

*Przemysław Rożek, Agata Znamirowska, Dorota Kalicka, Małgorzata Pawlos,
Magdalena Buniowska*

ZASTOSOWANIE *SACCHAROMYCES BAYANUS* ORAZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE VEL. BAYANUS* W PRODUKCJI NAPOJU Z SERWATKOWEGO PERMEATU NISKOLAKTOZOWEGO

Zakład Technologii Mleczarstwa, Wydziału Biologiczno-Rolniczego
Uniwersytetu Rzeszowskiego
Kierownik: dr hab. inż. prof. UR *A. Znamirowska*

*Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania permeatu serwatki podpuszczkowej, niskolaktazowej do produkcji napojów fermentowanych przez *Saccharomyces bayanus* oraz *Saccharomyces cerevisiae vel. bayanus*. Niskolaktazowy permeat serwatkowy okazał się być przydatny jako substrat do produkcji napojów nasyconych CO₂. Drożdże *Saccharomyces bayanus* produkowały więcej alkoholu niż *Saccharomyces cerevisiae vel. bayanus*, jednakże intensywny smak i zapach obcy dyskwalifikował zastosowanie tych drożdży do fermentacji permeatu.*

Hasła kluczowe: napoje niskolaktazowe, *Sacharomyces*, permeat serwatkowy, fermentacja.

Key words: low-lactose beverages, *Sacharomyces*, whey permeate, fermentation.

W Polsce intensywnie rozwija się serowarstwo. W 2016 r. wytworzono o 5,4% więcej różnych typów serów niż w 2015 r. i o 37% więcej niż w 2006 r. Zatem w latach 2007–2016 produkcja serów w Polsce rozwijała się w średniorocznym tempie 3,2% proporcjonalnie zwiększając ilość oddzielonej serwatki (GUS, 2016). Mimo dużego wykorzystania serwatki w różnych gałęziach przemysłu (farmaceutyczny, suplementy diety) jej ilość przekracza obecne możliwości efektywnego jej zagospodarowania i stwarza konieczność kosztownej jej utylizacji. Dlatego poszukuje się wciąż nowych dróg jej zastosowania w produkcji żywności i przemyśle (1). Płynna serwatka może być przetwarzana za pośrednictwem m.in. wysokociśnieniowych procesów membranowych, w tym ultrafiltracji. Cenne makrocząsteczki (białka) pozostają w retencji, natomiast rozpuszczalne w wodzie mikrocząsteczki, jak laktoza i minerały przechodzą do filtratu (permeatu). Po zagęszczeniu i krystalizacji, laktoza może służyć m.in. jako składnik produktów piekarniczych do nadania brązowej barwy, jako składnik żywności dietetycznej ze względu na niski indeks glikemiczny i do wytwarzania napojów niskoalkoholowych (2). Produkcja napojów alkoholowych opartych na bazie składników serwatki wydaje się być interesującą perspektywą na jej zagospodarowanie. Serwatkowe piwo, wino czy gazowany napój alkoholowy odznaczają się niską zawartością alkoholu i wytwarzane są głównie z odbiałzonej serwatki lub permeatu (3). W Polsce ten kierunek zagospodarowania serwatki nie jest popularny, a przykła-

dem wykorzystania serwatki może być napój musujący „Serwowit”. Poza naszymi granicami napoje serwatkowe cieszą się uznaniem konsumentów i można wymienić szwajcarską *Rivellę* czy *Gefilus* produkowany w Finlandii ze zdemineralizowanej serwatki fermentowanej przez *Lactobacillus rhamnosus* (2, 4).

Nieodzownym składnikiem serwatki, jak i również permeatu serwatkowego jest laktoza, która może powodować dolegliwości ze strony układu pokarmowego u osób z alaktazją lub hipolaktazją. Obecnie ocenia się, iż u ok. 20–25% dorosłych Polaków występuje nietolerancja laktozy, będąca następstwem fizjologicznego spadku aktywności enzymu laktazy postępującego wraz z wiekiem (5).

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania permeatu serwatki podpuszczkowej, niskolaktozowej do produkcji napojów fermentowanych przez *Saccharomyces bayanus* oraz *Saccharomyces cerevisiae* vel. *bayanus*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do produkcji napojów stanowił permeat otrzymany w wyniku ultrafiltracji serwatki podpuszczkowej, o składzie chemicznym: białko 0,16%, laktoza 4,86 %, tłuszcz 0,12 %, pH = 6,01. Do rozkładu cukru mlecznego wykorzystano laktazę Lacta-Free (Biochems.r.l., Włochy) dodając 2 g/dm³ serwatki i przechowując w temp. 8–10°C przez 12 godz., co zgodnie z deklaracją producenta powodowało hydrolizę laktozy na poziomie 99%.

Permeat spasteryzowano (95°C, 30 min), schłodzono (30°C) i dosłodzono sacharozą (40 g sacharozy/dm³) i podzielono na 2 grupy. Do pierwszej dodano drożdże SIHA Aktive 4, (*Saccharomyces bayanus* – szczep CH 158) wyprodukowane przez E. Begerow GmbH &Co (Niemcy), a do drugiej drożdże MYCOFERM CRU 69 (*Saccharomyces cerevisiae* vel. *bayanus*) wyprodukowane przez Eversrl (Włochy). Doświadczenie wykonano w pięciu niezależnych powtórzeniach w każdej grupie.

Przeprowadzono fermentację permeatów w temp. 23°C przez 28 dni, dosładzając co 7 dni sacharozą (40 g sacharozy/dm³) oraz kontrolując raz w tygodniu, przed dosłodzeniem skład chemiczny, pH, kwasowość ogólną. Po 28 dniach nastawy złano, filtrowano i dosłodzono do zawartości cukru 12,0 ± 0,2% oraz dodano esencji mango-marakuja (Biowin, Polska) w ilości 10 cm³/dm³. Napoje rozlano do butelek o pojemności 1 dm³ i dokładnie zakręcono zakrętkami. Przeprowadzono refermentację w temp. 25°C przez 4 dni w celu nasycenia CO₂. Następnie napoje schłodzono do temp. 5°C i tak wychłodzone poddano ocenie.

Oznaczono zawartości alkoholu (6), kwasowość ogólną w °SH (7) oraz skład chemiczny analizatorem składu chemicznego mleka Bentley B-150 (Bentley, USA). Kwasowość czynną oznaczono pH-metrem FiveEasy PLUS FP20 (Mettler Toledo, Szwajcaria) wyposażonym w elektrodę LE438 z zintegrowanym czujnikiem temperatury. Do oceny organoleptycznej napojów wykorzystano metody profilowania sensorycznego (PN-ISO 11035:1999, PN-ISO 4121:1998). Oceniono: wygląd, nasycenie CO₂, barwę, klarowność, smak kwaśny, słodki, obcy, gorzki, drożdżowy, wyczuwalność alkoholu, intensywność aromatu, trwałość aromatu i smaku oraz obecność zapachu obcego. Odpowiednio przeszkolony, 20-osobowy panel konsumencki oceniał zakodowane próbki pod względem intensywności występowania ocenianej cechy. Badający podawali swoją ocenę na kartach ze skalą liniową podzieloną na

9 odcinków, z oznaczeniami na obu jej końcach w przypadku oceny konