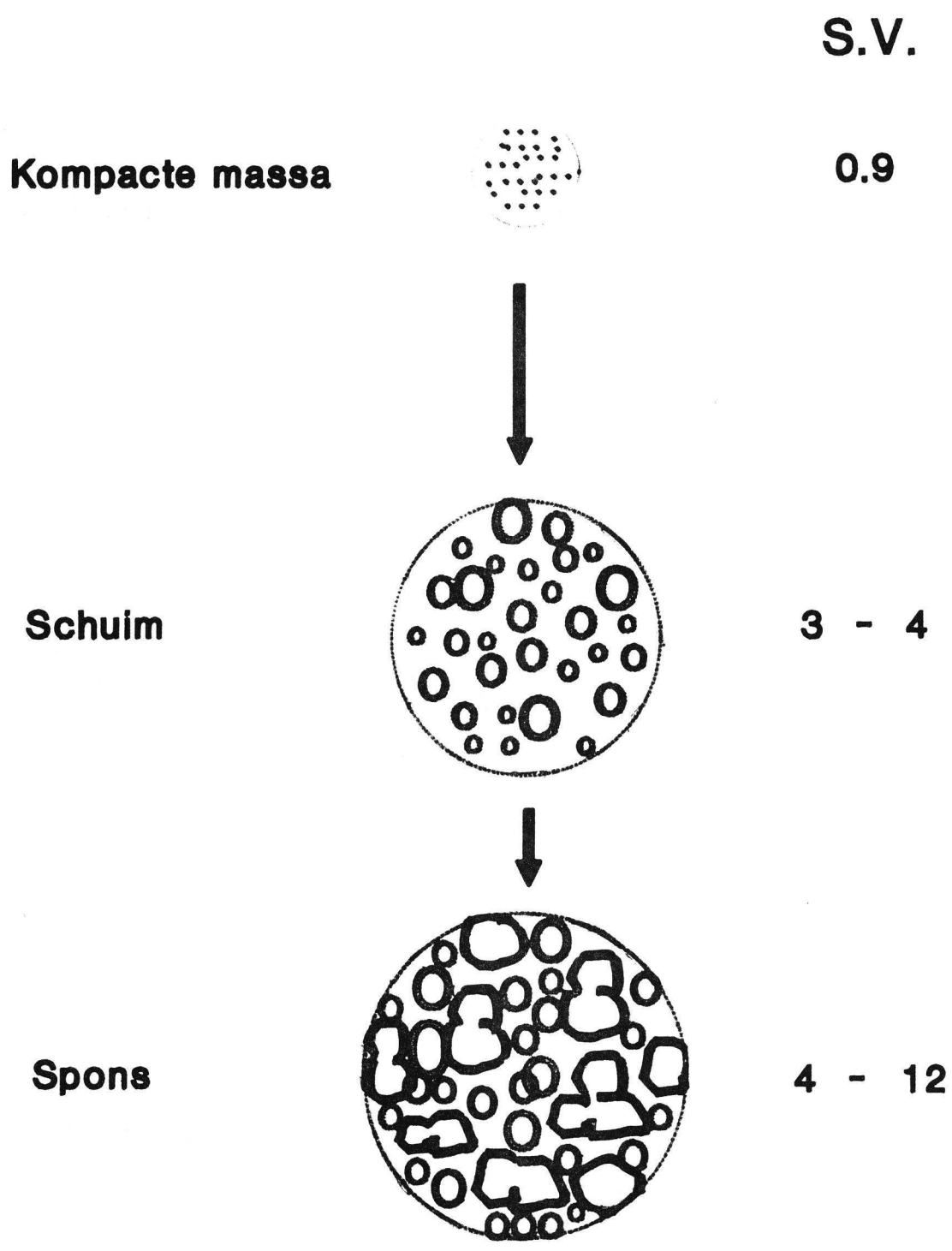
Het deeg is in staat het door de gist geproduceerde gas vast te houden en daardoor in volume toe te nemen. Dit gashoudend vermogen is onder andere afhankelijk van de bloemkwaliteit en toegevoegde hulpstoffen als oxidatoren, emulgatoren en enzymen. Ook de manier van kneden en bewerken speelt een belangrijke rol.

In deze presentatie zal de invloed van al deze variabelen op het gehele fermentatieproces kort besproken worden.

DEEGFERMENTATIE :

Vergroting van het volume

Verandering van de structuur



Brood : Indeling naar specifiek volume.

S.V.

Busbrood	}	4 - 6
Zacht luxe brood		
Stokbrood		7 - 10
Hard klein brood		9 - 12

GLUCOSE → KOOLZUURGAS + ALKOHOL + WARMTE

1 GRAM

0.5 GRAM

0.5 GRAM

113 KJ

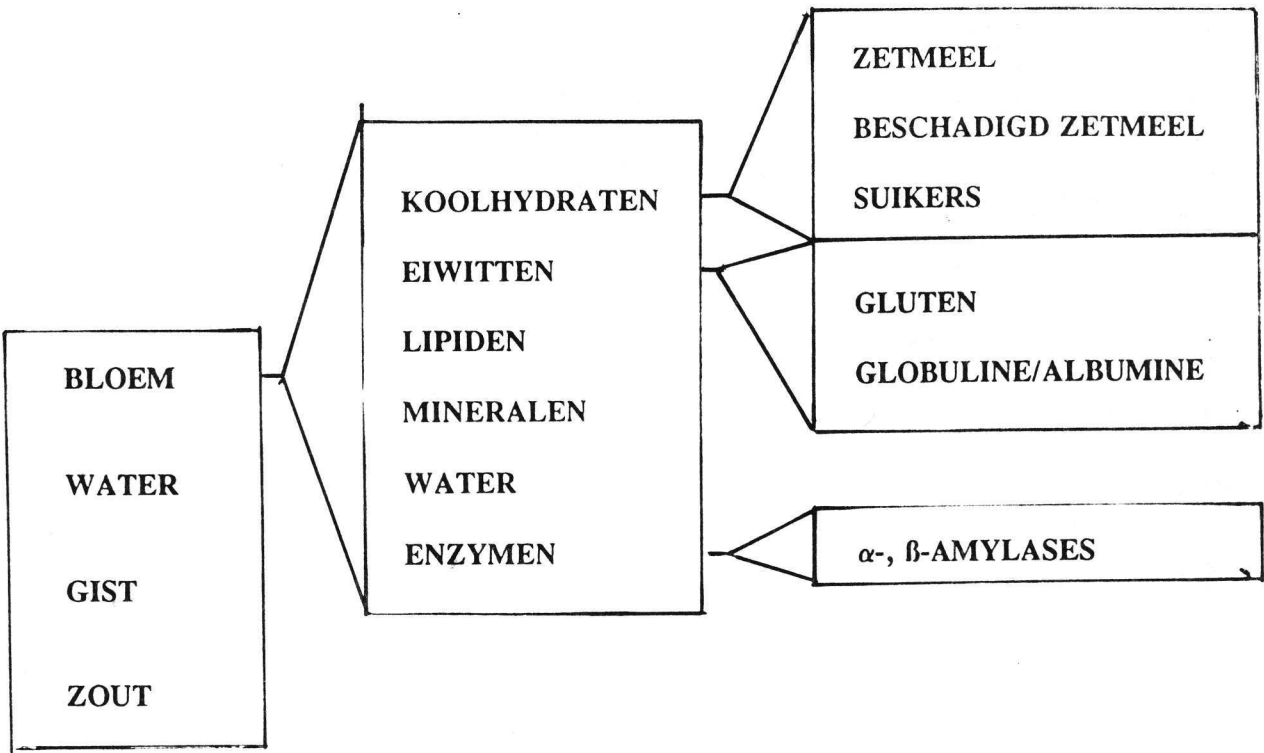
Bijproducten van de gist fermentatie :

Hogere alcoholen

Organische zuren

Carbonyl-verbindingen





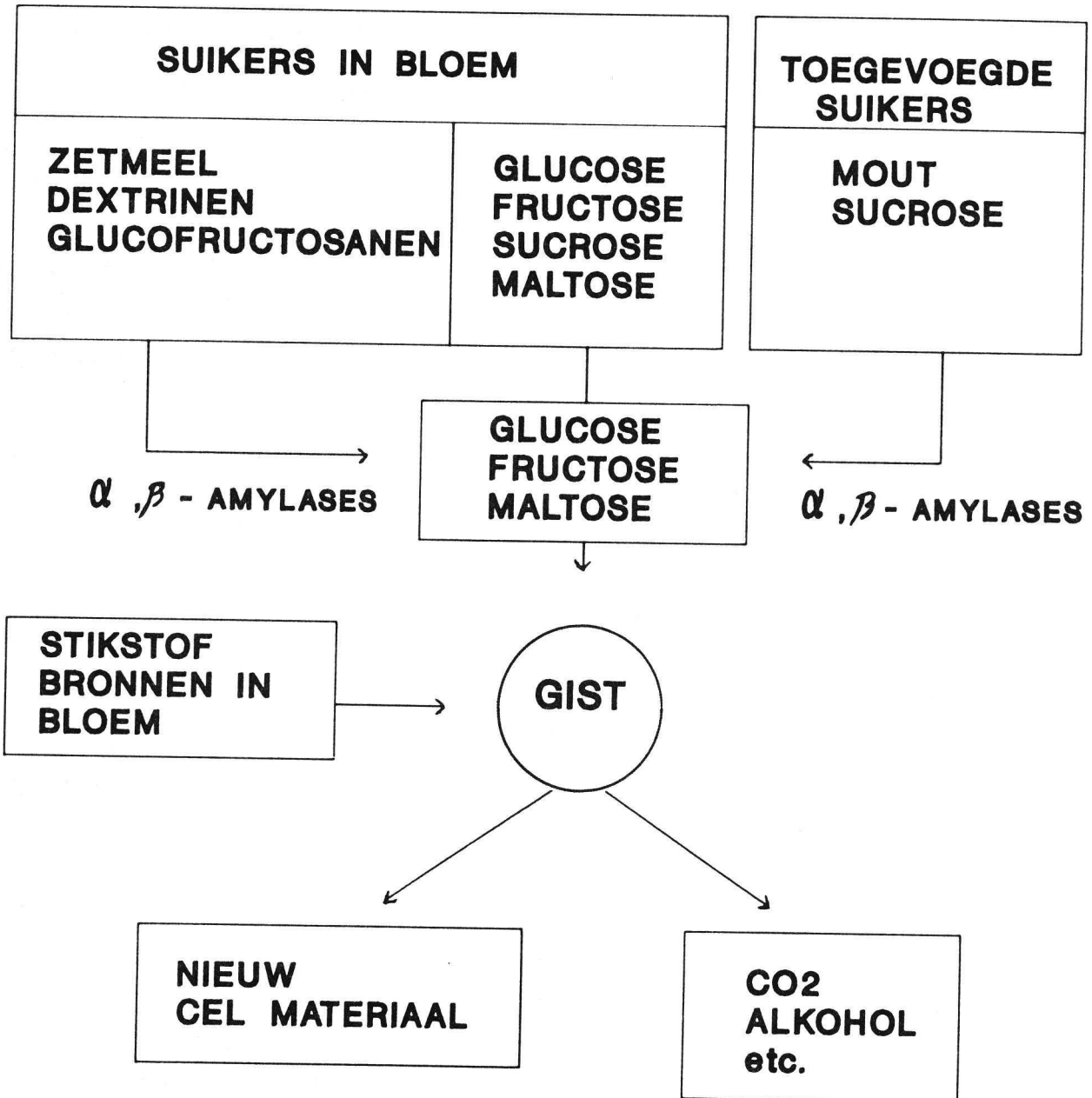
	%
BLOEM	100
WATER	50 - 70
GIST	1 - 8
ZOUT	0 - 2



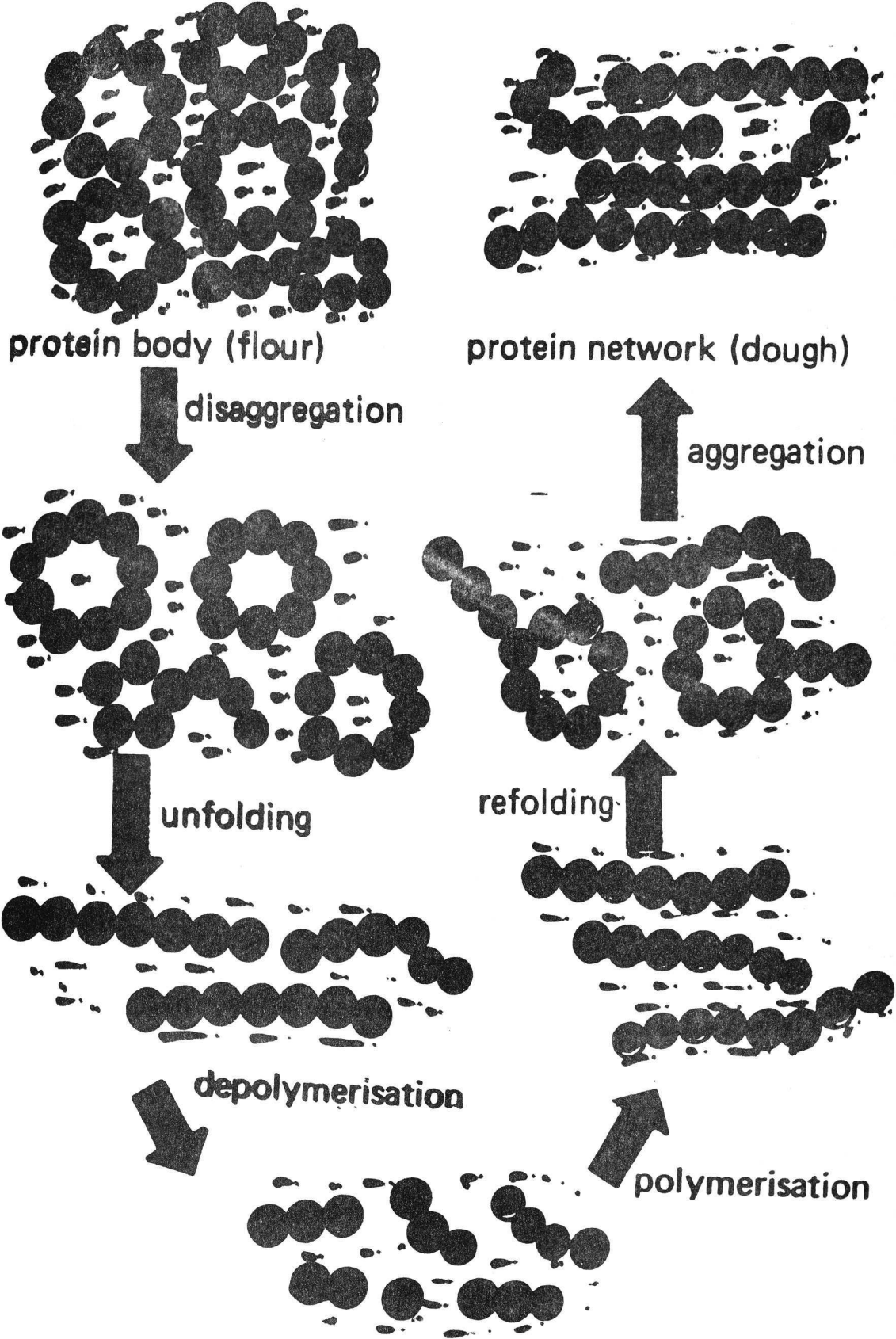
SAMENSTELLING VAN DE SUIKERFRACTIE IN BLOEM

	%
GLUCOSE	0.01 - 0.09
FRUCTOSE	0.02 - 0.08
SUCROSE	0.19 - 0.26
MALTOSE	0.07 - 0.10
OLIGOSACCHARIDEN	1.26 - 1.31

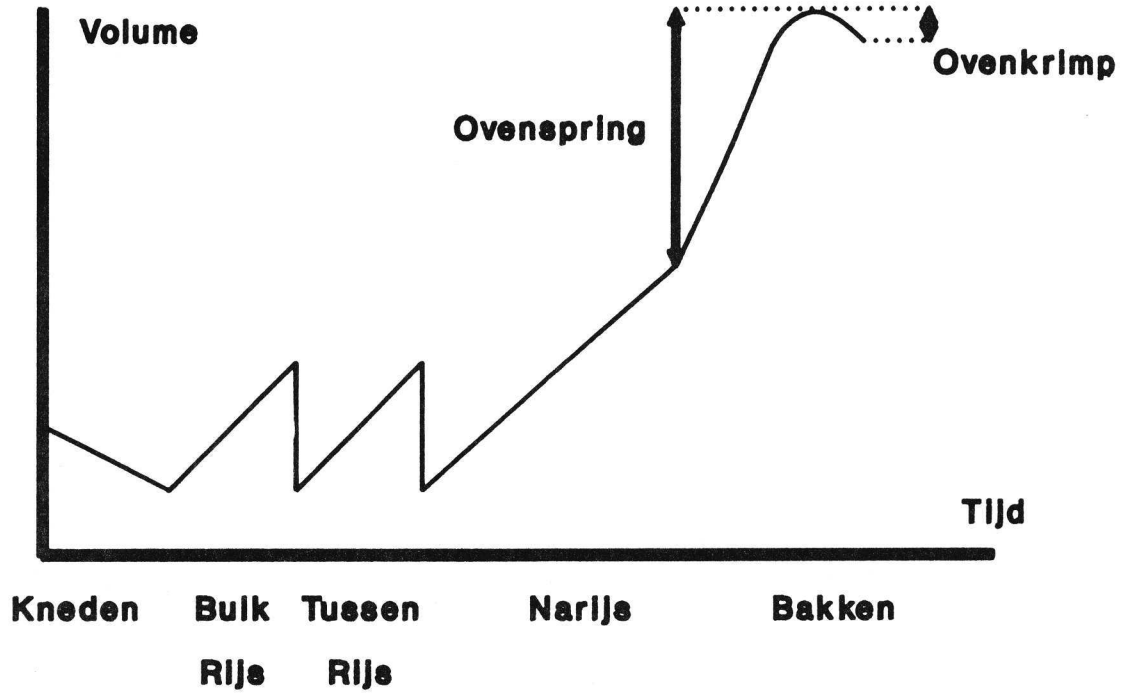




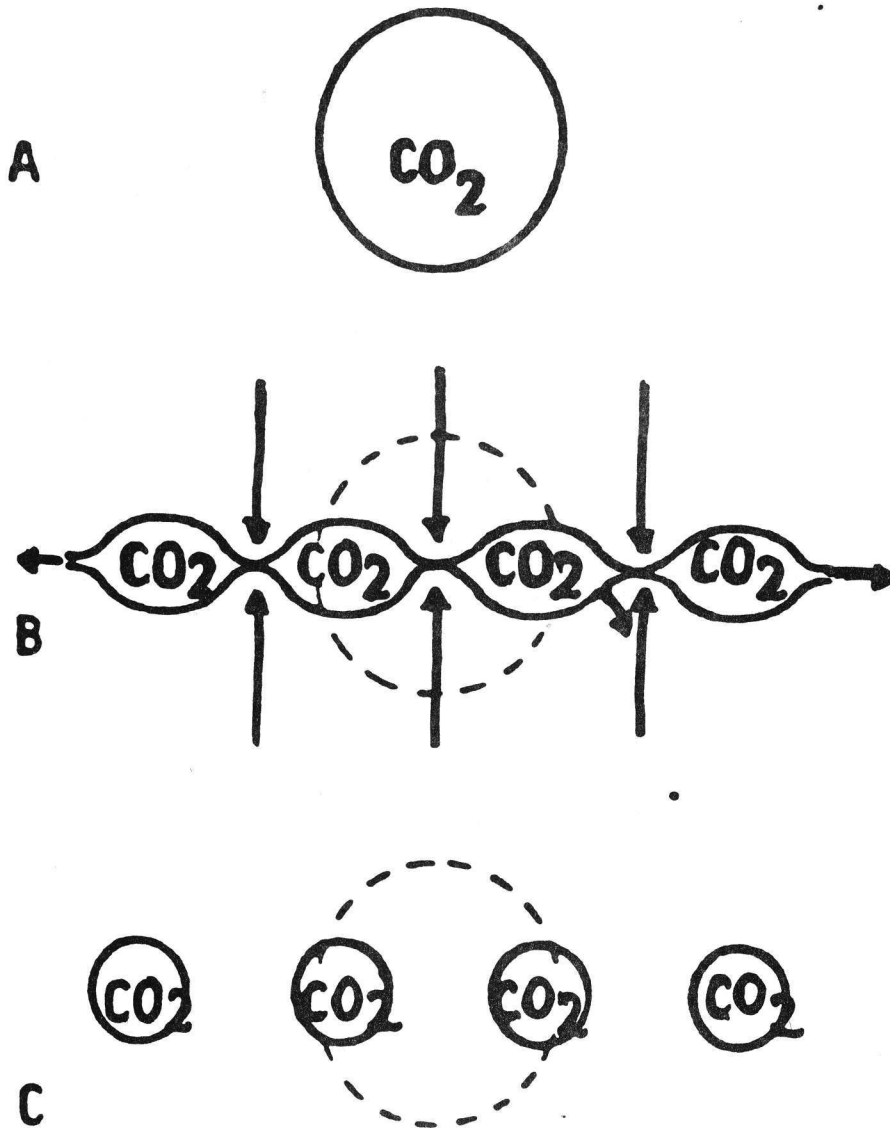
GLUTENINS FROM WHEAT FLOUR



Volume toename tijdens het broodberedingsproces



Vermeerdering van gascellen tijdens doorslaan



A : Gascel voor doorslaan

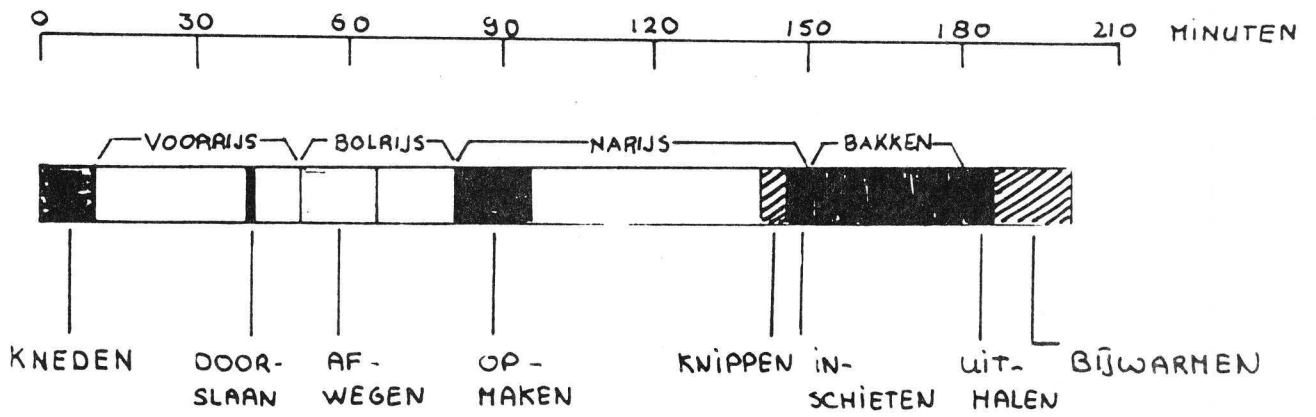
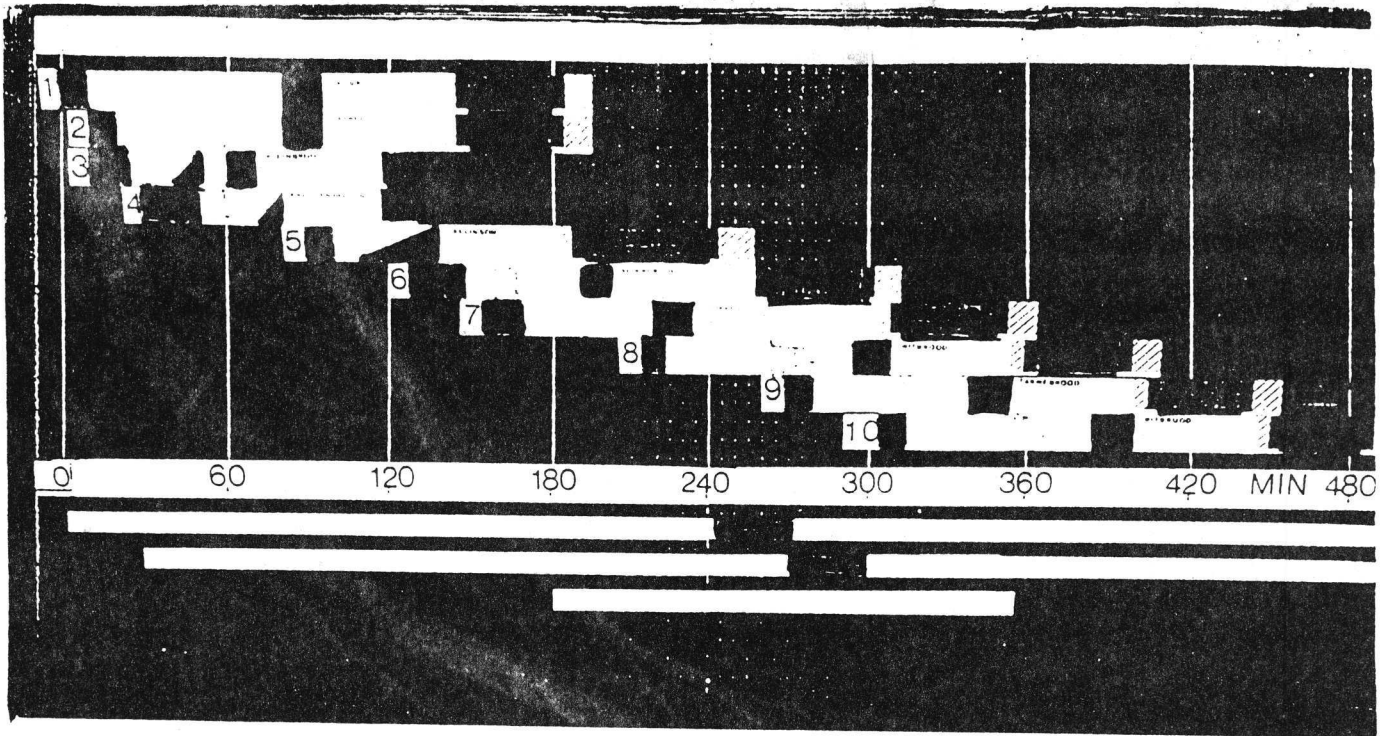
B : Deling van de gascel

C : Nieuwe gascellen na doorslaan

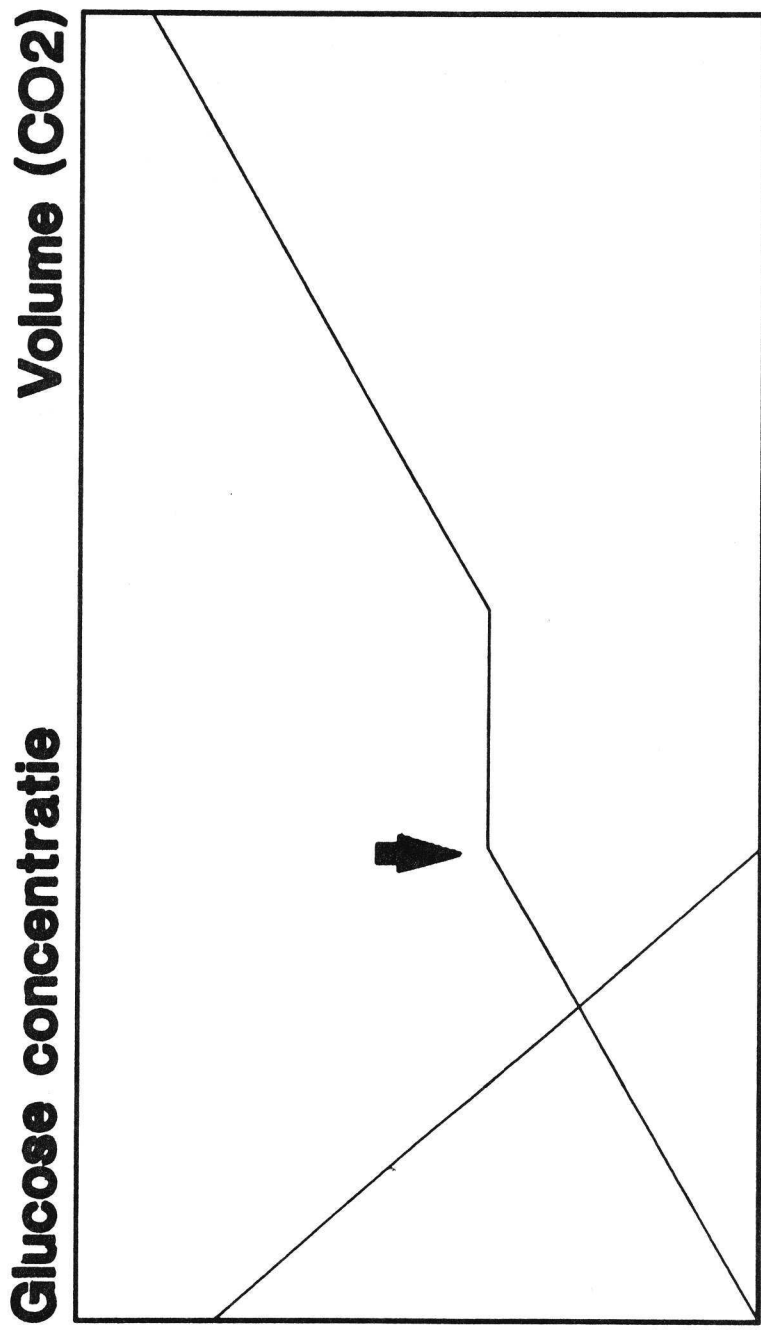
VARIATIE IN RIJSTIJDEN :

- PROCES (KNEDEDEN, OMGEVINGS-, DEEGTEMPERATUUR)
- TRADITIE (vb. STOKBROOD)
- WERKWIJZE :
 - PLANNING
 - CONVENIENCE





Maltase inductie

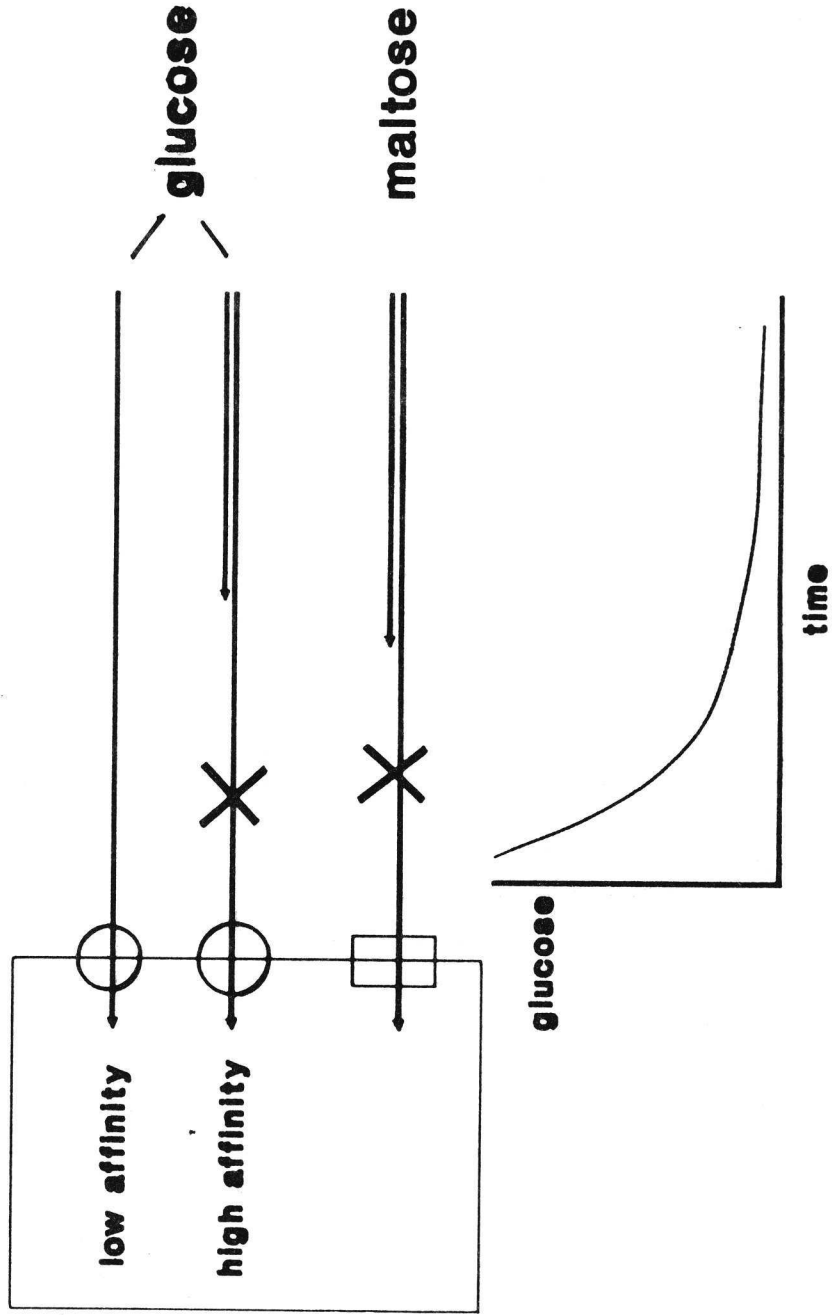


Fermentatie tijd

— Glucose — CO₂

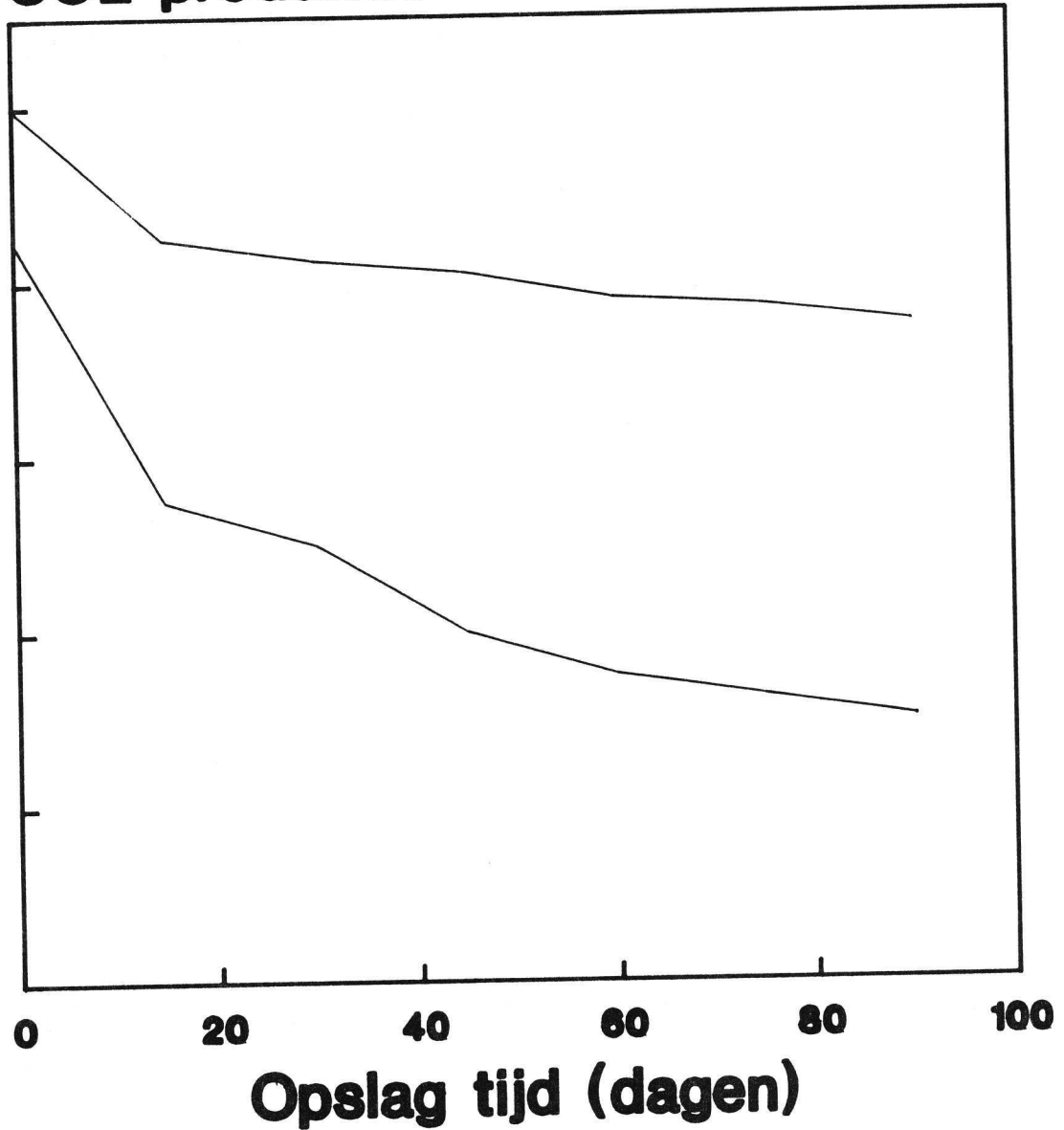


sugar transport in yeast



Aktiviteit van gist in diepvries degen.

CO2 produktie



— Niet stabiele gist — "Stabilele gist"



Split stream processing

Boterbereiding volgens het NIZO-proces

Achtergronden en condities voor de ontwikkeling van dit proces

In het continentale deel van Europa werd vanouds zure boter bereid door het karnen van gezuurde room. De karnemelk, die daarbij ontstaat, is, als gevolg van oxydatieve processen, slechts zeer kort houdbaar en was daarom vaak moeilijk te verkopen. Door het karnen van zoete room wordt zoete karnemelk vrijgemaakt, die bijzondere toepassingsmogelijkheden heeft, ook ten opzichte van ondermelk. Dit wordt vooral veroorzaakt door het karnproces, waarbij de vetbolletjes worden beschadigd.

Bij het karnen van zoete room ontstaat ook zoete boter, welke omgezet moet worden in zure. Dat betekent dat er geconcentreerde preparaten moeten worden ingekneed om voldoende verlaging van de pH van het serum in de boter en om voldoende aroma van zure boter in het product te verkrijgen. Een belangrijke aromacomponent is het diacetyl, dat gevormd wordt door bepaalde melkzuurbacteriën. Deze kunnen echter niet groeien in de boter vanwege de fysische structuur van het product, die nodig is om de groei van ongewenste bacteriën te voorkomen. Er mag slechts een beperkte hoeveelheid van de hierna genoemde hulpstoffen worden toegevoegd in verband met de eisen, die aan de samenstelling van het product worden gesteld.

Na een bepeelde ontwikkelingsfase is uiteindelijk een flexibel proces ontstaan dat op brede schaal wordt toegepast. Hiervoor zijn preparaten nodig in de vorm van zuurselpermeaat (concentraat van het product van de melkzuurbacteriën) en aromatisch zuursel, bereid met behulp van zuurselconcentraat (concentraat van de cellen van melkzuurbacteriën).

G. van den Berg

NIZO, afd. Technologie

NIZO-PROCES VOOR BOTERBEREIDING

(Achtergronden)

Traditionele zure boter

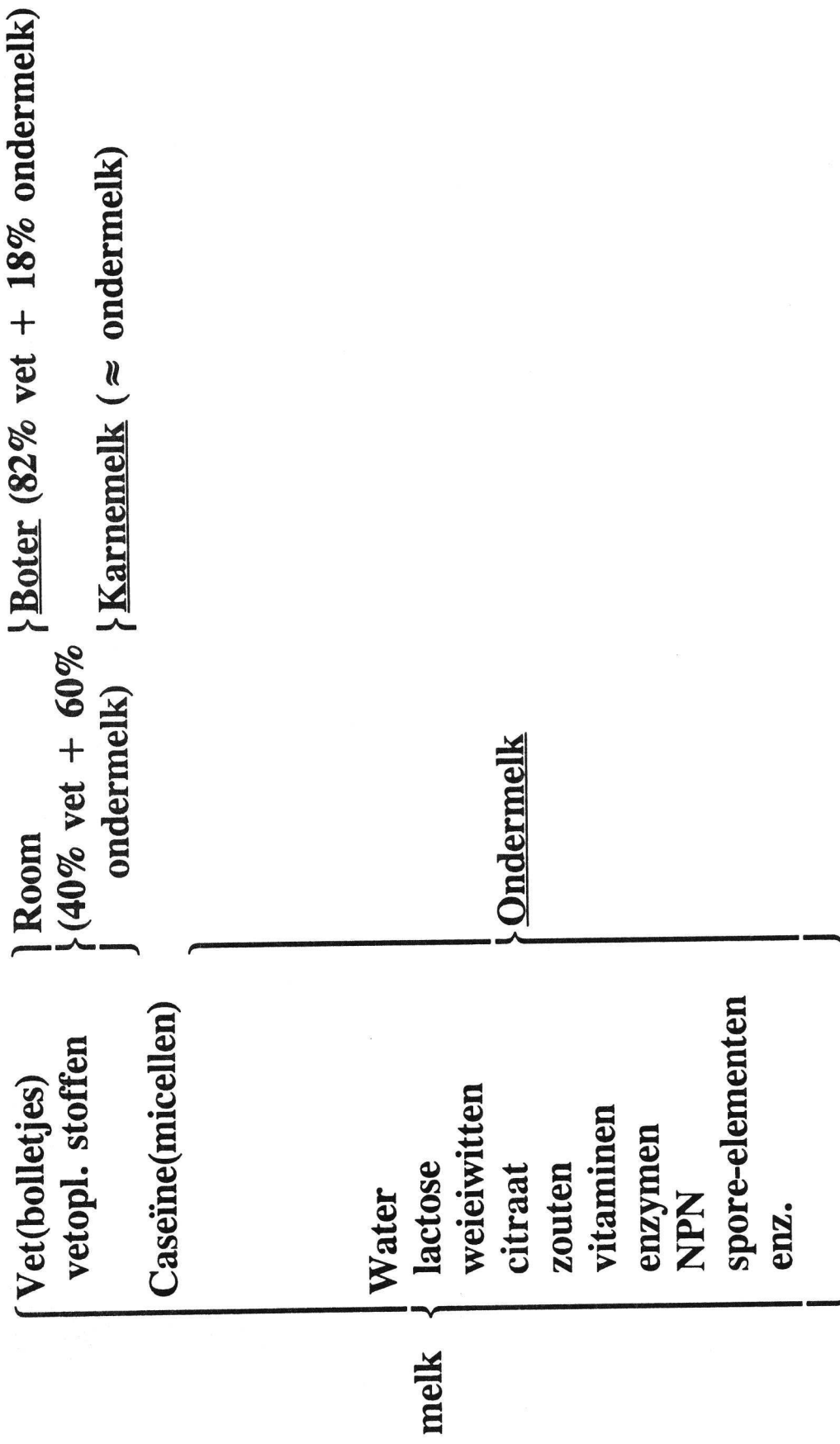
Probleem

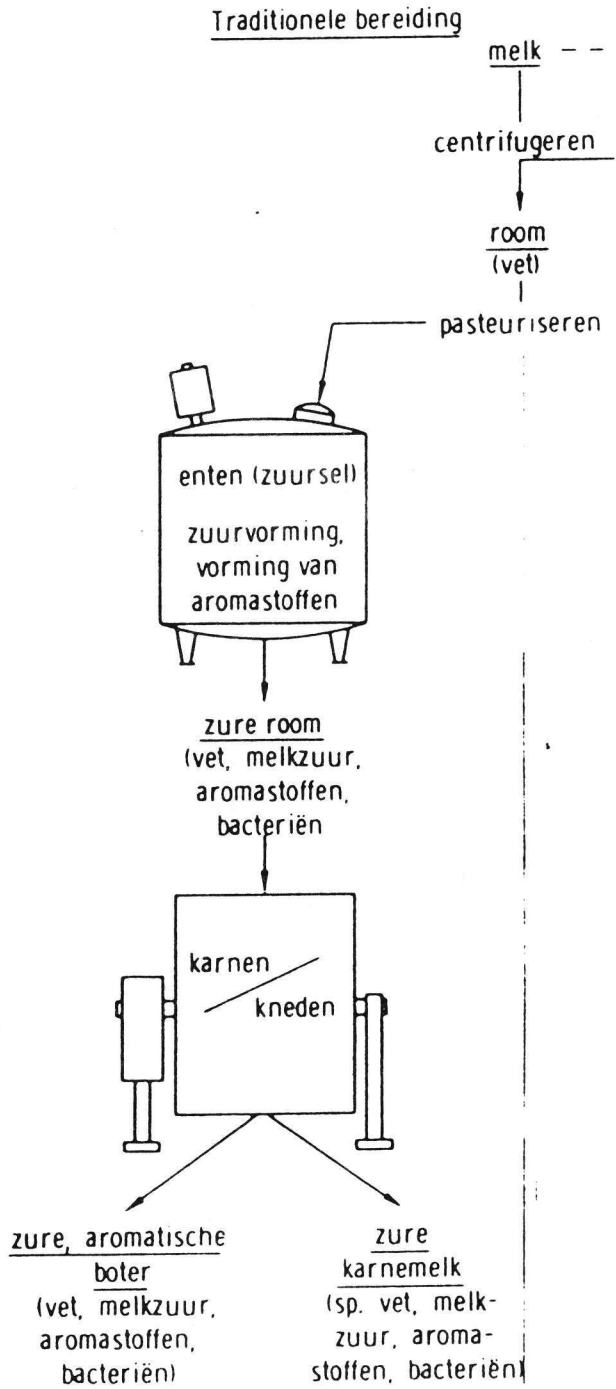
Voorwaarden voor oplossing

NIZO-proces

Hulpstoffen

BOTERBEREIDING





TECHNOLOGISCHE VOORWAARDEN

Bestaand proces handhaven

Laag basisvochtgehalte

**Concentraat aromatische bestanddelen (diacetyl) of
aromavorming in product**

Levende melkzuurbacteriën in product

Concentraat zure bestanddelen (melkzuur)

pH in boterserum ≤ 5.3

Fijne vochtverdeling

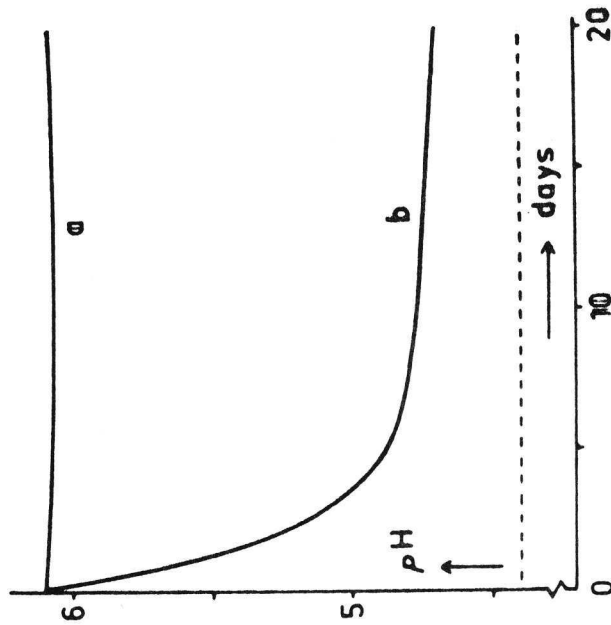
(MARKT)POLITIEKE VOORWAARDEN

Boter van tenminste gelijke kwaliteit

Geen melkvreemde stoffen

**Gewenste omzettingen alleen m.b.v. onschadelijke
melkzuurbacteriën**

**Alleen in de zuivelindustrie aanvaarde fysische
processen**



Verloop van de pH in boterserum bij bewaren op 17 °C. 10% zuursel onmiddellijk voor het karnen toegevoegd.

a: goed "droog" gekneed; b: minder "droog" gekneed (losvochtcijfer - COZ: 1); onderbroken lijn: gehele serum volledig uitgezuurd.

(Muisder & Walstra, 1974)

BOOSER PROCES

Zoete boter }
Aromatisch zuursel } kneden ⇒ "Zwitterbutter"
(geen aroma)

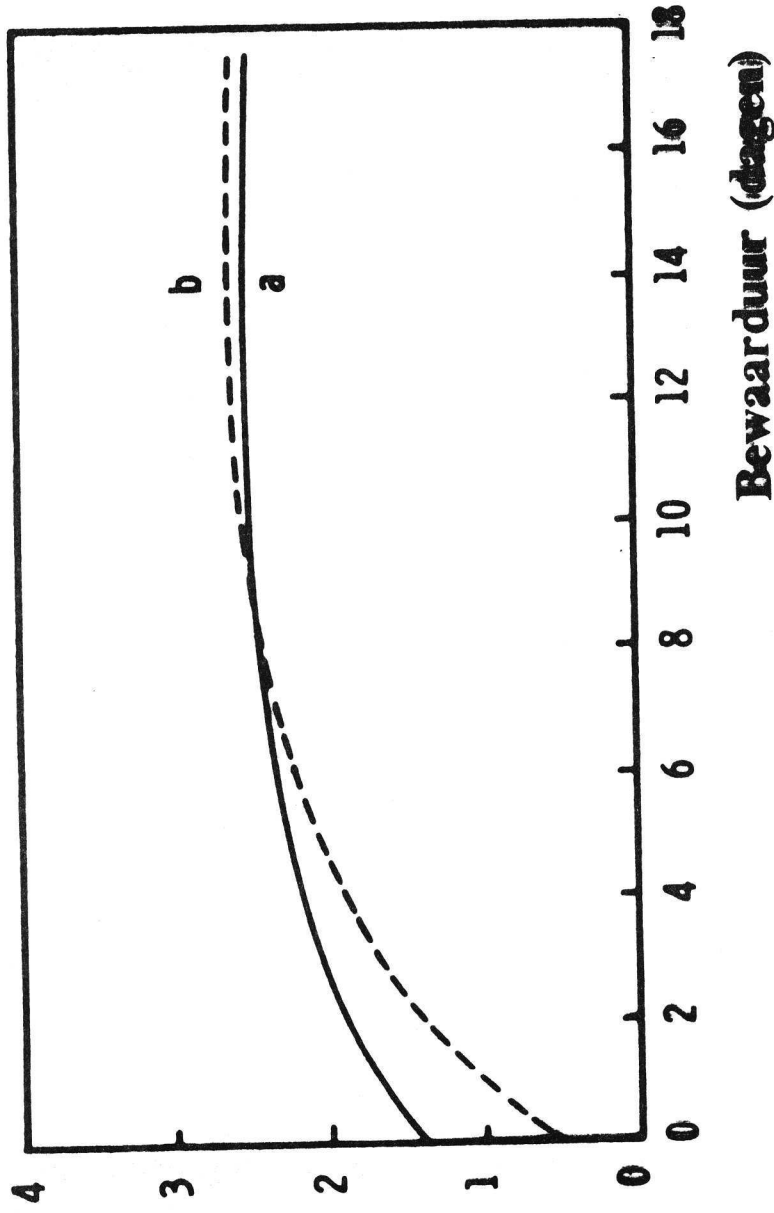
NIZO - PROCES

Zoete boter }
Aromatisch zuursel } kneden ⇒ Aromatische
- - - - - zure boter
Zuurselpermeaat }

**Diacetylgehalte van boter (na 14 dagen bij 14° C);
indirect bereid met 1.5% mengsel van de zuursels 4/25
en Fr19 (2:1) en verschillende hoeveelheden
zuurselpermeaat. Gemiddelde van 4 proeven.**

diacetylgehalte (mg/kg)			
pH 6.2	pH 5.7	pH 5.3	pH 4.7
1.0	1.6	2.4	1.8

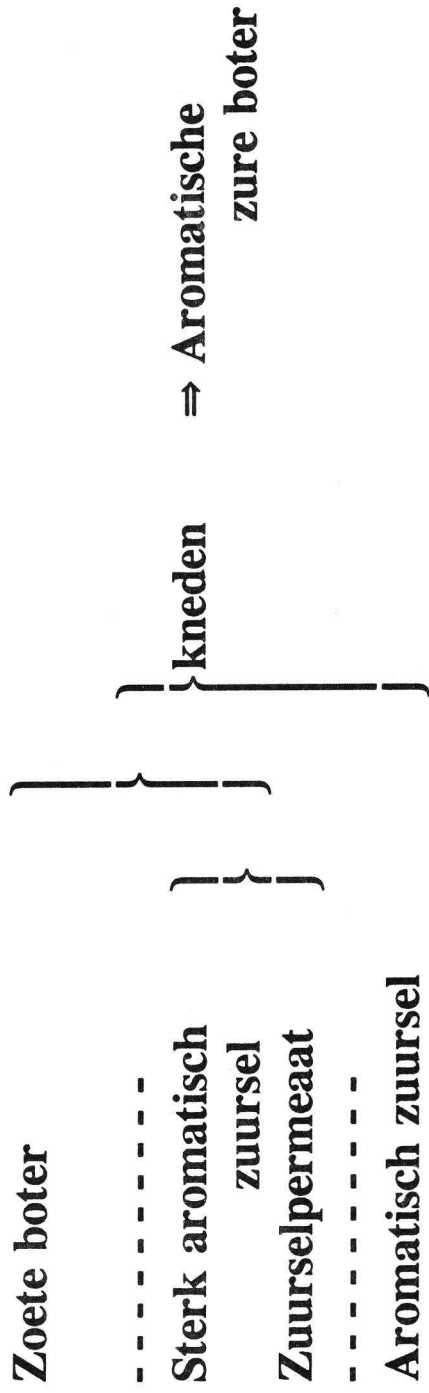
Diacetylgehalte (mg/kg)



Verloop van het diacetylgehalte in betel tijdens bewaren bij 14 °C.

a: traditioneel bereid uit zure room. b: bereid volgens het NIZO-proces, waarbij zuursel en zuurselpermeaat gescheiden zijn toegevoegd.

NIZO - PROCES (direct)



**BEREIDING (GECONCENTREERD)
ZUURSELPERMEAAT**



Samenvatting inleiding: split stream processing door ing. B.A.M.Hulshof

Bij de bereiding van gezuurde boter wordt traditioneel een zuurselcultuur gebruikt om de boter haar specifieke smaak te geven. Aan de hand van een aantal sheets wordt een overzicht gegeven van deze vorm van traditionele boterbereiding en een in de loop der jaren ontwikkelde methode, bekend onder de naam NIZO procédé. De voor- en nadelen van beide processen worden besproken.

Bij de huidige stand van de wetenschap en techniek wordt het boterbereidingsproces opgesplitst in een aantal separate deelprocessen. Het doel van deze werkwijze is een vergelijkbare en zo mogelijk betere kwaliteit boter te verkrijgen in relatie tot de traditionele bereiding. De deelprocessen omvatten: de bereiding van zuurselculturen, boter en karnemelk. De praktische bereiding van de verschillende culturen, de voorzorgen en controles welke gedaan kunnen worden, zullen besproken worden, alsmede de wijze waarop de dosering van de zuurselculturen in het boterbereidingsproces plaats vindt.

Omdat als gevolg van overschotten op de wereldmarkt, de produktiekosten enerzijds laag moeten blijven en anderszijds aan de kwaliteit steeds hogere eisen worden gesteld, werd ook mede door de zuivelindustrie zelf gezocht naar betere en efficiëntere produktiemethoden.

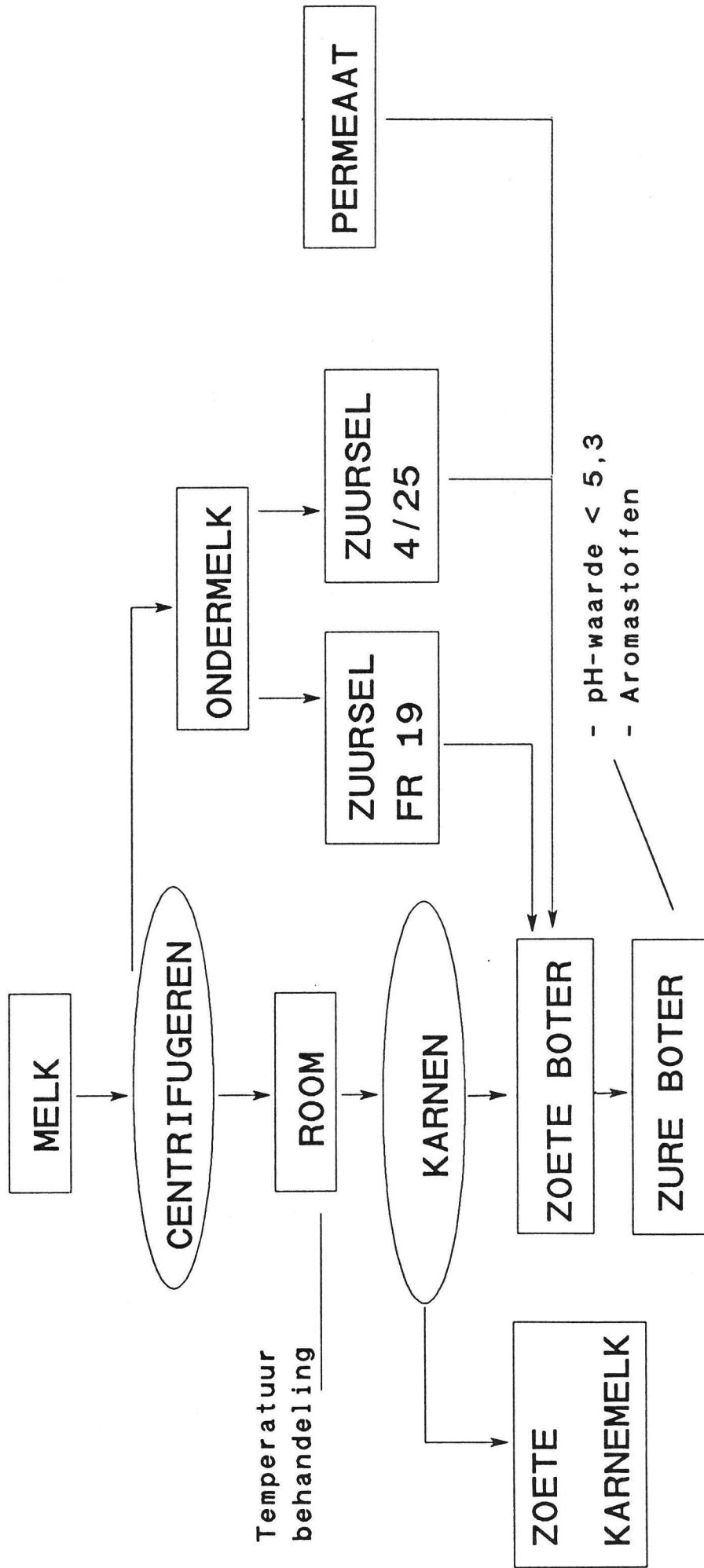
Het beeld wordt gecompleteerd door een schets van de ontwikkeling van noodzakelijke en voor dit doel betrouwbare randapparatuur. Als nevenprodukt van de boterbereiding blijkt de zoete karnemelk door zijn samenstelling veel toepassingsmogelijkheden te hebben als grondstof voor verwerking in andere zuivelprodukten.

Tenslotte wordt de beheersing van de samenstellingseisen van boter, de kwaliteit van het produktieproces en de evaluatie van de bereikte eindkwaliteit uit het split streamproces nader belicht.

Overzicht inleiding:

1. Proces: flowstream melk --> boter
2. Samenstelling en beoordeling gezuurde boter
3. Status in de landen van de EG
4. Zuurselbereiding: apparatuur en werkwijze
5. Boterbereiding:
 - beschrijving machine en proces incl. zuurseldosering
 - ontwikkeling randapparatuur
6. Voorwaarden voor beheersing van:
 - samenstelling
 - proceskwaliteit
 - bacteriologische aspecten
7. Voordelen NIZO-proces (karnemelk)
8. Evaluatie eindproduktkwaliteit

FLOWSTREAM (Split stream proces)



SAMENSTELLING GEZUURDE ONGEZOUTEN BOTER

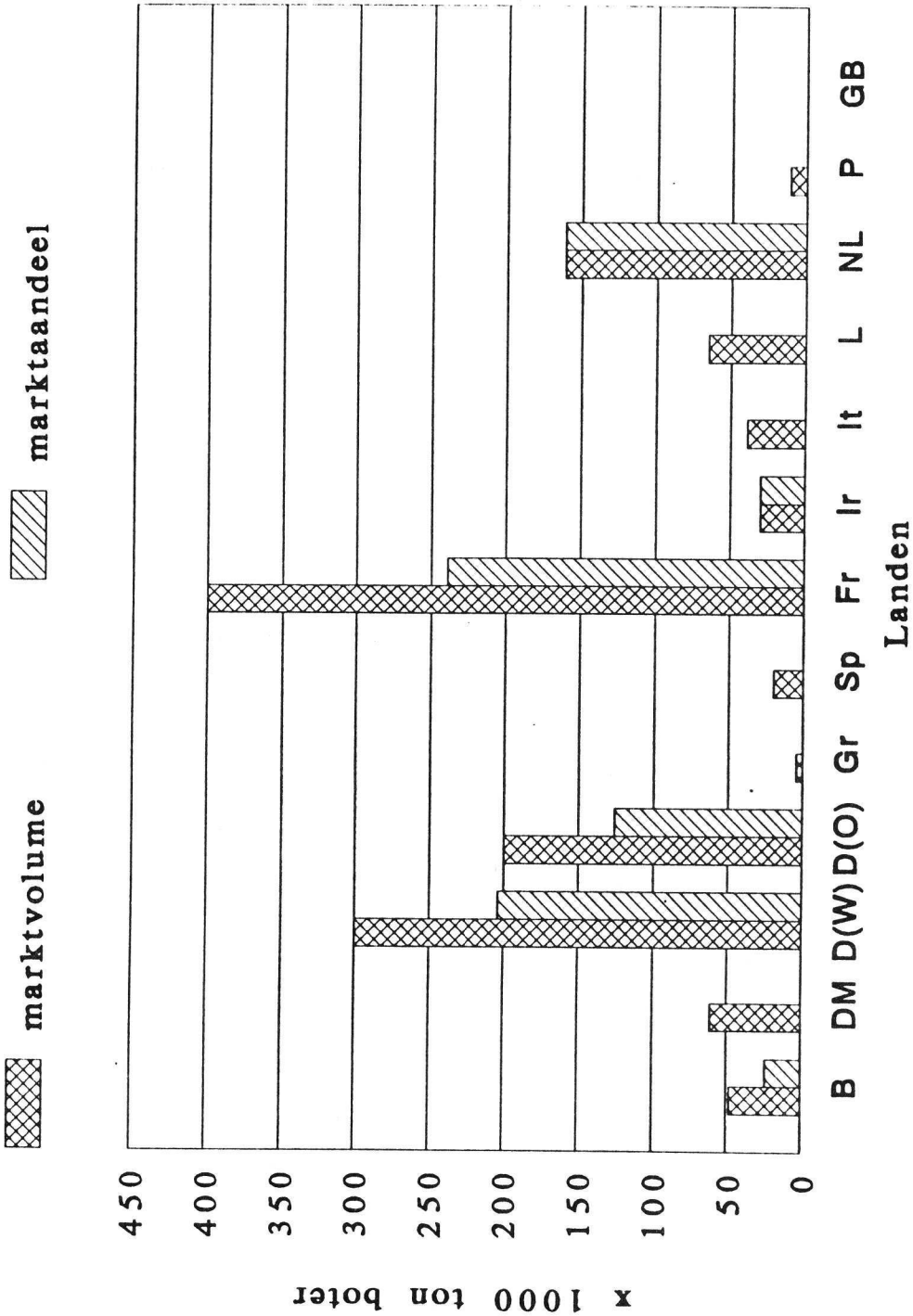
- vetgehalte min. 82%
- watergehalte max. 16%
- vetvrije droge stof max. 2%
- pH < 5.3

BEOORDELING OP:

- consistentie (temp. behandeling room)
65 < stevigheid > 22 14(KH)
- geur en smaak (diacetyl > 1 mg/kg)
- uiterlijk
- vochtverdeling < 1
- microbiologische hoedanigheid

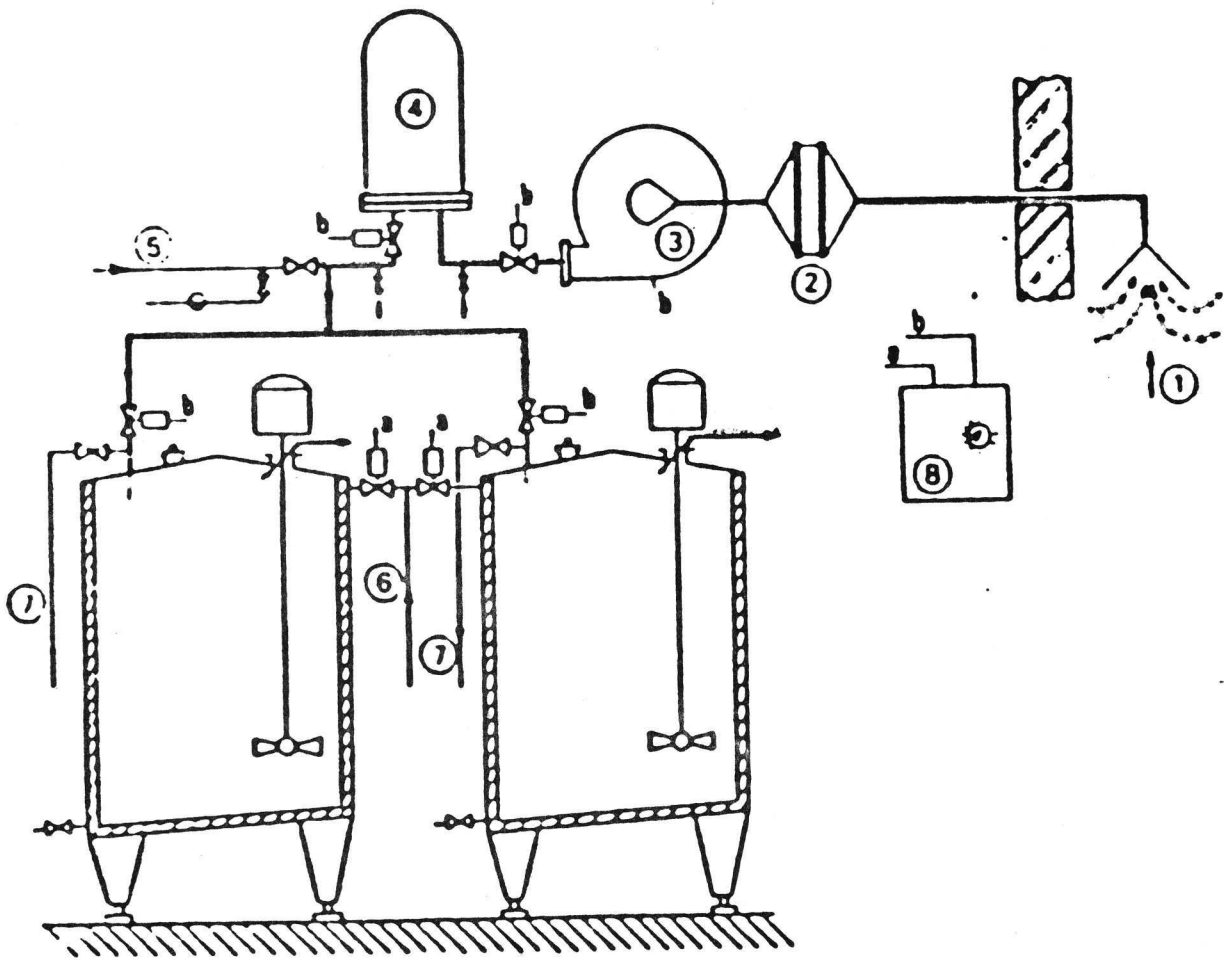
PRODUKTIE NIZO-BOTER

Zure boter per land 1990



totale boterproductie : 1.6 milj ton/jaar
 aandeel zure boter : 1.3 milj ton/jaar
 aandeel NIZO boter : 780.000 ton / -
 ruim 60% zure boter is NIZO boter.





1 aanzuiging buitenlucht

2 voorfilter

3 ventilator

4 HEPA-filter

5 stoomtoevoer

6 koelwatertoevoer

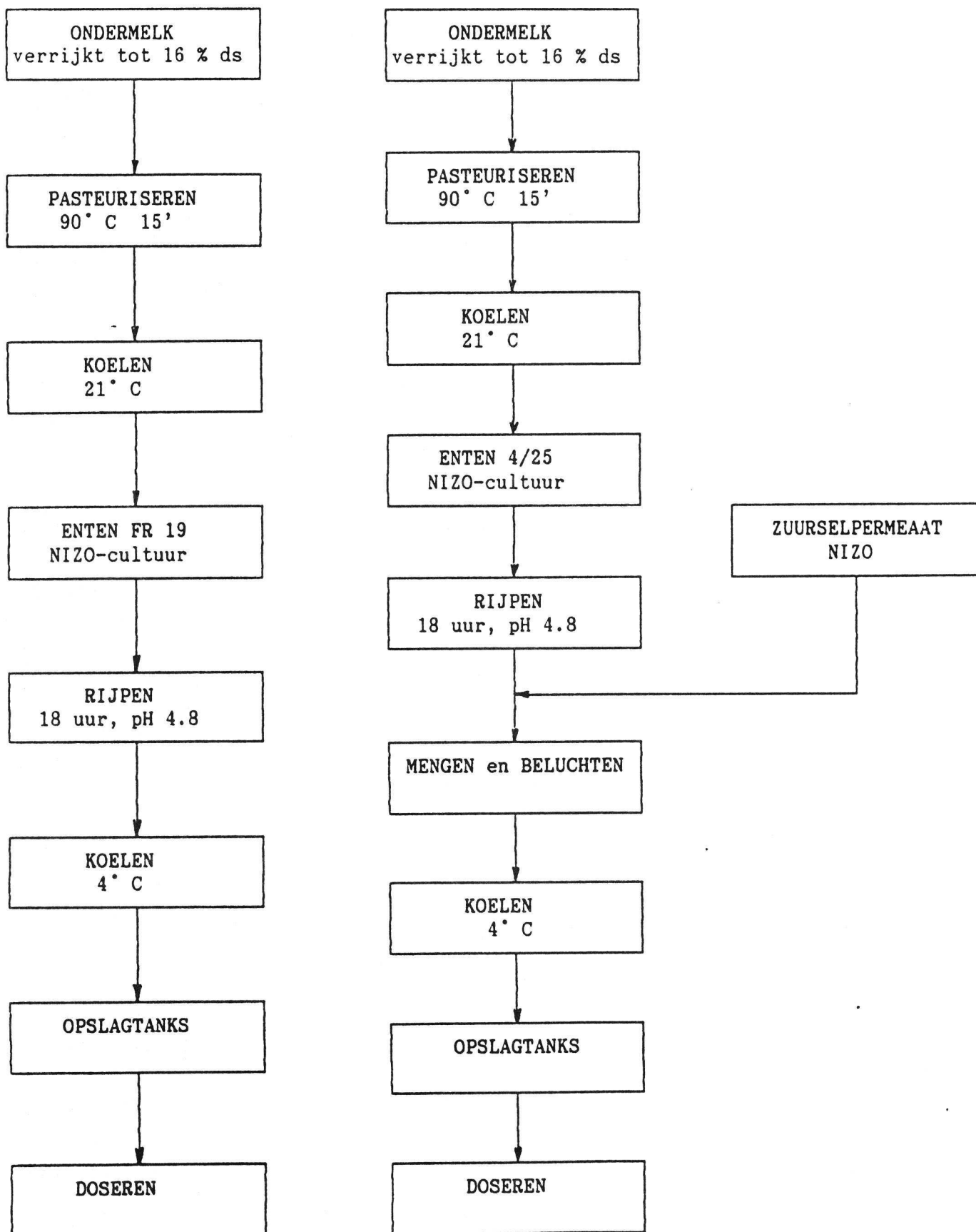
7 dampafvoer

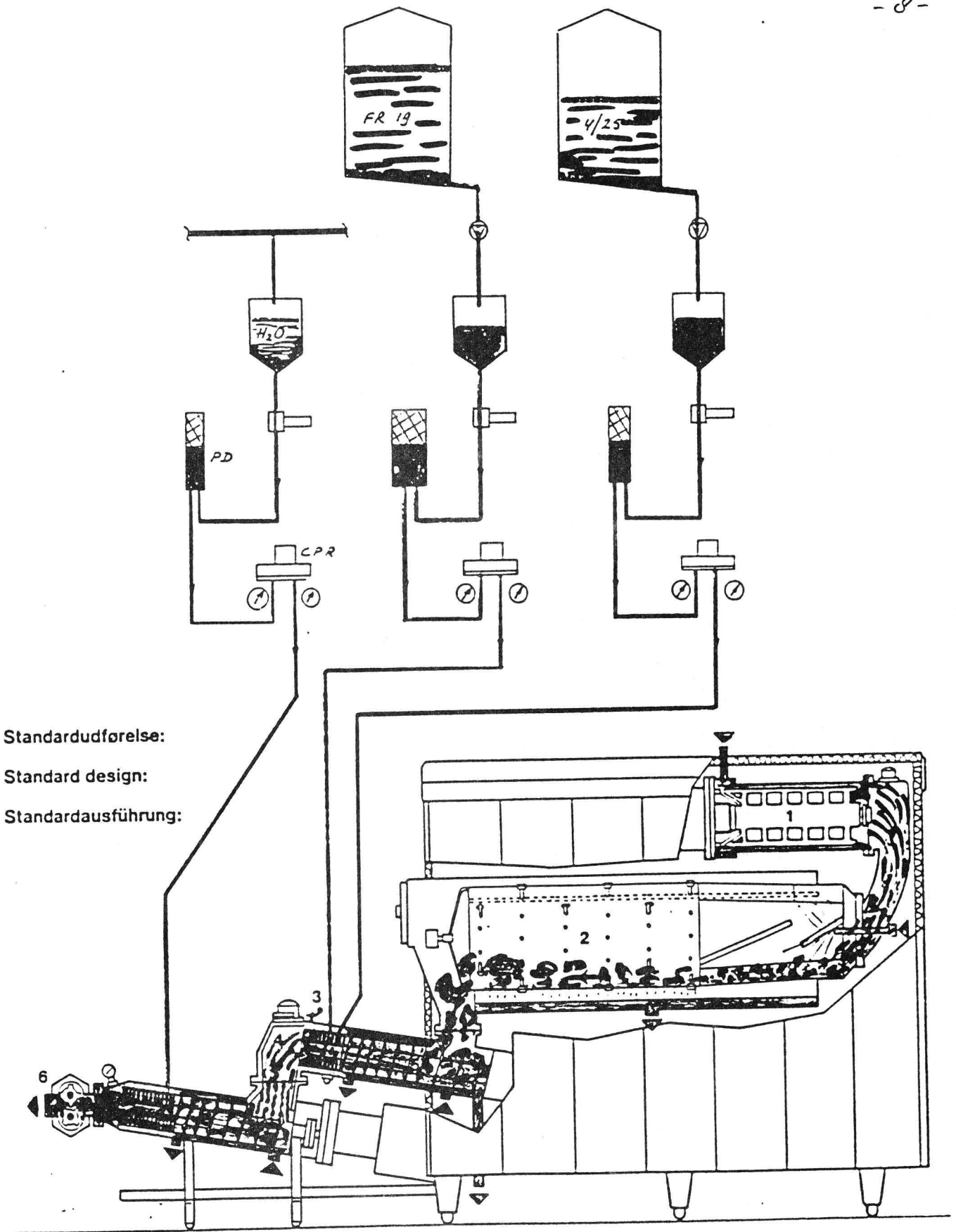
8 schakelpaneel

a koelwaterafsluiters (na handbediende afsluiter)

b afsluiters beluchtingssysteem

b openen vóór a

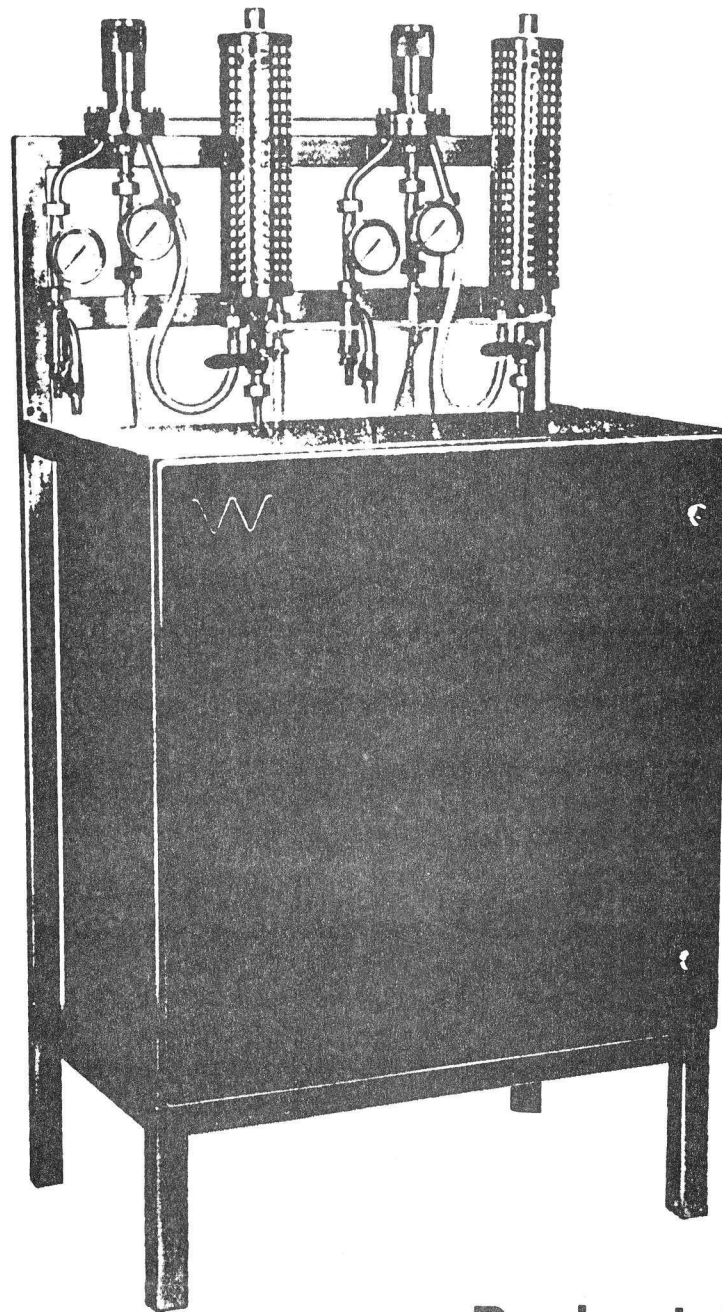
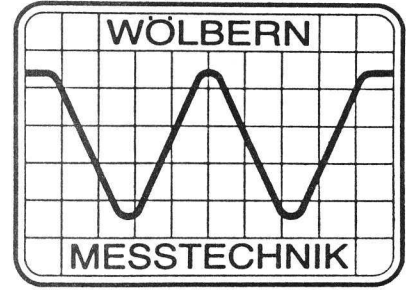




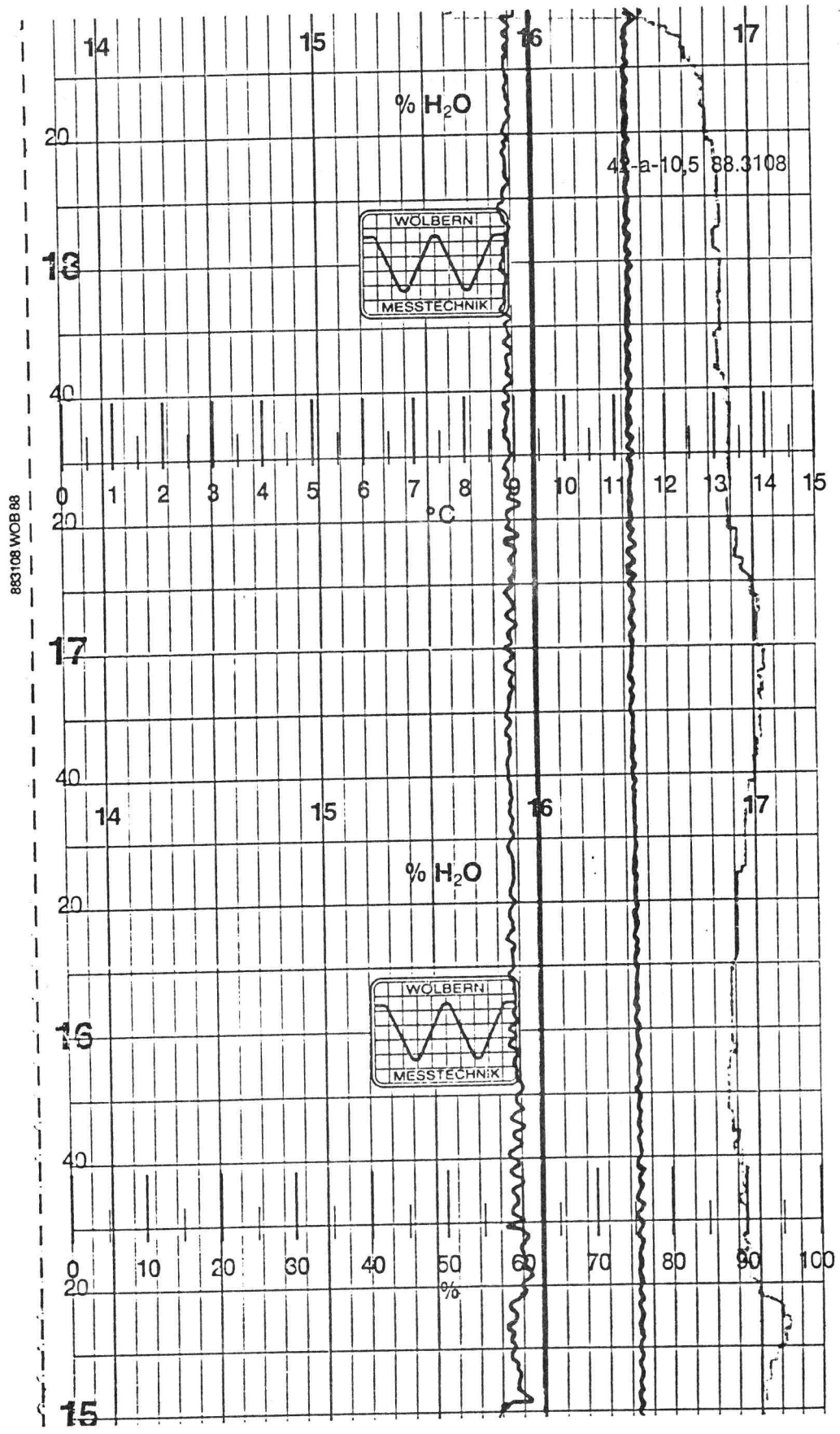
Standardudførelse:
Standard design:
Standardausführung:

HEINZ WÖLBERN

Feinwerk- und Messtechnik



Dosierstationen
dosing systems



883108 WOB 88

ANDERE VOORDELEN NIZO-PROCES:

- 1. Minder oxydatiegevaar**
- 2. Minder kans op "rans"**
- 3. Consistentiebeheersing onafhankelijk van aromavorming**
- 4. Vrijere zuurselkeuze**
- 5. Meer flexibiliteit**
- 6. Betere procesbeheersing**
- 7. Minder kans op te dikke karnrijpe room**
- 8. Betere beheersing samenstelling**
- 9. Minder zuursel per kg boter nodig**

THE APPLICATIONS OF IMMOBILIZED LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTATION PROCESSES.

Mark R. Smith and Jan A.M. de Bont

Division of Industrial Microbiology, Department of Food Science, Agricultural University, PO Box 8129, 6700 EV Wageningen.

Fermentation processes are currently based on the exploitation of free, growing microbial cells. For more than a decade, however, it has been recognized that the use of immobilized microbial cells in these processes may be advantageous. Immobilization of cells involves the fixing on or in an inert carrier by one of three principal methods: entrapment, adsorption to a solid support or physical restraint (by membranes or fibres). The advantages of immobilized cells over free cells are:

- * They can be used in continuous processes in which the cells, also at high dilution rates, are retained in the bioreactor
- * High cell densities can be employed
- * Products can be recovered more easily as they are not contaminated by biomass
- * Their use generates less biomass and hence, processes involving immobilized cells are more environmentally friendly

In spite of these advantages immobilized cells have been commercialized in only a few instances. This limited use of immobilized cells may be partially, but by no means entirely, explained by inherent disadvantages such as cost of immobilization and mass-transfer limitations created by the immobilization matrix and by the use of high cell densities.

This presentation will provide an introduction to the use of immobilized cells in fermentation processes, highlighting the types of immobilization and the advantages and disadvantages these offer. The remainder of the talk will concentrate specifically on the uses and potential uses of immobilized lactic acid bacteria.

Lactic acid bacteria are extensively employed in the manufacture of fermented foods from raw agricultural products (milk, meat, vegetables, cereals). Attempts to improve these processes are constantly being made. It may be predicted, from our current knowledge, that the use of immobilized cell technology has a role to play in improving lactic acid bacteria fermentations. In this context aspects such as, the generation of stable mixed cultures, the use of continuous processes and the specific production of food additives (proteolytic enzymes, flavours, natural preservatives) from agricultural materials will be discussed.

**THE APPLICATIONS OF IMMOBILIZED LACTIC ACID
BACTERIA IN FERMENTATION PROCESSES.**

MARK R. SMITH & JAN A.M. de BONT
DIVISION OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
AGRICULTURAL UNIVERSITY WAGENINGEN

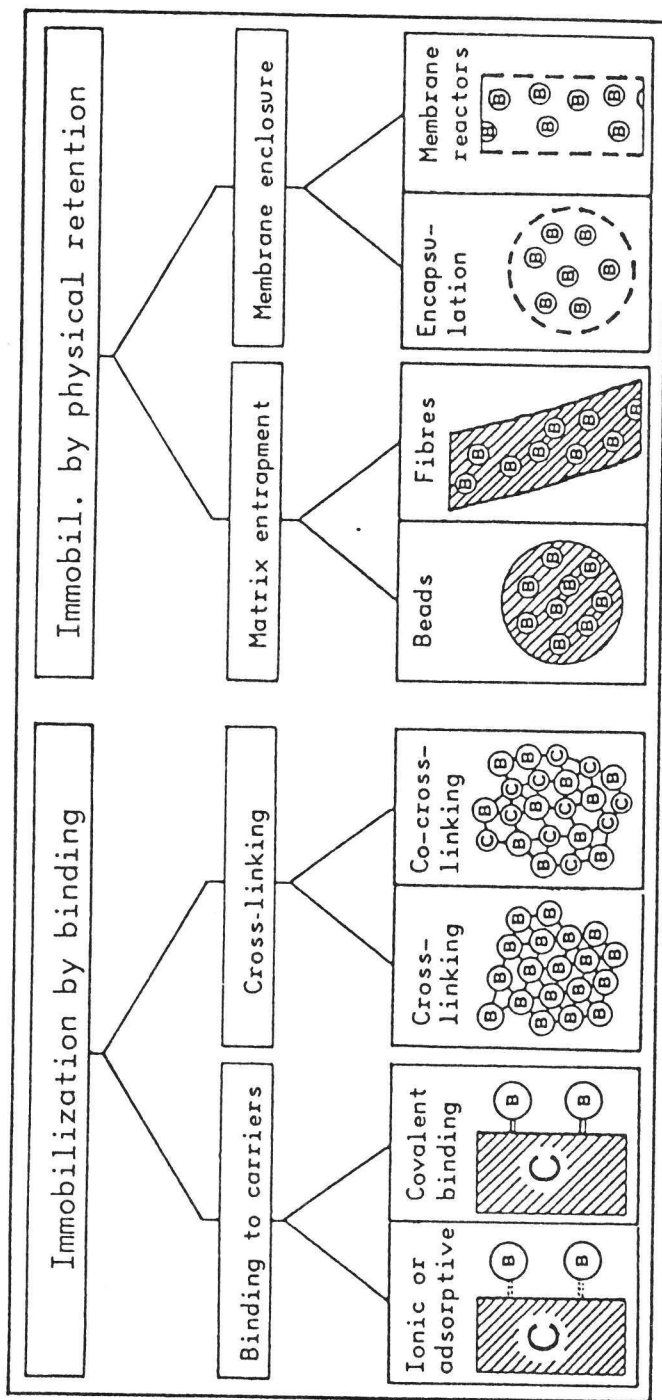
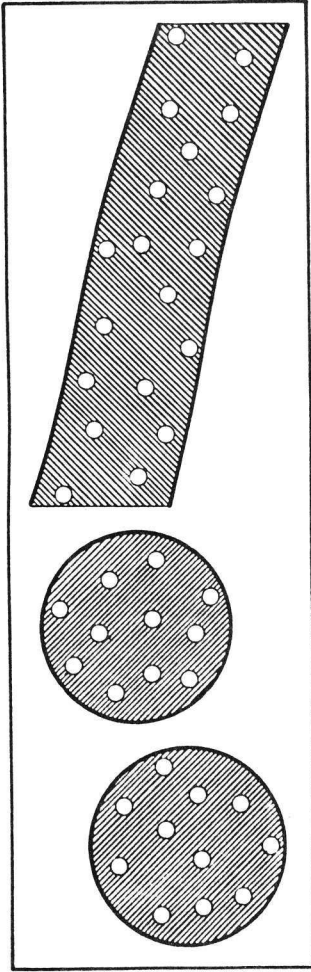


Fig. 4. Classification of immobilized biocatalysts;
 B biocatalyst unit; C carrier unit

Matrix Entrapment.



Matrix-entrapped biocatalysts in spherical and fibre form.

<u>Examples</u>	<u>Hardening principle</u>
Agar, gelatine	Thermoreversible gelation
Alginate, carrageenan	Ionotropic gelation
Cellulose acetate	Solvent precipitation
Polystyrene	
Epoxy resins	Polycondensation
Polyurethane	
Poly Acrylamide	Polymerization

Methods for entrapping cells

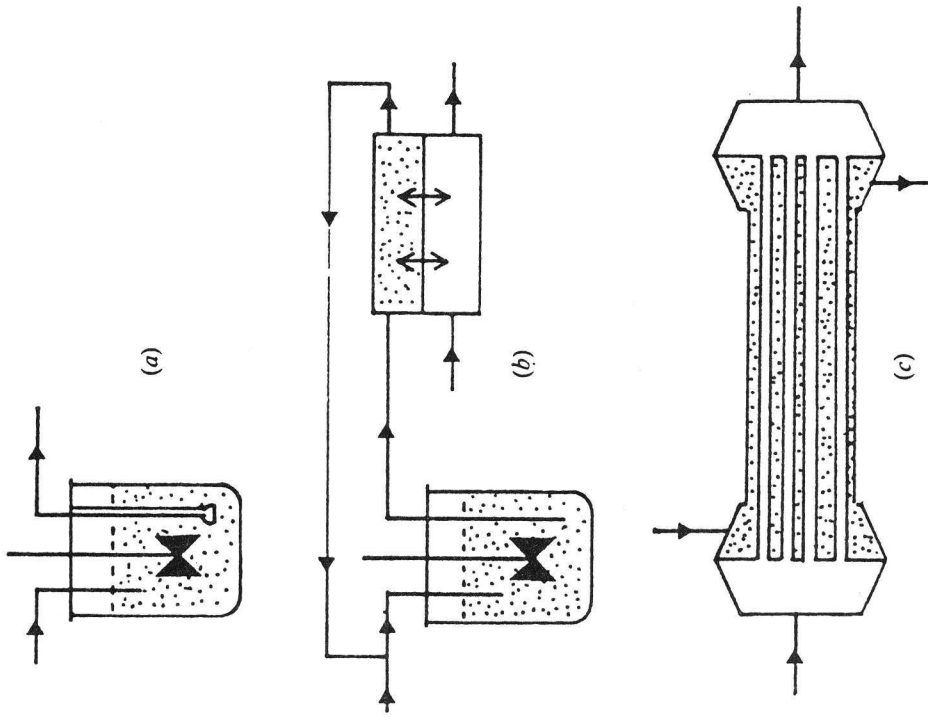


Figure 3.7. Diagrammatic representation of three types of membrane reactor system for cell immobilization. (a) Membrane separating the outlet stream from the reactor contents; (b) external recycle loop with membrane separation unit; (c) hollow-fibre unit used as a single unit membrane reactor.

ADVANTAGES.

- * Continuous Processes
(high-dilution rates)
- * High cell densities
- * Product recovery
- * Less waste
- * Plasmid stability
- * Tailoring to bioreactor

Disadvantages

- * Costs
- * Mass-transfer limitations
- * Free cells
- * Control
- * Stability
- * Poorly understood

Lactic Acid Bacteria:

Uses:

- * Lactic acid production**
- * Fermented Dairy products**
- * Vegetable fermentations**
- * Meat & fish fermentations**
- * Beverages**
- * Soy sauce**
- * Silage**
- * Bakery products**
- * Probiotics**

**Potential Role Of Immobilized
Lactic Acid Bacteria.**

- * Lactic acid production
- * Starter cultures
- * Flavour production
- * Production of proteolytic enzymes
- * Bacteriocins
- * Plasmid Stability

* Lactic acid production

a) entrapment/adsorption:

Table 1. Comparison of different immobilized systems for lactic acid production by *Lactobacillus* spp.

Organism	Immobilization support and reaction system	Sugar concentration (g/l)	Sugar utilization (%)	Sugar conversion to lactate (%)	Lactic acid productivity ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	Reference
<i>L. delbrueckii</i>	Alginate	Glucose, 48	NR	83	NR	Stenroos et al. (1982)
	1. Packed bed 2. Batch, recycle	Glucose, 48	NR	97	NR	Stenroos et al. (1982)
<i>L. casei</i>	Polyacrylamide, batch	Lactose, 45	73	90	0.54	Tuli et al. (1985)
	Agar, batch	Lactose, 45	80	90	0.70	Tuli et al. (1985)
<i>L. helveticus</i>	Alginate, packed bed	Lactose, 50	50	NR	8.00	Boyaval and Goulet (1988)
<i>L. helveticus</i>	Alginate, packed bed (3 columns in series)	Lactose, 38.5	NR	82	2.60	Roy et al. (1987)
<i>L. delbrueckii</i>	Alginate, batch	Glucose (conc. not stated)	≈90	91	1.52	Nomura et al. (1987)
	Porous sintered glass	Lactose, 40	100	NR	5.5 (D=0.22)	Krischke et al. (1991)
	1. Stirred tank 2. Fluidized bed	Lactose, 40	93	NR	10 (D=0.4)	Krischke et al. (1991)
<i>L. casei</i>	Alginate, batch	Lactose, 40	50	NR	13.5 (D=1.0)	Krischke et al. (1991)
	Alginate, batch	Glucose, 30	99.2	90-99	1.60	Guoqiang et al. (1991)
<i>L. lactis</i>						
<i>L. casei</i>	Alginate	whey	53-94	89-97	0.86	Roukas & Kotzekidou (1991)
	carrageenan agar polyacrylamide Batch	(lactose 50 g/l)				

NR, not reported; D, dilution rate

b) membrane confinement

Membrane Type	Organism	Substrate (g/l)	Productivity (g/l/h)	Ref.
Dialysis unit	<i>L. delbrueckii</i>	glucose (50)	8.0	Friedman & Gaden (1970)
Dialysis unit	<i>L. bulgaricus</i>	whey (lactose)	11.7	Steiber et al. (1977)
Hollow-Fibre	<i>L. delbrueckii</i>	glucose (50)	100	Vick Roy et al. (1982)

*** Starter cultures**

Production of concentrated starter cultures:

- * Traditionally prepared by two processes**
 - batch growth
 - cell concentration
- * Problem**
 - reproducibility of activity
 - onset of fermentation process rate limiting step

Alternative strategies based on:

- increased cell concentration
- decrease product concentration

- * immobilized cells:
 - entrapped cells
 - hollow-fibre bioreactor

- * batch/cont' dialysis
- * ultrafiltration
- * cell-recycle

Immobilized cells for the production
of starter cultures:

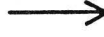
* Entrapped cells

The continuous inoculation and pre-
fermentation of dairy fluids:

Dilute cell suspension entrapped



Growth of cells in the gel



Cells reach high cell density



Release of cells
(+ or -)

*** Flavour production**

Diacetyl (2,3-butanedione):

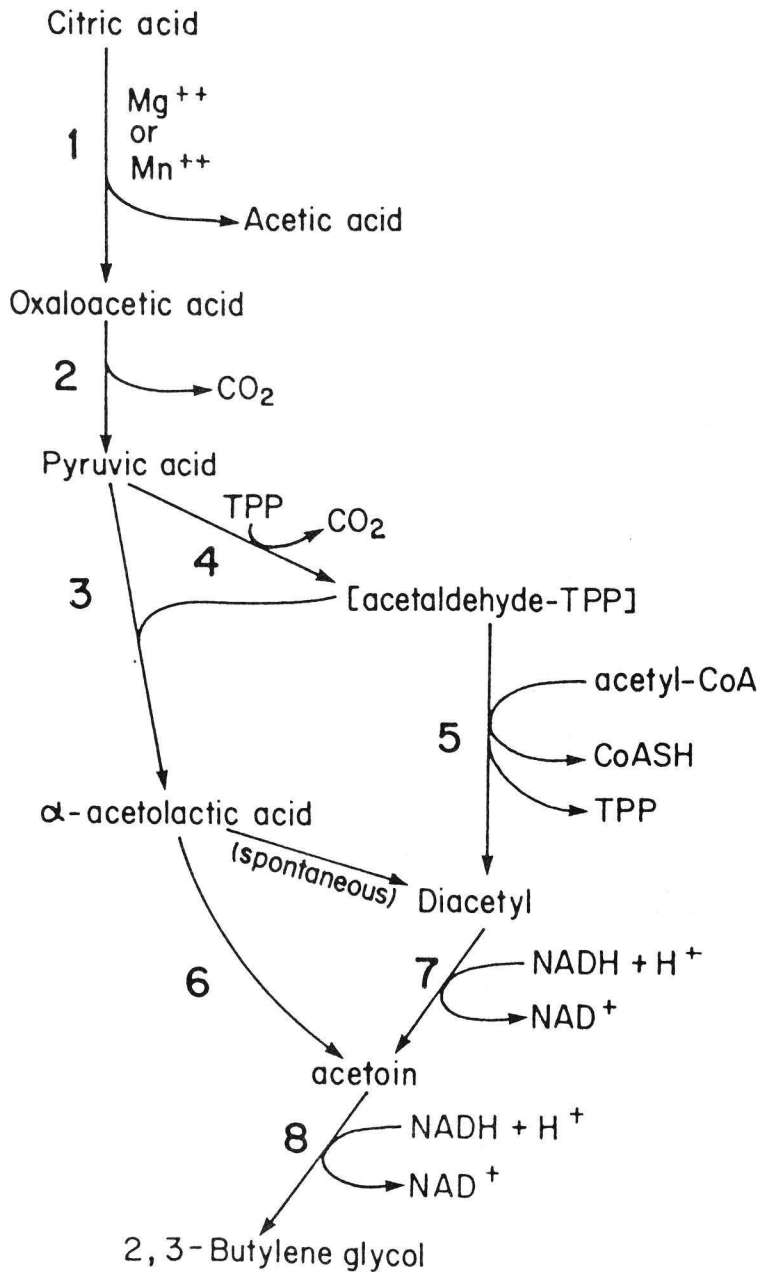
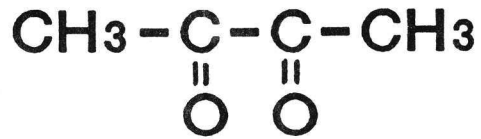


FIGURE 1. Citrate fermentation pathway occurring in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Enzymes catalyzing the numbered reactions are 1, citrate lyase; 2, oxalacetate decarboxylase; 3, α-acetolactate synthase; 4, pyruvate decarboxylase; 5, diacetyl synthase; 6, α-acetolactate decarboxylase; 7, diacetyl reductase; 8, acetoin reductase.

Diacetyl:

***Alginate entrapped
(*L. lactis* supsp. *lactis*)**

***Beads v's fibres**

***Oxygen dependent:
fibres 0.2 mm
beads 3.0 mm**

Takahashi et al. (1990)

Diacetyl:

- *Alginate entrapped
(*L. lactis* supsp. *lactis*)
- *Fibres + catalase (O₂):
pure enzyme
Bovine liver

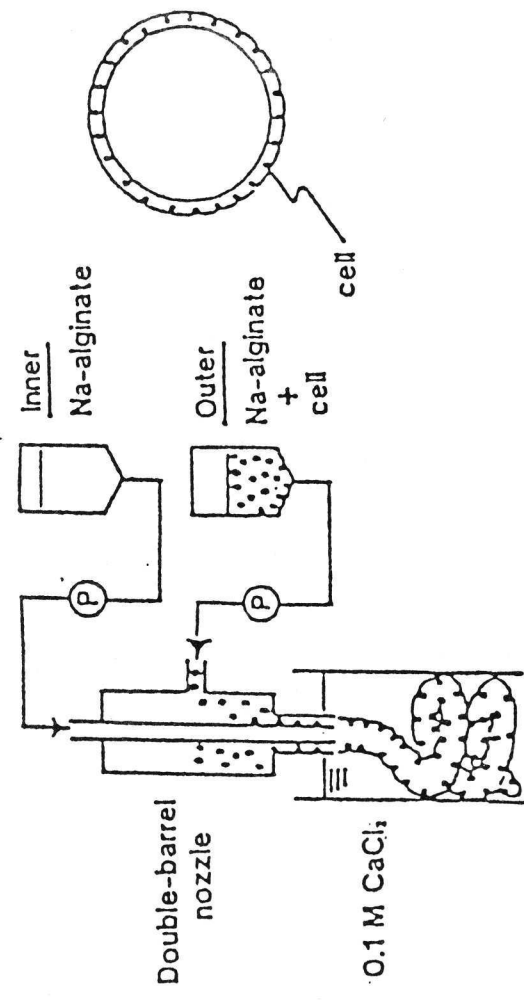


Fig. 3 A schematic diagram of the apparatus used for the preparation of the FDG.

Takahashi et al. (1990)

*** Production of proteolytic enzymes**

Proteolytic enzymes:

- * essential for growth in milk**
- * slow process**
- * accelerate by adding enzymes**

Immobilized cells?

- * as yet no application
(- starter/plasmid)**
- * continuous production
of extracellular enzyme?**

*** Bacteriocins**

Bacteriocins (Antagonistic proteins):

- * natural antimicrobial agents acceptable in foods
- * nisin best example (many others)

Immobilized cells?

- * no applications, as yet (- starters/plasmids)
- * continuous process for (over) production of extracellular protein

Conclusions:

At present there are very few examples of industrial immobilized cell fermentation processes. This is true for LAB, although there are many patents and publications in this area. The great potential immobilized cell processes offer, will only be realized in cost effective applications, where either energy conservation or monetary savings are achieved.

W. Swinkels (Bavaria bv)

Titel : De produktie van alcoholvrij bier

Er wordt een beschrijving gegeven van de wortbehandeling vroeger en nu.

Wort is het vloeibare extract uit de mout.

Vervolgens wordt de huidige wortbehandeling voor de produktie van normaal bier vergeleken met de wortbehandeling zoals die gebruikt wordt voor de produktie van alcoholvrij bier. De wortbehandeling is essentieel voor het gebruik van de bioreactor waarin geïmmobiliseerde gist is vastgezet op een drager.

De voordelen van deze niet poreuse drager worden belicht.

Tevens worden de achtergronden en het gebruik van de immobilisatietechniek besproken en toegelicht waarom dit systeem zo geschikt is voor de produktie van alcoholvrij bier.

GISTING

	Oud	Nieuw
Hitte draf		Whirpool
Koude draf		Evt. cros-flow centrifuges
Koeling	Koelschip	Snel
Temp. begin gisting	Aanstelkuip	> 9 Gr.
Aantal gistcellen/ml.	Langzaam	> 15 milj.
Generaties	< 8 Gr.	3 à 4
Gistsoort	< 15 milj.	Vloggist
Convectiestromen	6 à 7	Aanzienlijke
Gistingstijd	Stofgist	7 dagen
Processituatie	Nauwelijks	Gesloten
Procesbeheersing	12-14 dagen	+
Biologische zekerheid	Open	+
	-	
	-	

Worty flavour comes from highly
flavour active components

For the production of alcohol-free beer
it should be possible to influence
these components

Aldehydes in normal wort are reduced by:

- Wortboiling
- Fermentation

**THE MOST IMPORTANT PATHWAYS FOR
FLAVOUR ACTIVE COMPONENTS ARE:**

- Strecker degradation of amino-acids:
branched carbonyls such as isobutanal,
3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal
- Oxidative degradation of isohumulons
- Oxidations of alcohols to aldehydes
- Autoxydation of fatty acids:
 - . Linear carbonyls such as pentanal
hexanal, heptanal, nonenal
- Enzymatic degradation of lipids

REDUCING WORT ALDEHYDES BY YEAST

The yeast slurry cold contact

- Anaerobic procedure (patent Feldschlosschen)
- Aerobic procedure (patent Muller)

The immobilized yeast contact

- Monolayer immobilization (patent Cultor-Bavaria)
- Entrapped in porous material (Kirin, Jülich)

CARBONYLS

STRECKER DEGRADATION

LIPID ROUTE

3-Methyl-butanal

2-Methyl-butanal

Heptanal

	Inflow (ppb)	Outflow (ppb)	Red. (%)	Inflow (ppb)	Outflow (ppb)	Red. (%)	Inflow (ppb)	Outflow (ppb)	Red. (%)
16/10	90.4	23.4	74.2	372.1	113.8	69.4	7.9	2.8	64.6
19/10	106.5	8.8	91.7	432.2	39.4	90.0	6.7	3.4	49.3
22/10	93.7	34.6	63.1	358.5	196.2	45.3	8.6	4.3	50.0
25/10	79.5	14.0	82.4	302.6	75.4	75.1	8.2	4.1	50.0
26/10	66.9	14.7	78.0	258.4	81.4	68.5	6.8	4.7	30.9
mean	87.4	19.1	77.9	344.0	101.2	70.0	7.6	3.9	49.0

Normal

bear

20

60

4

Red. = Reduction

TECHNICAL OR PHYSICAL METHODS

A. The membran systems: - Dialysis
- Reverse Osmosis

B. Thermal systems : - Centritherm
- Fallstream evaporation

THE MONO LAYER IMMOBILIZED YEAST SYSTEM VERSUS THE ENTRAPPED IMMOBILIZED YEAST SYSTEM

- Maintaining sterility
- Loading the reactor
- Washing the carrier
- Neutralising the carrier
- Yeast leaching
- Downstream versus upstream
- Alcohol production
- Binding of yeastcells
- Biomass production
- Production steps



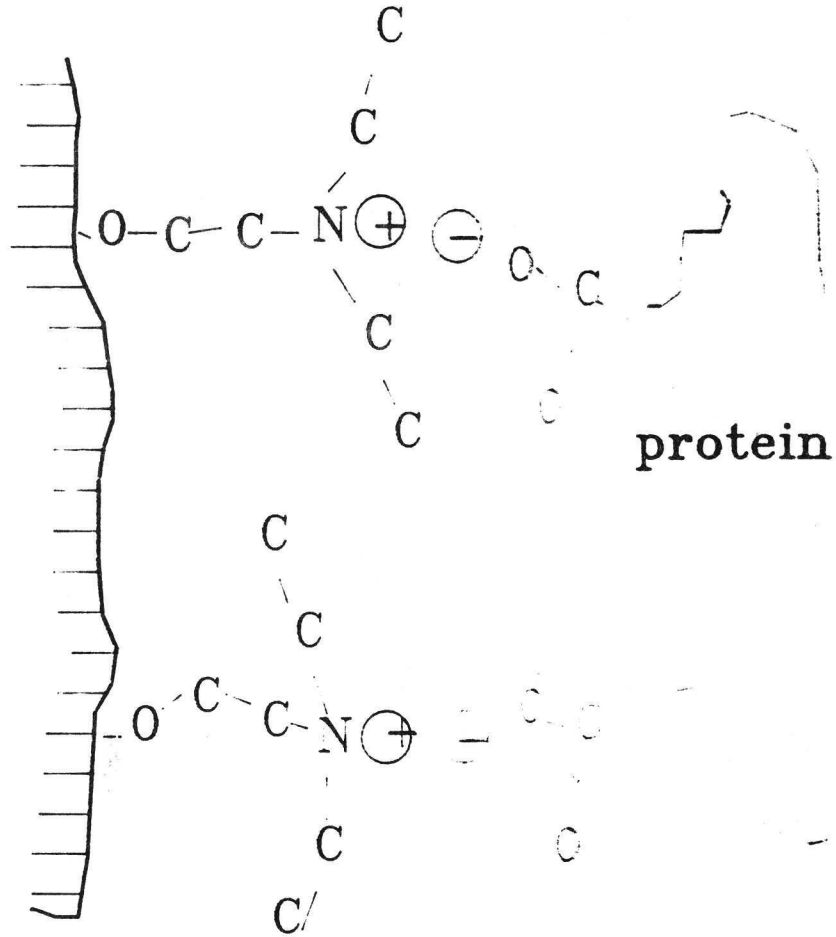
Open structure
good accessibility
diffusion not limiting
fast adsorption
short cycle times

12



FINNISH SUGAR CO. LTD.
FINNISH SUGAR

DEAE-
cellulose

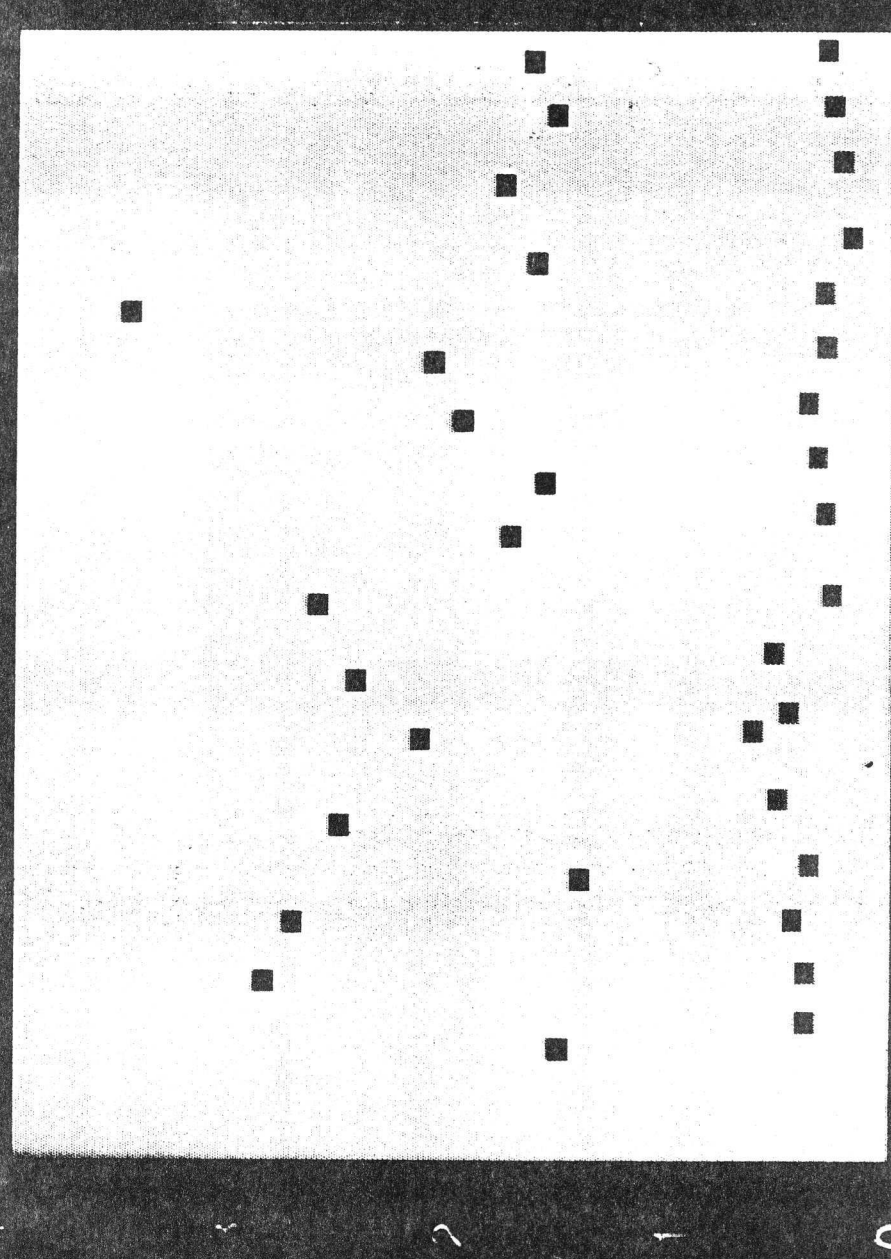




Rigid particle
not compressible
low pressure drop
high flow rate

147

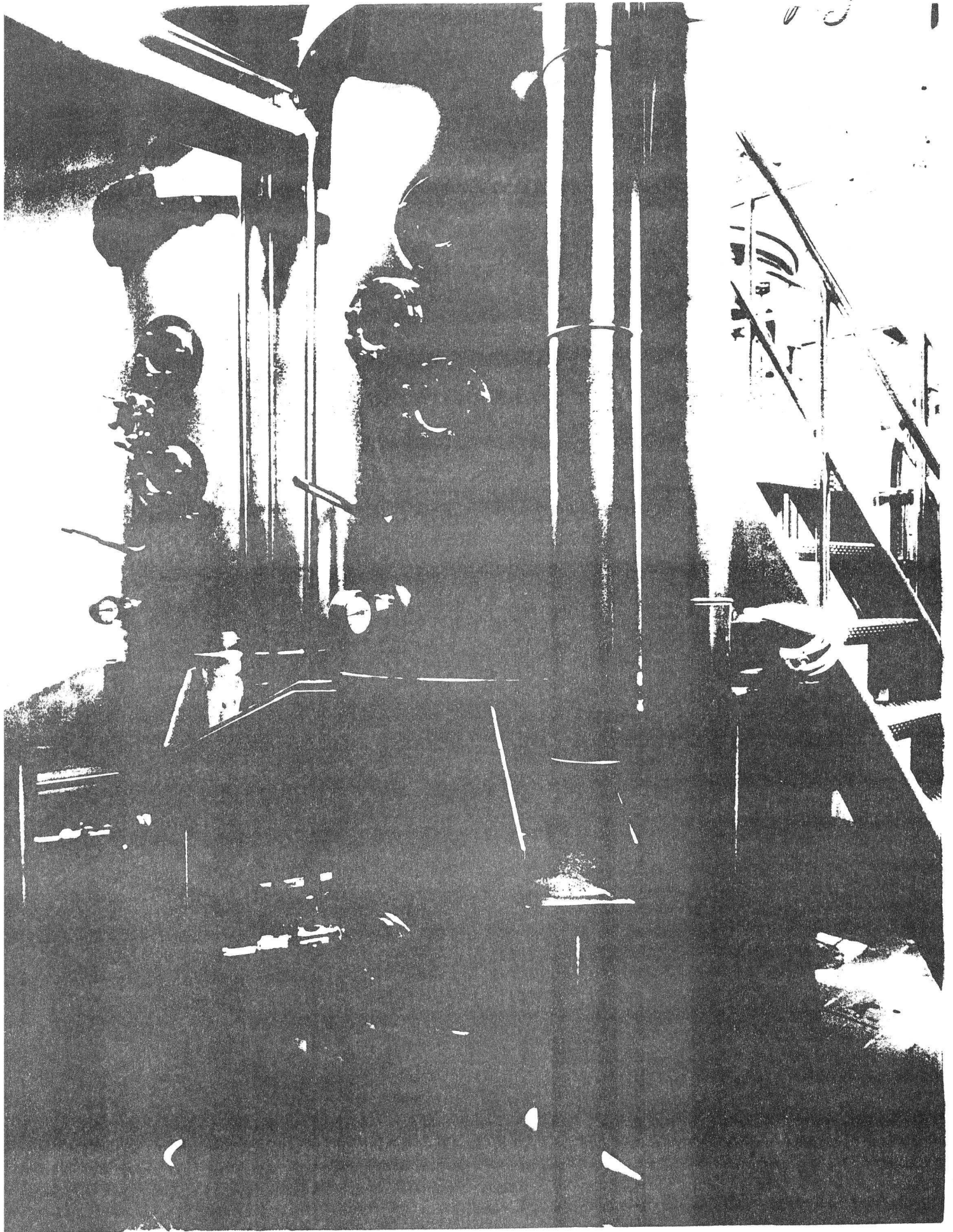
ACC IN OUT



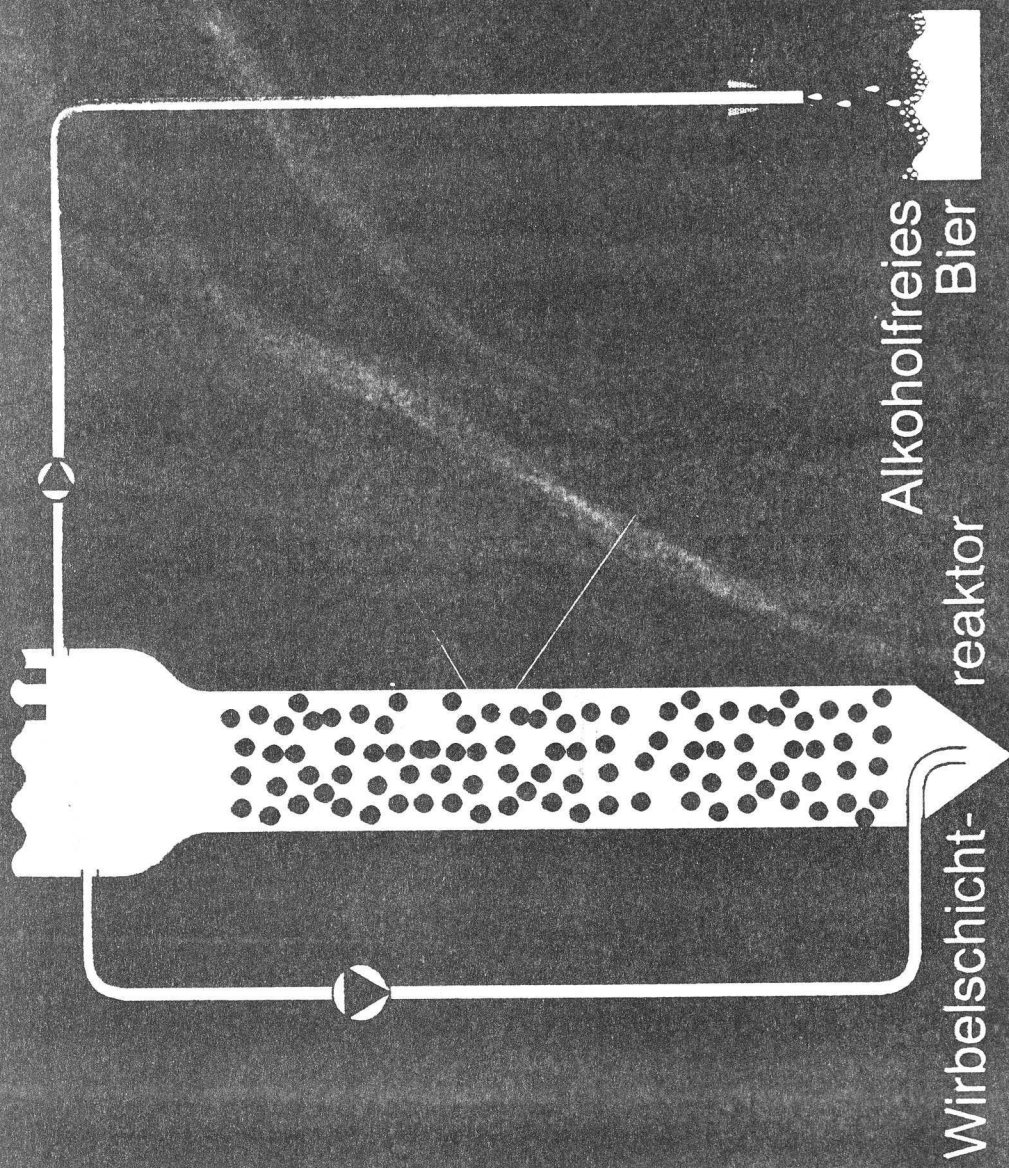
In
Out

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
Row Numbers

FAME FOR DPM



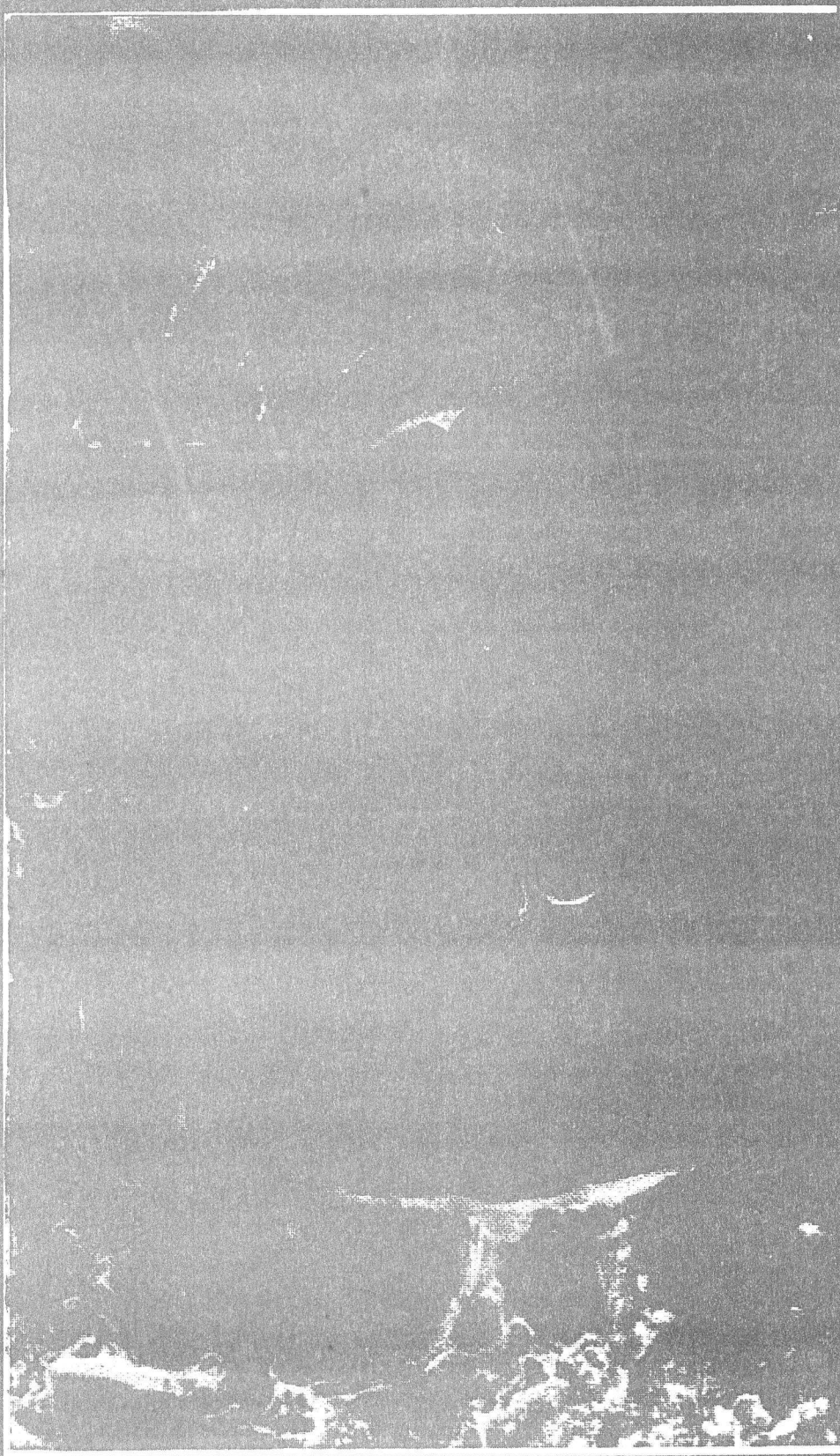
(...)



Wurze

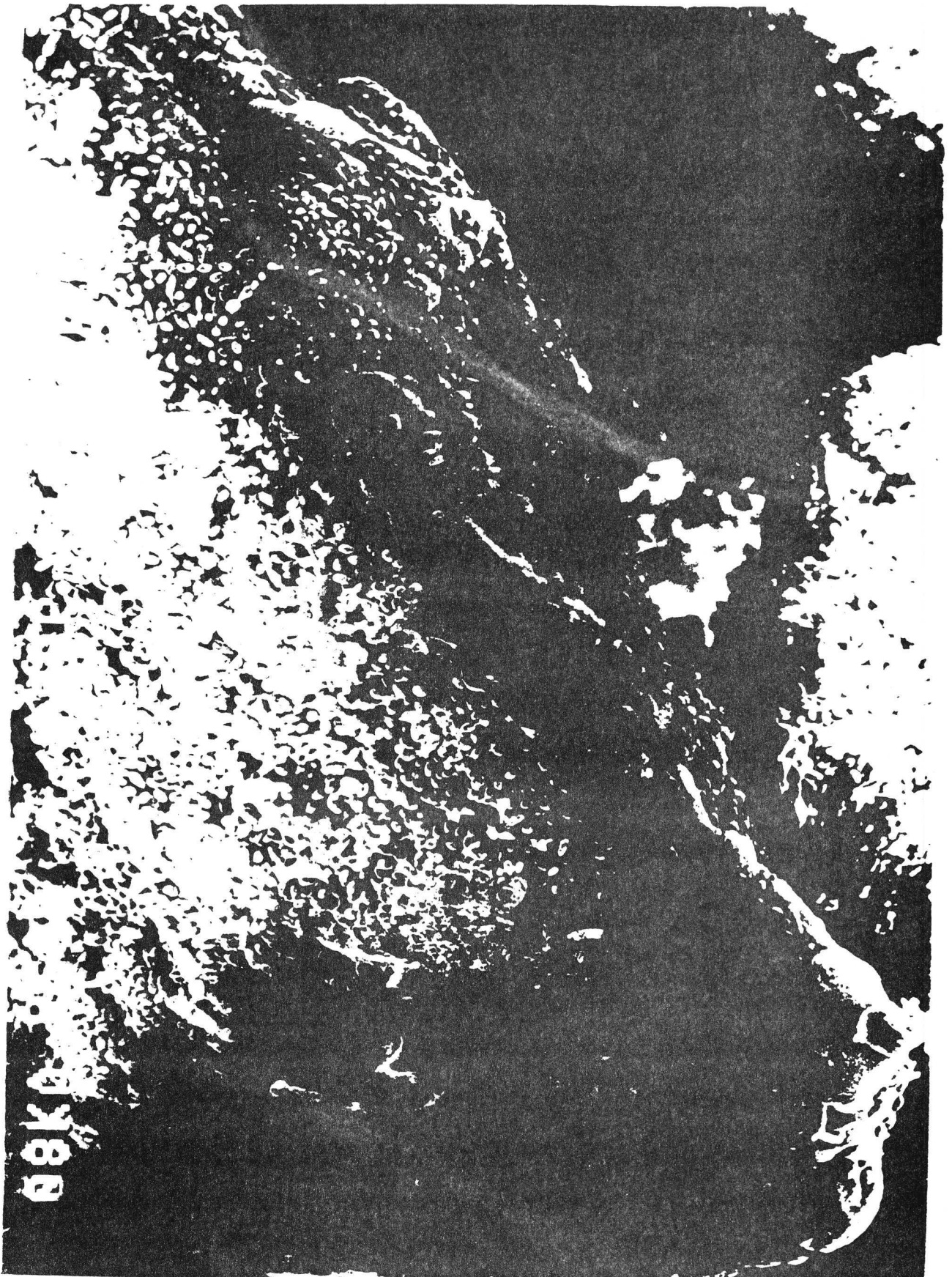
Alkoholfreies
Bier

FlieBschematische Darstellung des Wirbelschichtverfahrens zur kontinuierlichen Produktion von alkoholfreiem Bier mit immobilisierter Hefe



Hypermics is an immobilization carrier made of porous ceramic beads, suitable for adhesion and growth of microorganisms.

(Patents Pending)
Saccharomyces cerevisiae x6000



TECHNOLOGICAL OR BIOLOGICAL METHODS

A. Immobilized yeast systems

- Cultor-Bavaria downflow packed bed reactor
- Jülich, research center: fluidized bed reaction upstream

B. Cold-contact system

C. Stopped fermentations

MEMBRAANBIOREACTOREN VOOR FERMENTATIES

K.Ch.A.M. Luyben

Vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft

Membranen kunnen op verschillende manieren worden geïntegreerd met fermentaties ten einde de efficiency van het proces te verhogen. Bekende toepassingen van membranen betreffen: celretentie voor produktiviteitsverhoging en de selektieve produktverwijdering om de processtromen te reduceren. Bij het kweken van dierlijke cellen kunnen membranen ook gebruikt worden voor de additie van nutriënten, bijv. voor bellenvrije beluchting.

In deze voordracht zullen de diverse aspecten van een membraanbioreaktor worden belicht. De fermentatie betreft ethanolproduktie met bakkersgist. Het systeem betreft een fermentor gekoppeld aan microfiltratie voor celretentie en pervaporatie voor ethanolwinning. Achtereenvolgens komen aan de orde:

* Fermentatieresultaten:

- Verhoging van de produktiviteit door celretentie.
- Verhoging van de substraatomzet door produktwinning.
- Modellering van het geïntegreerde proces.

* Praktijk:

- Vervuiling microfiltratie- en pervaporatiemembranen.
- Verhoging viscositeit door de hoge celdichtheid: problemen en toepassing in de procesregeling.
- Recirculatie van microorganismen: effect van een temperatuurschok tijdens pervaporatie.

* Procesontwerp:

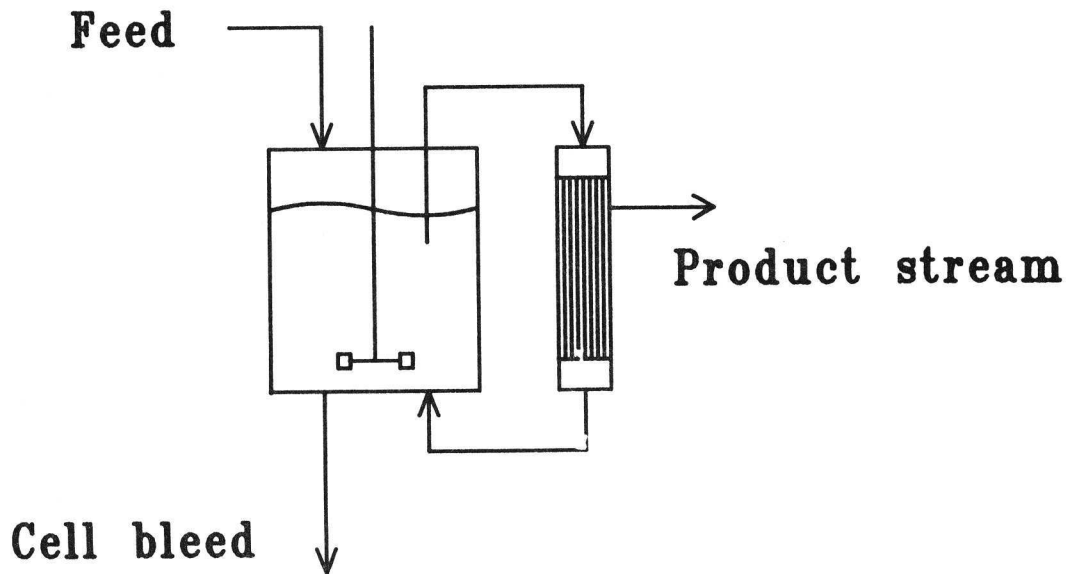
- Procesconfiguratie en opschalingsaspecten.
- Intern volume van de membraansectie: mogelijkheden voor optimalisatie van de fermentatie.

Tot slot zal de economie van een ethanolproduktieproces met membranen worden geevalueerd.

MEMBRANE BIOREACTORS
FOR FERMENTATIONS

K.Ch.A.M. Luyben
Dept. Biochem. Eng.
Delft University of Technology

MEMBRANE BIOREACTOR



Cell retention: UF, MF

→ *increase in productivity*

Product recovery: pervaporation, perstraction
electrodialysis

→ *relatively cheap recovery*

→ *increase in feed concentration*

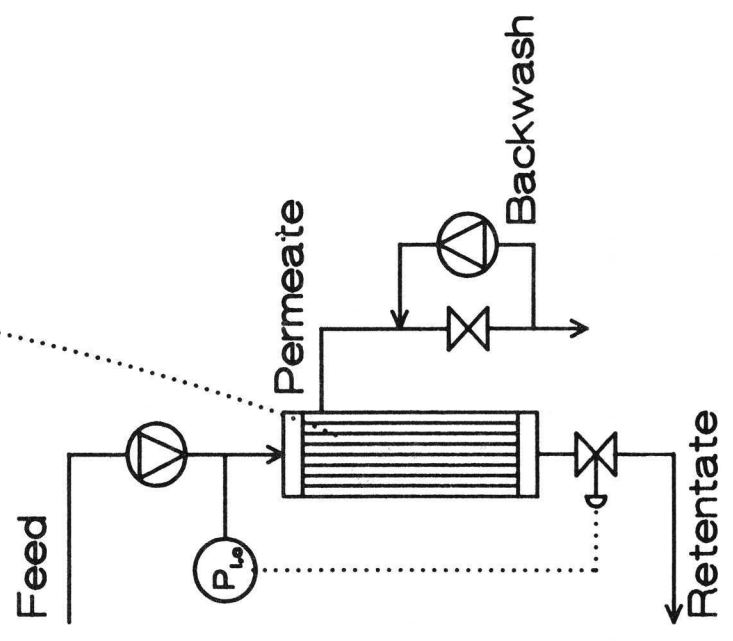
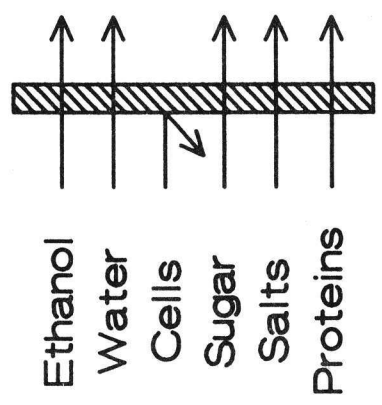
→ *reduction of process flows*

Addition of nutrients

→ *e.g. bubble free aeration*

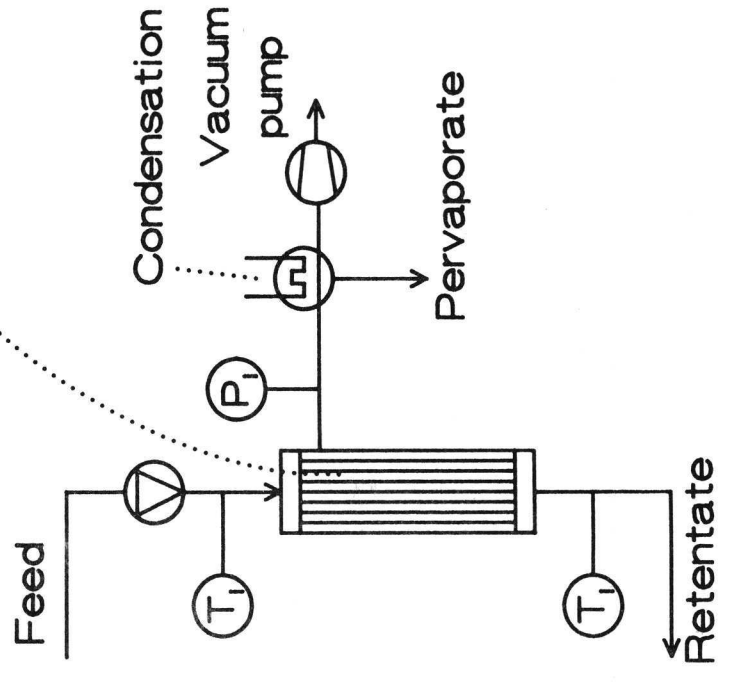
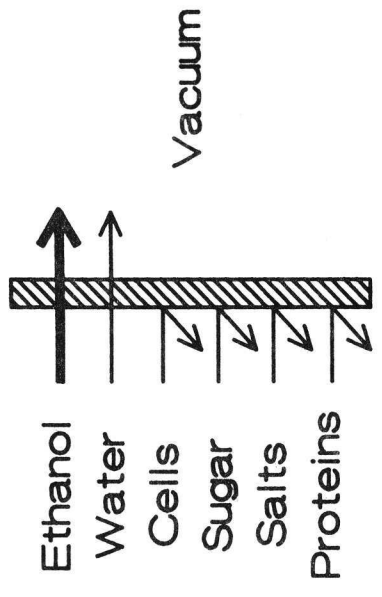
MICROFILTRATION

Microporous membrane



PERVAPORATION

Homogenous membrane



PROCESS CONSIDERATIONS FOR A MEMBRANE BIOREACTOR

High cell densities
Membrane section
→ *Extra volume*
→ *Circulation of broth*

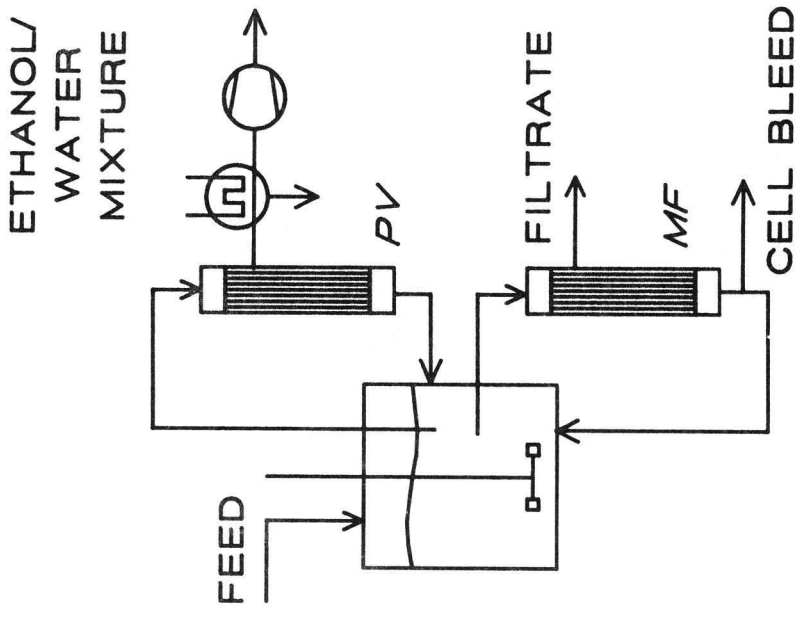
Fermentation
Modelling
High reaction rates
→ mixing problems
Modelling
Mixing problems
→ substrate gradients
→ pH-gradients
Pressure shocks
Temperature shocks

Hydrodynamics
High viscosity
Mixing by jet of liquid
Fouling of membranes

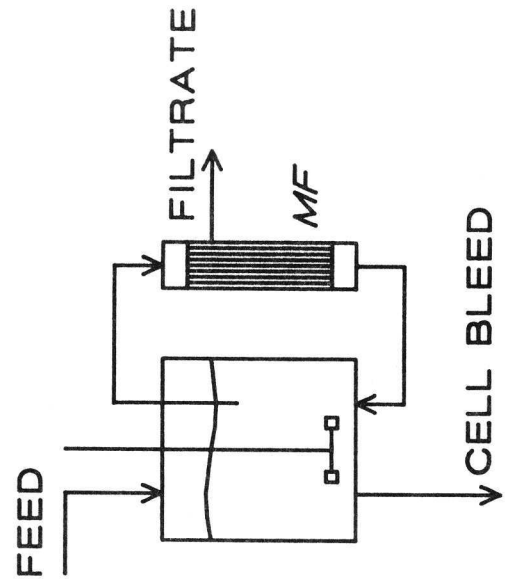
Heat balance
Increase heat production
Heat loss (pervaporation)
Heat input by pumps

Miscellaneous
Logistics, CO₂ release
Sterilization, backwash

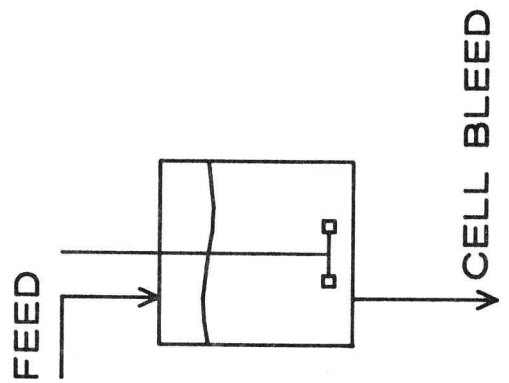
ETHANOL PRODUCTION IN A MEMBRANE BIOREACTOR



CONTINUOUS CULTURE + MICROFILTRATION + PERVAPOARATION



CONTINUOUS CULTURE + MICROFILTRATION



CONTINUOUS CULTURE

FERMENTATION RESULTS

Summary of maxima in the fermentations

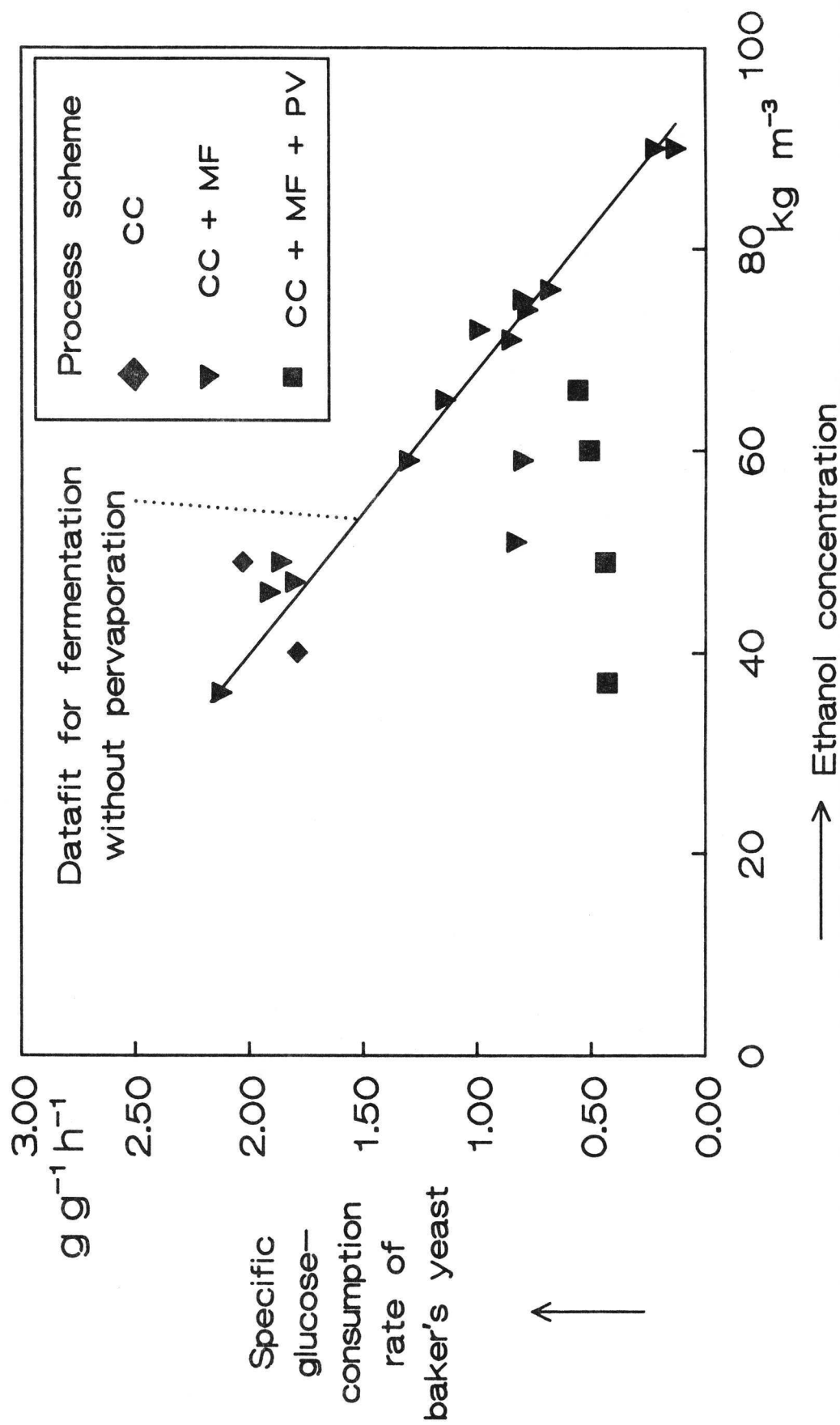
Process scheme	CC	CC+MF	CC+MF+PV
Biomass concentration (kg/m ³)	5.3	129	142
Ethanol in fermentor (kg/m ³)	49	53	66
Ethanol in pervaporate (kg/m ³)	-	-	231
Glucose conversion (kg/m ³)	118	123	358
Productivity (kg/m ³ h)	4.5	55	32
Fermentation interval (days)	>140	>56	>30
Selectivity pervaporation	-	-	4.3
Flux pervaporation (l/m ² h)	-	-	1.5
Flux microfiltration (l/m ² h)	-	>15	>15

Pervaporation module: hollow fibre, active layer: silicone ($\sim 1 \mu\text{m}$).

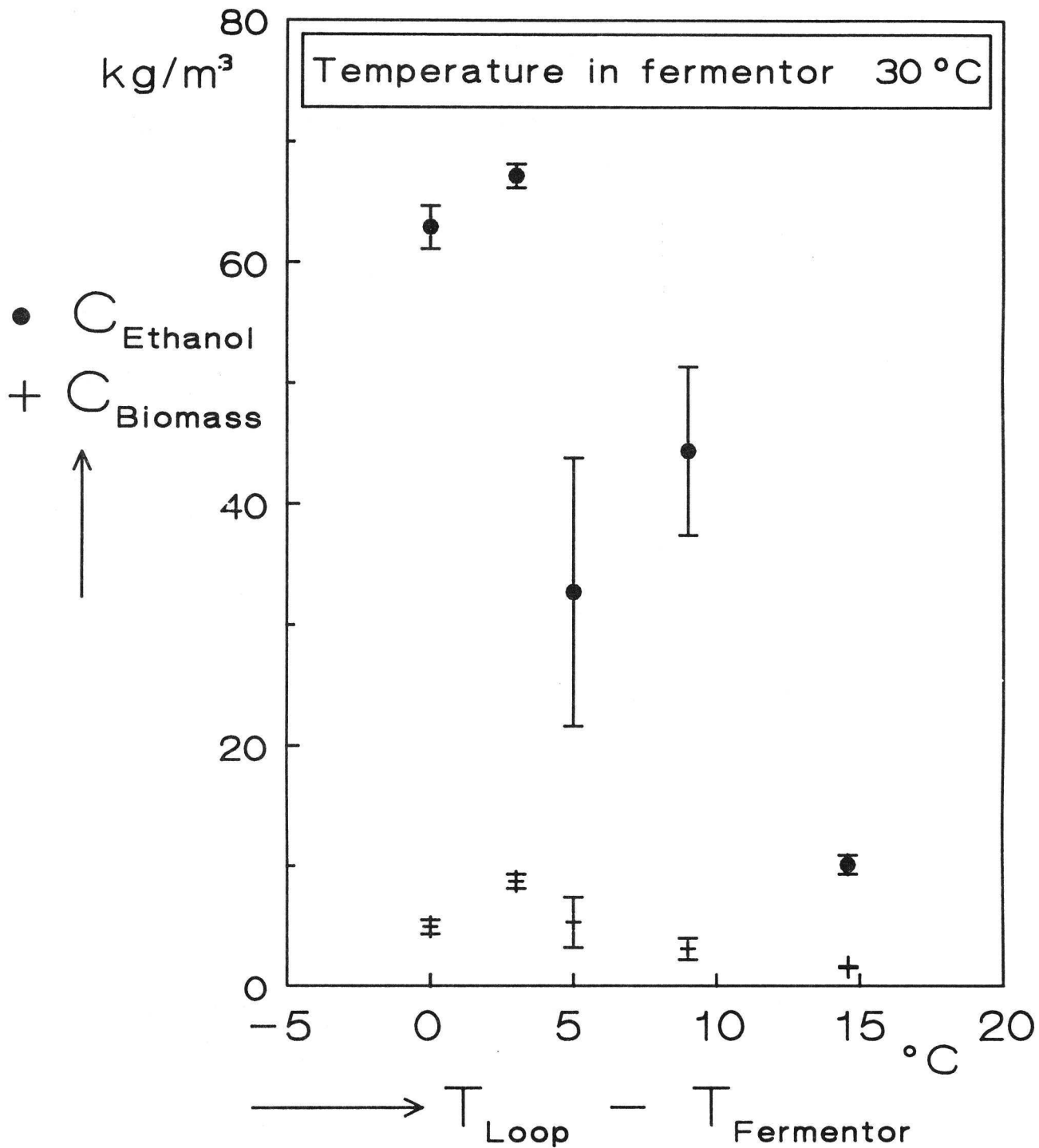
Microfiltration module: hollow fibre, hydrophylic membranes,
pore diameter $\sim 0.2 \mu\text{m}$.

INHIBITION KINETICS OF BAKER'S YEAST BY ETHANOL

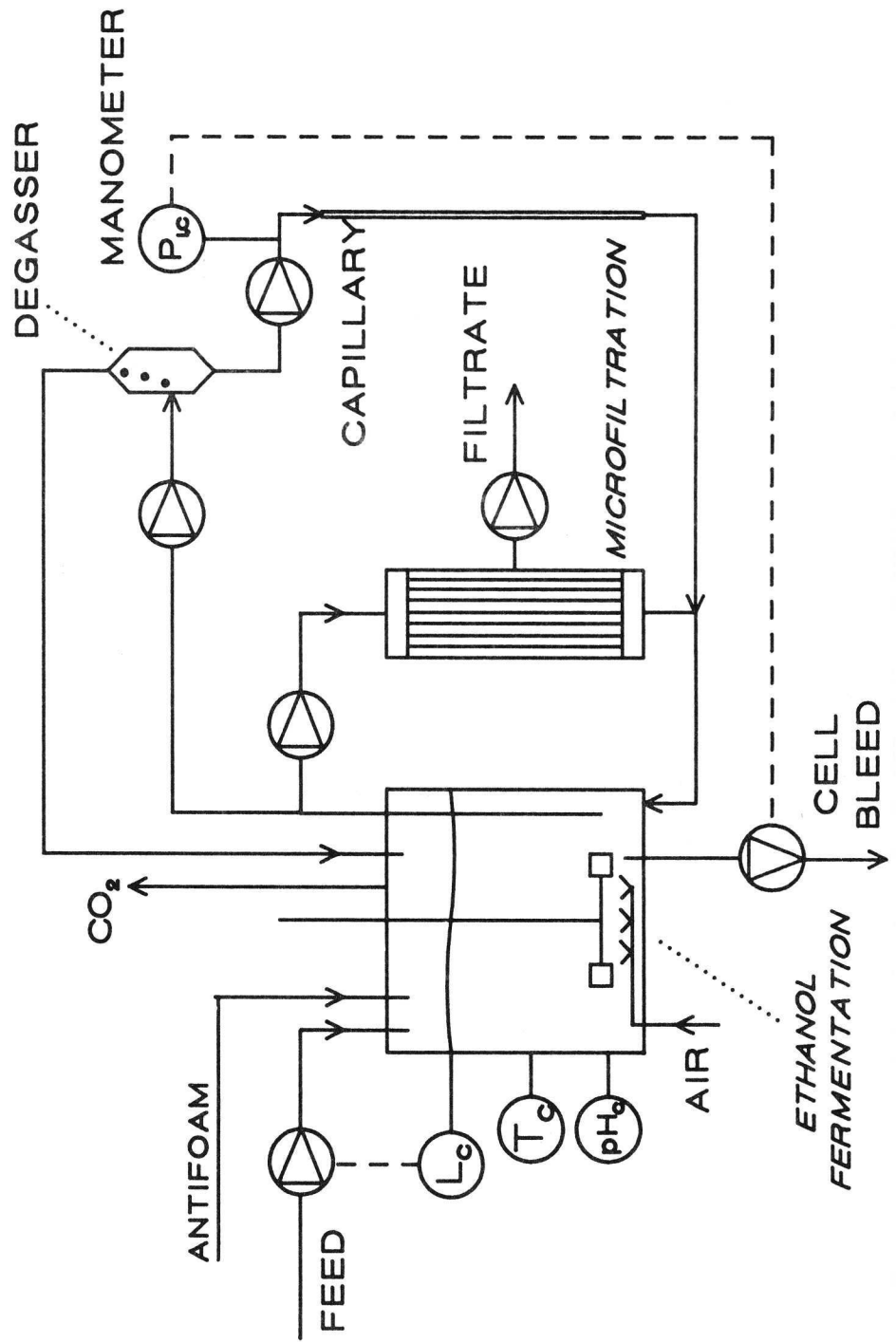
Biomass concentrations: 4 - 150 kg/m³

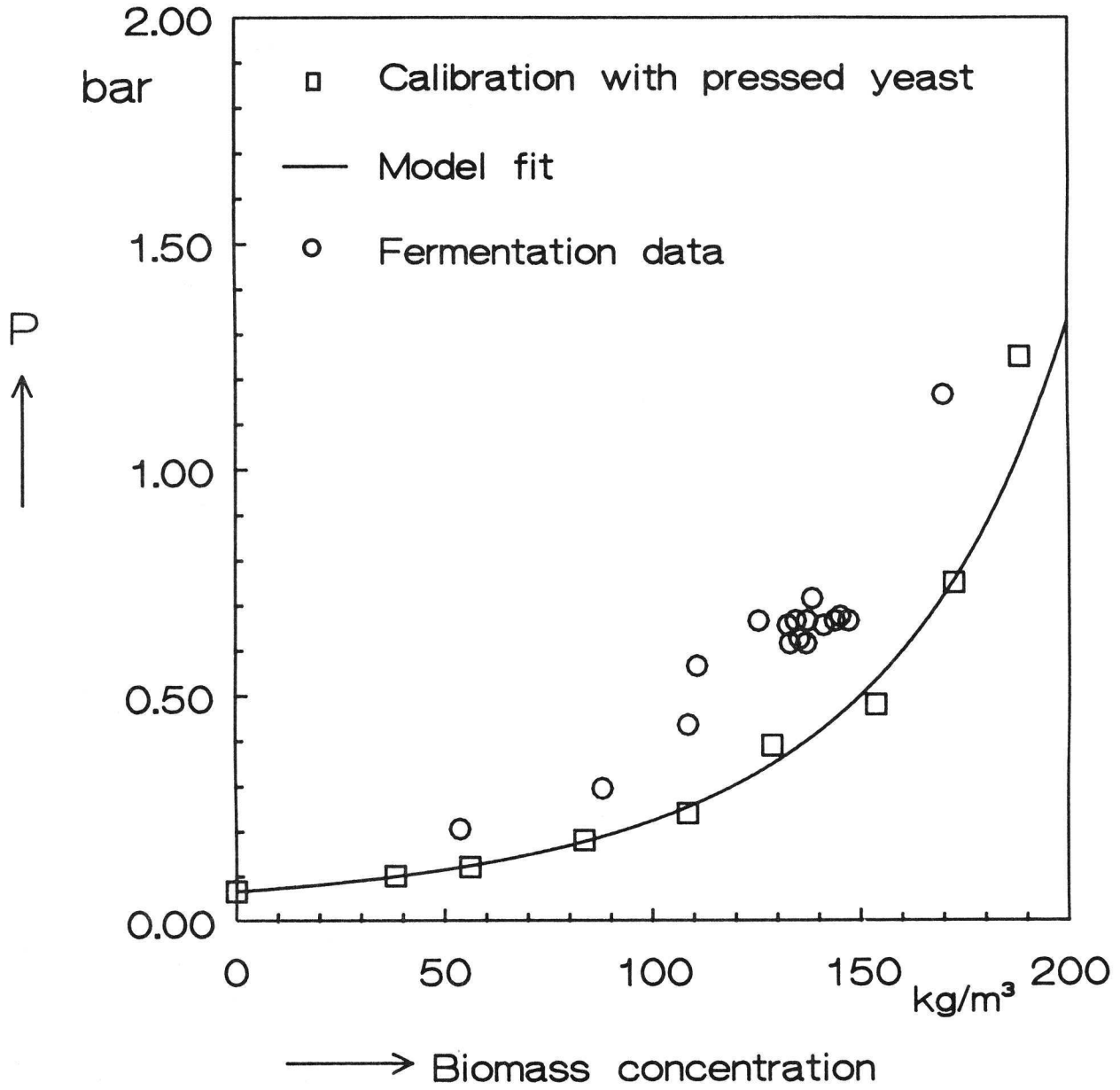


EFFECT OF REPEATED TEMPERATURE SHOCK

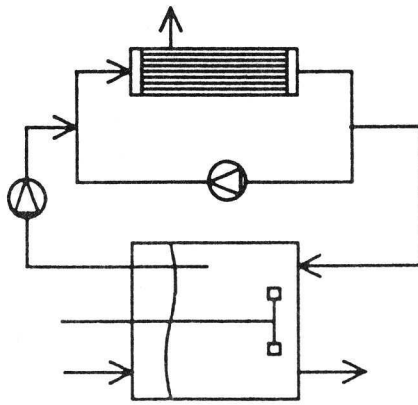
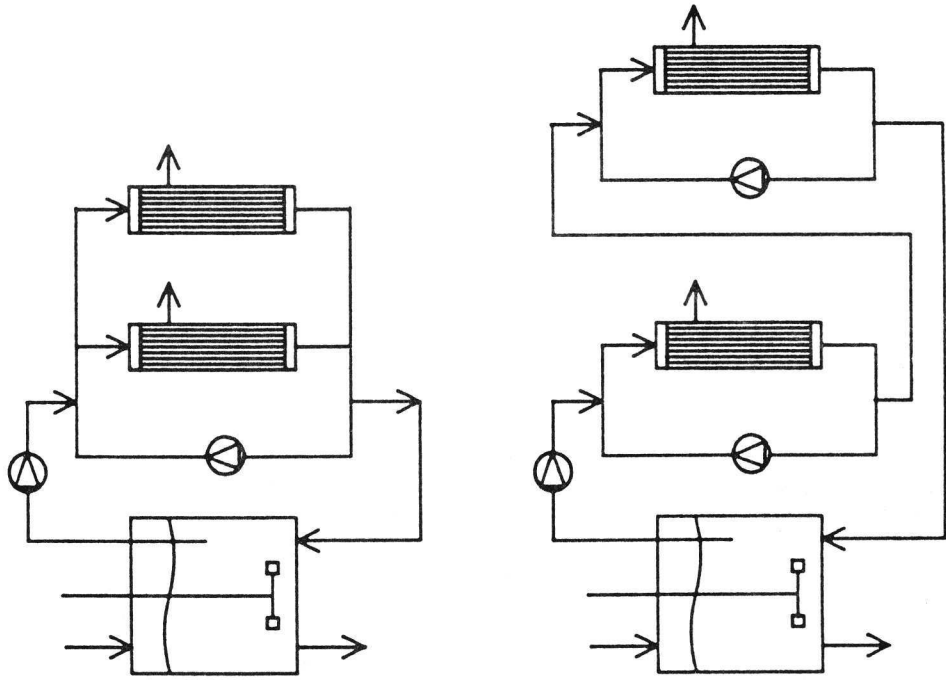


CAPILLARY VISCOSITY METER FOR ON-LINE MEASUREMENT AND CONTROL OF THE BIOMASS CONCENTRATION





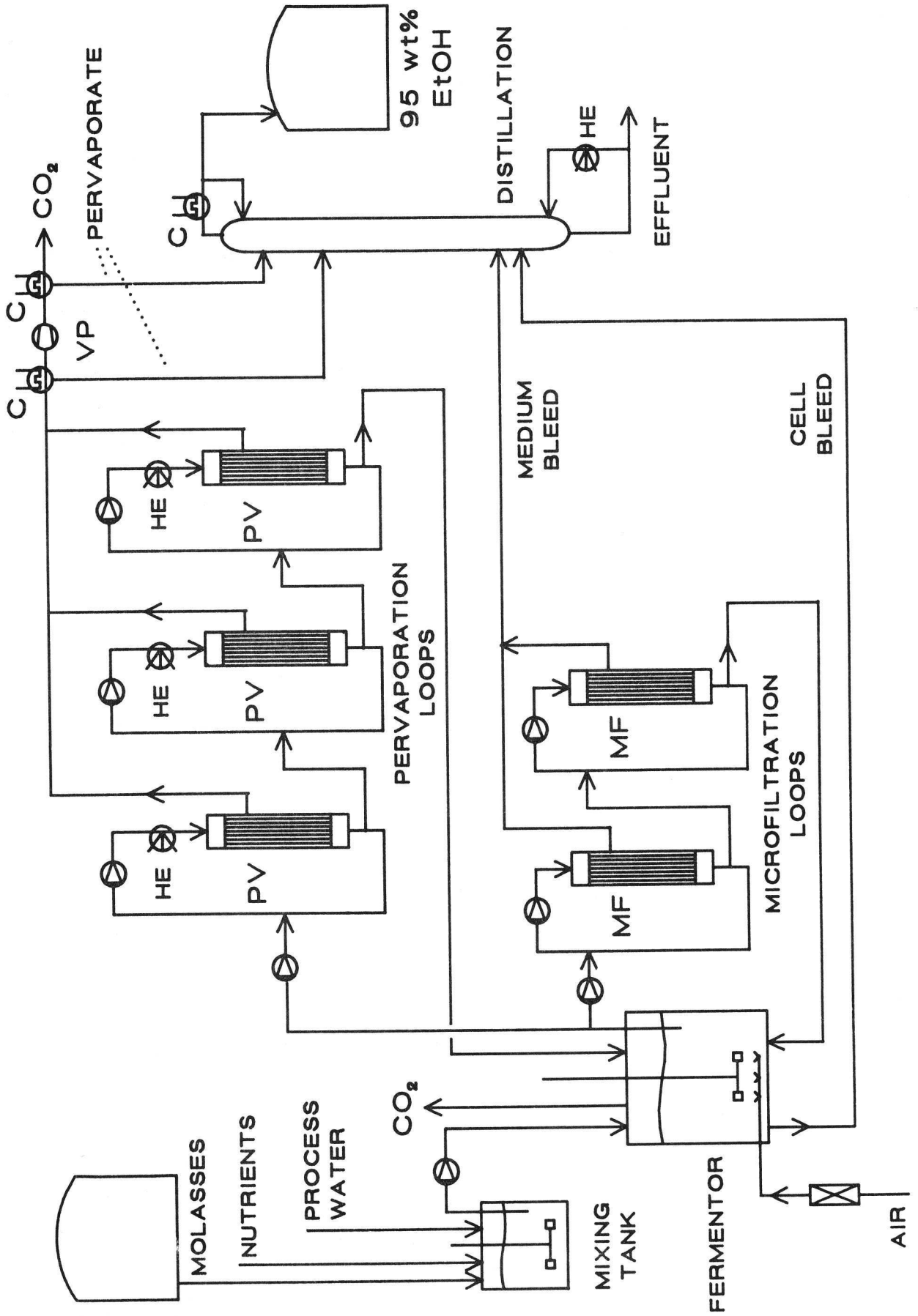
PROCESS CONFIGURATION



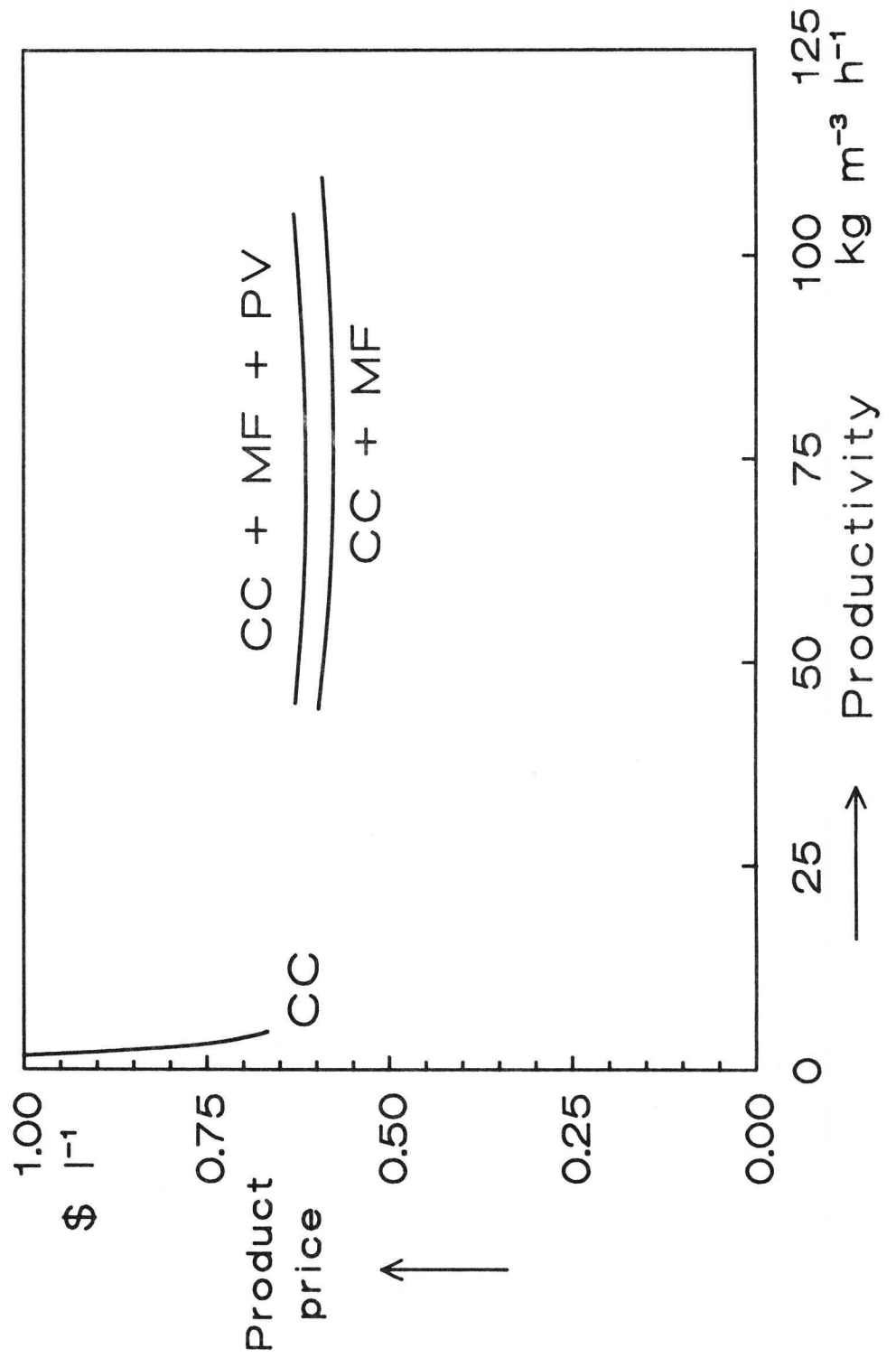
closed loop

MULTIPLE MODULES

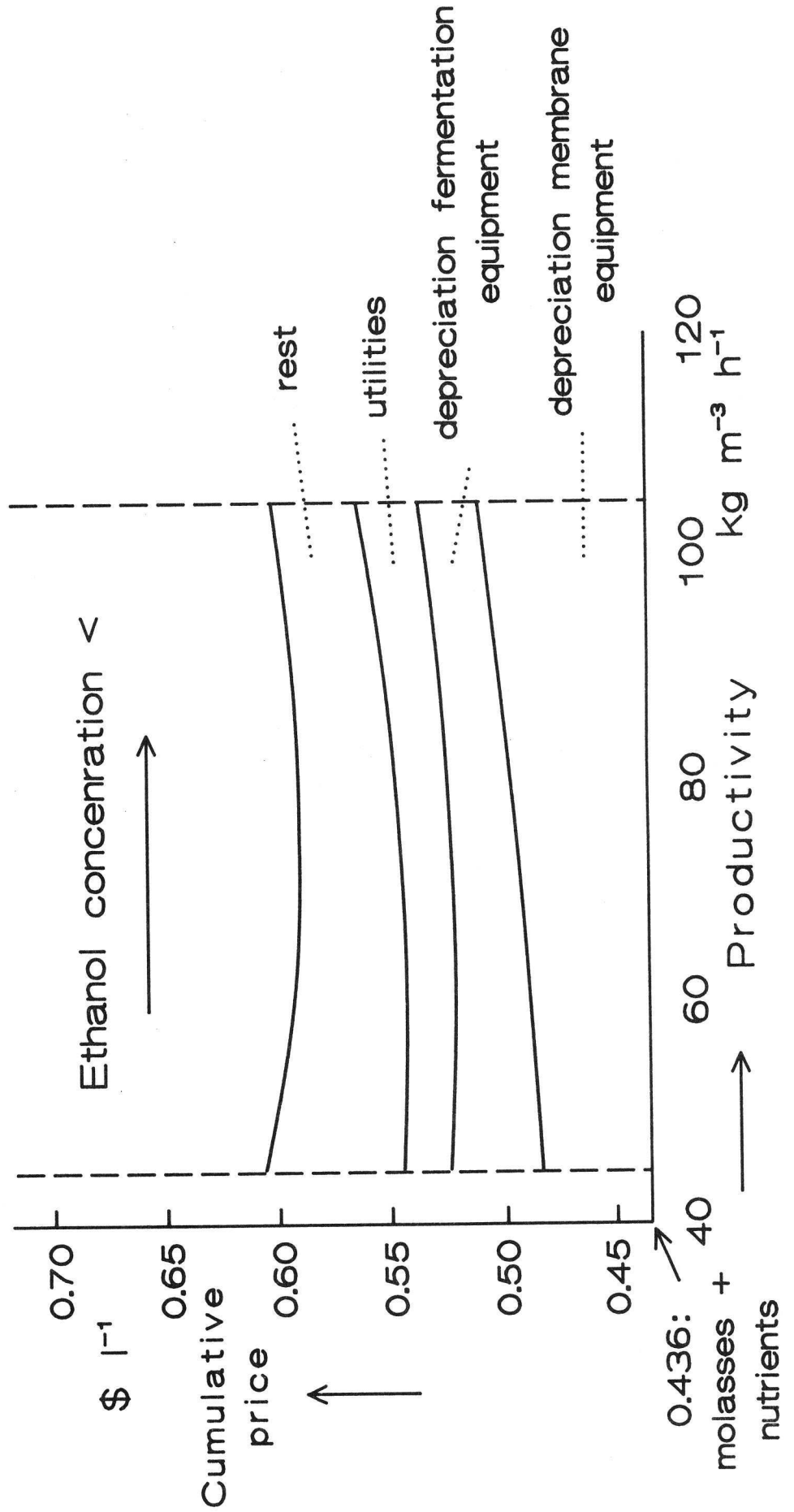
MODULE



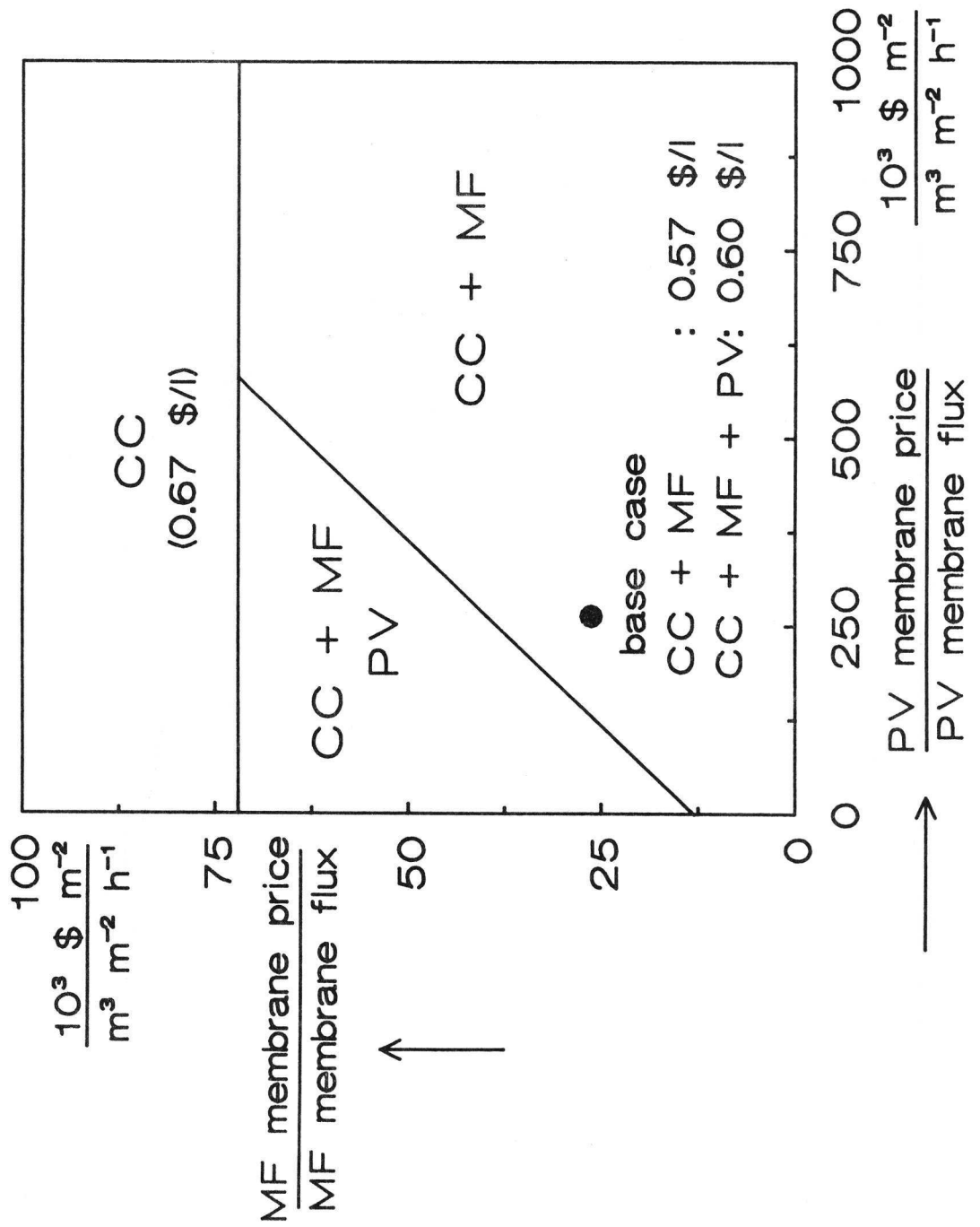
ETHANOL PRICE IN MEMBRANE BIOREACTORS



BUILD-UP OF ETHANOL PRICE IN MEMBRANE BIOREACTOR



INFLUENCE OF PRICE/CAPACITY RATIO OF MEMBRANE ON ETHANOL PRICE



CONCLUSIONS

Membrane separations are flexible and straightforward unit-operations for use in a fermentation.

Membrane bioreactors offer new prospects for process optimization.

The repeated exposure of cells to a new environment in the membrane section can lead to undesirable effects.

A capillary viscosimeter is a useful tool for control of the biomass concentration.

Ethanol fermentation

Cell retention by microfiltration leads to a 12-fold increase in the productivity.

Product recovery by pervaporation leads to a 3-fold increase of the substrate conversion.

Biokinetic models also apply to membrane bioreactors.

Fouling problems occur with microfiltration membranes; no problems with pervaporation membranes.

Microfiltration is economically feasible; for an economic use of pervaporation high-selective, high-flux membranes are needed.

F.A.M. Klaver en J.M.K. Timmer,

Afdeling Microbiologie en Technologie, NIZO, Postbus 20, 6710 BA Ede.

Het gebruik van membraanbioreactor-technieken in de zuivel wordt besproken aan de hand van enkele voorbeelden die op NIZO zijn onderzocht. Het betreft hierbij enerzijds toepassingen van celrecirculatiefermentatie en anderzijds van interactieve fermentatie (met behulp van dialysefermentatie).

Celrecirculatiefermentatie werd onderzocht om respectievelijk zuurselconcentraten (geconcentreerde melkzuurbacterieculturen) en organische zuren (m.n. melkzuur) te produceren. In het eerste geval is het voordeel van celrecirculatiefermentatie ten opzichte van batchgewijze dat tijdens het kweekproces lactaat, dat groeiremmend werkt, continu wordt verwijderd. Met deze kweektechniek bleek het mogelijk culturen van lactococci te produceren met een 5 à 6 keer hogere biomassaconcentratie dan de conventionele concentraten (ref. 1). Het voordeel van celrecirculatiefermentatie ten opzichte van batchgewijze fermentatie voor de productie van melkzuur uit weipermeaat is dat melkzuurproductiviteiten van tenminste een factor 10 hoger kunnen worden bereikt. Bij experimenten met *Lactobacillus helveticus* bleek echter dat de melkzuurconcentratie in de produktstroom minstens een factor twee lager is dan bij batchfermentatie. Als gevolg hiervan is toepassing van celrecirculatiefermentatie voor melkzuurproductie slechts in een aantal gevallen economisch interessant (ref. 2).

Bij de toepassing van de interactieve fermentatie-technieken (ref. 3 en 4) is uitgegaan van een dialysemembraan dat uitwisseling van laagmoleculaire verbindingen (< 10 kD) tussen twee afzonderlijke kweekcompartimenten bewerkstelligt. Met dit systeem werden enkele principevoordelen voor bereiding van gefermenteerde melkprodukten, met name yoghurt en karnemelk, verkregen.

Bij gescheiden kweken van de yoghurtbacteriën *Streptococcus thermophilus* en *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* in een dialysefermentatie systeem werd een volledig wederzijds gestimuleerde groei van deze soorten geconstateerd, die normaal ook optreedt indien beide soorten gezamenlijk in melk worden bebroed. Het voordeel van deze werkwijze is dat aldus bereide yoghurt een geringere nazuring tijdens opslag vertoont dan het op conventionele wijze bereide produkt.

Ten behoeve van karnemelkbereiding werden citraatvergistende lactococci gescheiden van niet-citraatvergistende lactococci gekweekt. Een goede vorming van de aromastof diacetyl uit citraat en uitwisseling ervan naar het produktcompartiment kon worden verkregen bij deze kweekwijze. Indien het eindprodukt werd begast met zuurstof, was het diacetylgehalte van het produkt langer stabiel tijdens opslag dan in een volgens conventionele wijze bereid produkt.

REFERENTIES

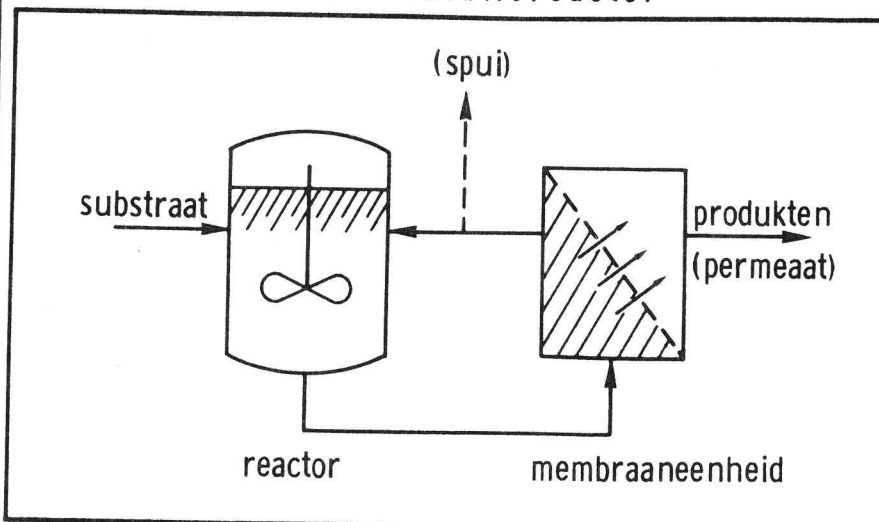
1. J.M.K. Timmer and H. Stegink. 'Use of membrane bioreactors for the production of starter concentrates.' *Membraantechnologie* (nov/dec 1988)3:24.
2. J.M.K. Timmer and J. Kromkamp. 'Production of lactic acid in a membrane cell recycle fermentor.' *Proceedings of the EFB-Symposium 'Physiology of microorganisms grown at high cell densities.'* (Toulouse, F, 13-14 October, 1991; to be published by the French Society of Microbiology, 1992).
3. F.A.M. Klaver *et al.* 'Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermentor: buttermilk.' *Netherlands Milk and Dairy Journal* (1992) in press.
4. F.A.M. Klaver *et al.* 'Interactive fermentation of milk by means of a membrane dialysis fermentor: yoghurt.' *Netherlands Milk and Dairy Journal* (1992) in press.

**TOEPASSING VAN MEMBRAANBIOREACTOREN
IN DE ZUIVELINDUSTRIE**

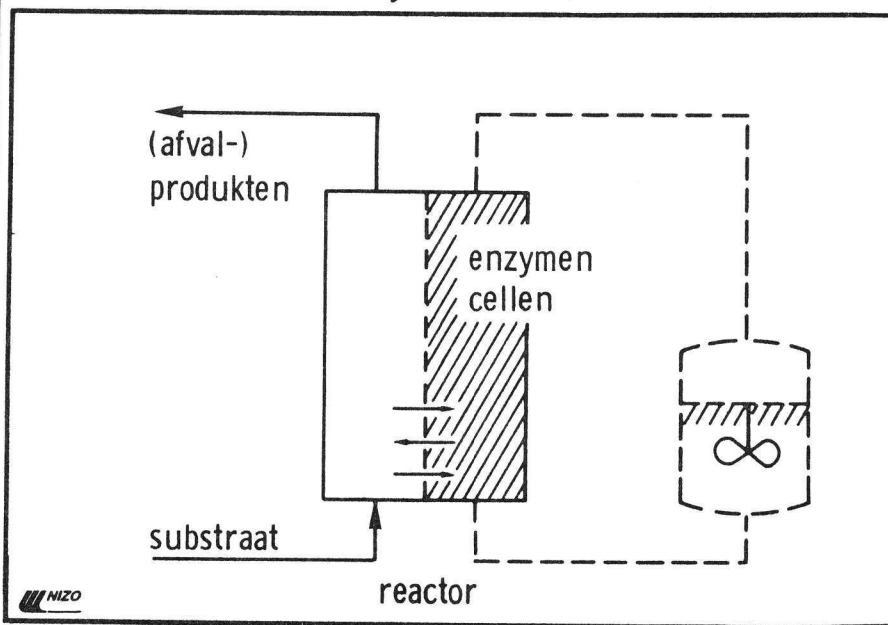
**F.A.M. KLAVER en J.M.K. TIMMER
NIZO, EDE.**



celrecirculatiereactor



dialysereactor



TOEPASSING VAN MEMBRAANBIOREACTOREN IN DE ZUIVELINDUSTRIE

FERMENTATIEPRINCIPE	TOEPASSING
CELRECIRCULATIEFERMENTATIE	MELKZUUR (uit WEI) BIOMASSA (ZUURSELCONCENTRAAT)
MEMBRAANDIALYSE FERMENTATIE	GEFERMENTEERDE ZUIVELPRODUKTEN (YOGHURT, KARNEMELK)

GEBRUIKTE ORGANISMEN BIJ CELRECIRCULATIEFERMENTATIE

TOEPASSING	SOORT
------------	-------

MELKZUUR BIOMASSA (ZUURSELCONCENTRAAT)	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
---	---

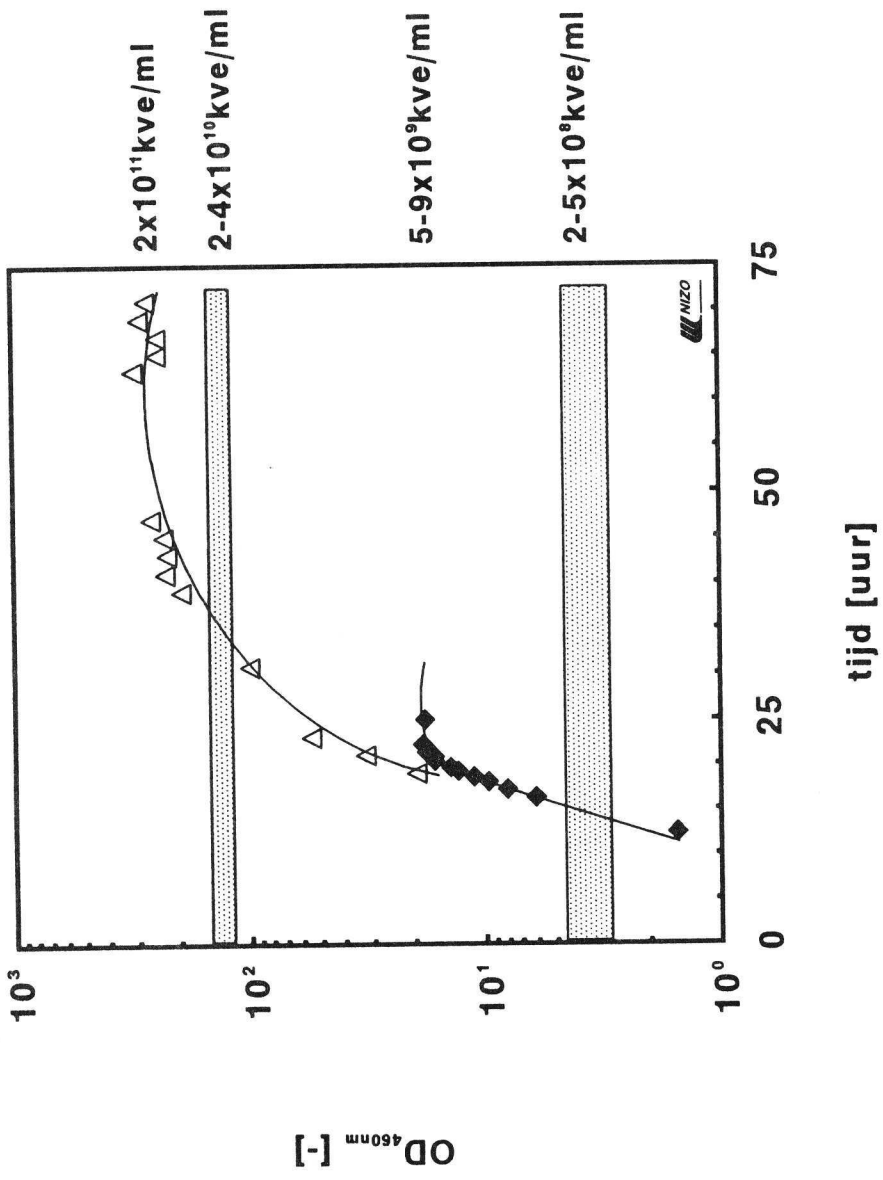
MELKZUURPRODUCTIE BIJ HET GEBRUIK VAN CELRECIRCULATIEFERMENTATIE
T.O.V. BATCHGEWIJZE FERMENTATIE

FERMENTATIE TYPE	OPBRENGST	KOSTPRIJS (in fl/kg)
	CONCENTRATIE (g/l)	4,5x10 ⁵ kg/jaar
	PRODUCTIVITEIT (g/l/h)	45x10 ⁵ kg/jaar
BATCH-GEWIJS	120-150	1,58
CELRECIRCULATIE	50	0,43
		1,35
		0,83



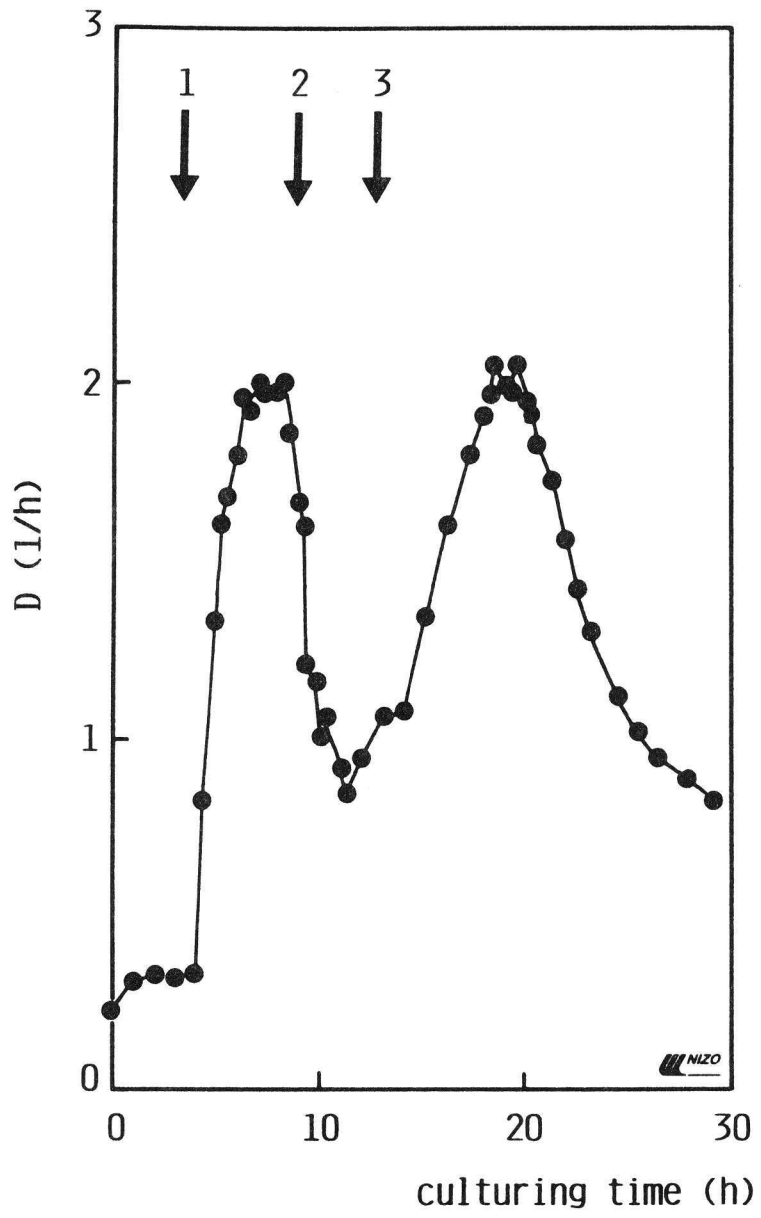
Biomassa opbrengst Lactococcus bij verschillende kweekwijzen

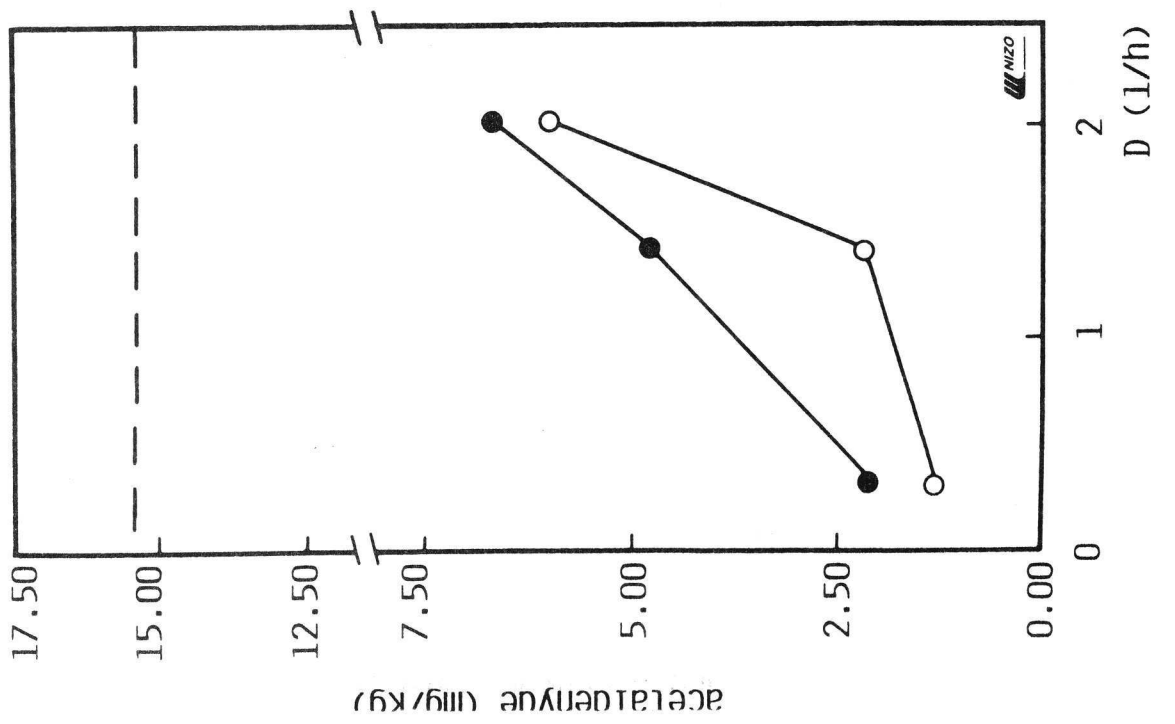
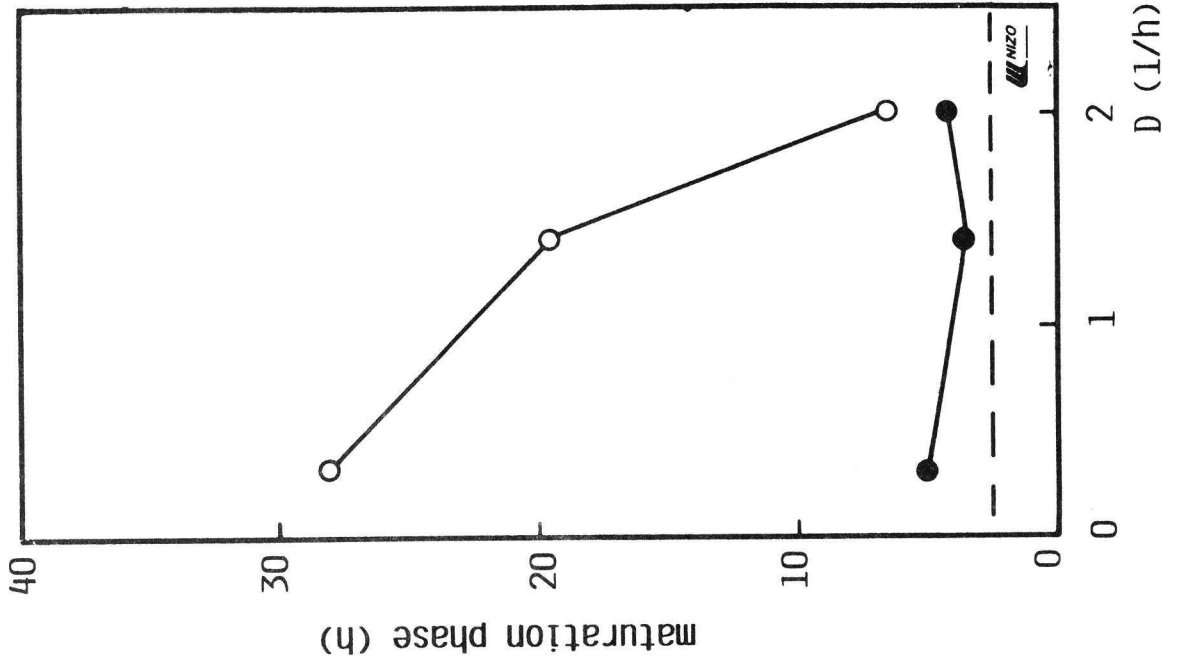
◆ batch(NV) △ MCRF

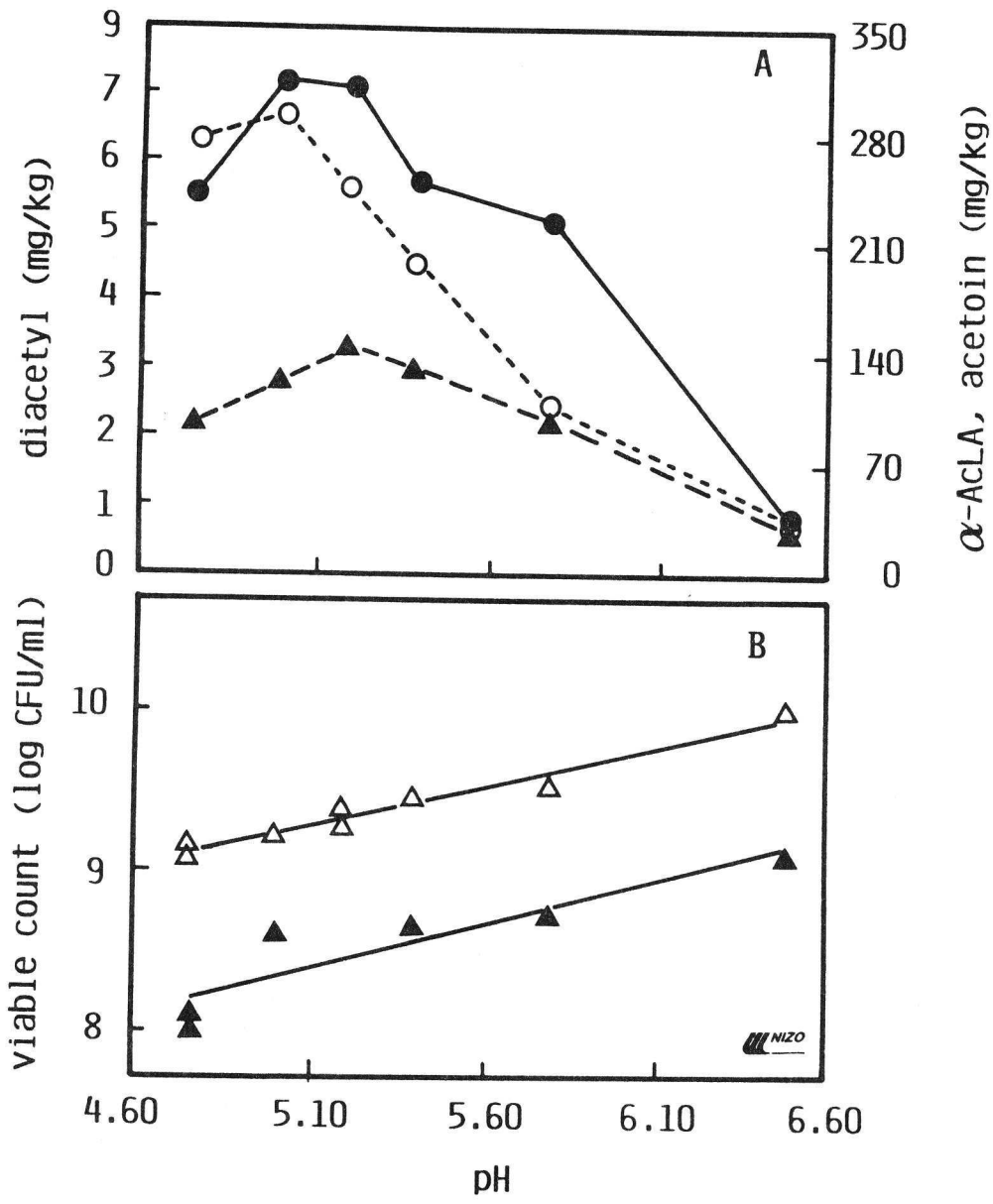


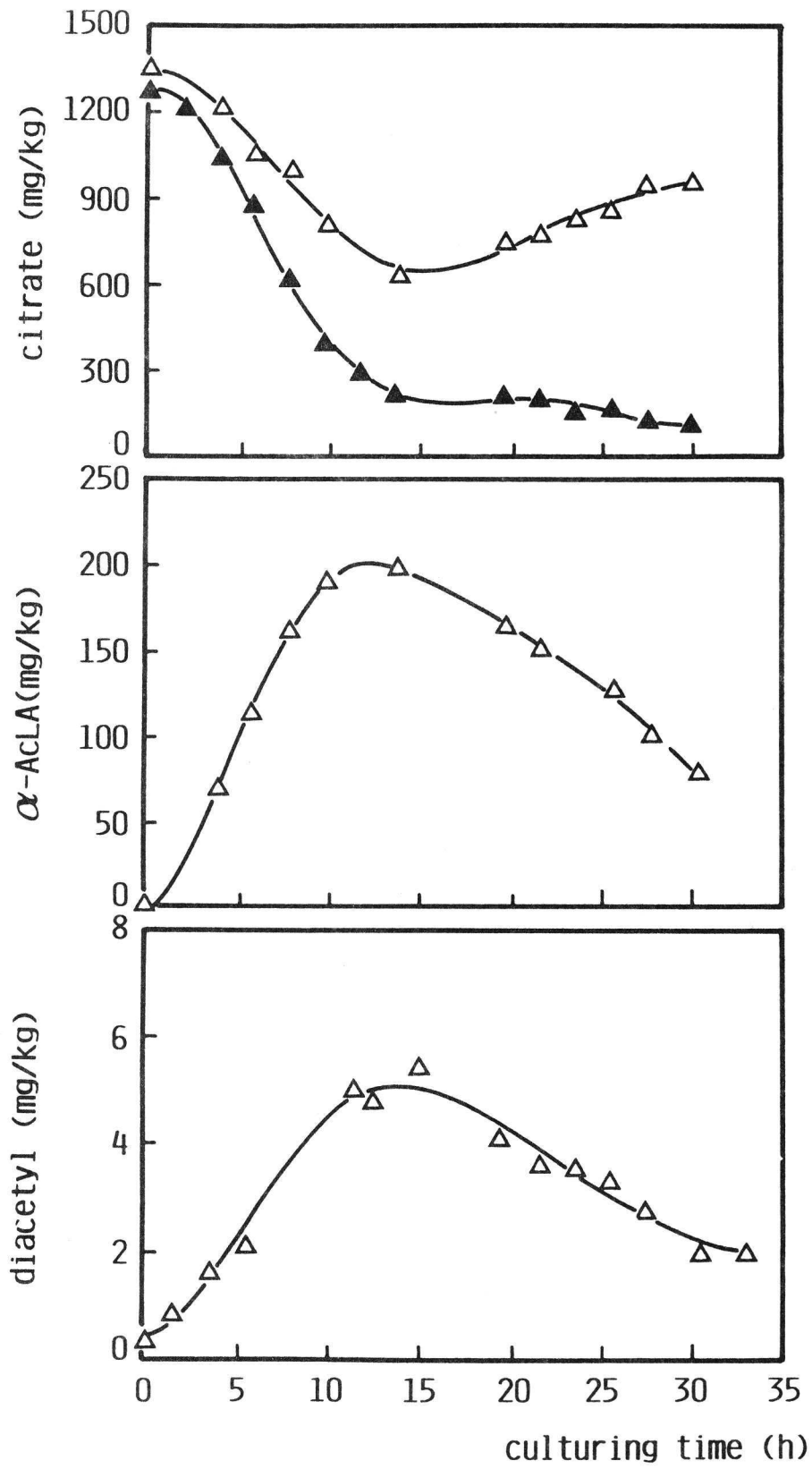
GEBRUIKTE ORGANISMEN BIJ MEMBRAANDIALYSEFERMENTATIE

PRODUKTTYPE	COMPARTIMENT I	(PRODUKT-)COMPARTIMENT II
YOGHURT	<i>L. delbrückii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
KARNEMELK	citraatvergistende m.z.b.: <i>L. diacetyllactis</i> of <i>Leuconostoc</i>	niet-citraatvergistende m.z.b.: <i>L. lactis</i> of <i>L. cremoris</i>









CONCLUSIES

CELRECIRCULATIEFERMENTATIE:

- MELKZUURPRODUCTIE ECONOMISCH ONINTERESSANT
 - 5 à 6 MAAL HOGERE BIOMASSACONCENTRATIE T.O.V. CONVENTIONELE CONCENTRATEN
-

MEMBRAANDIALYSEFERMENTATIE

- YOGHURT: BEPERKING VAN NAZURING TIJDENS OPSLAG
 - KARNEMELK: STABILISERING VAN HET DIACETYL
-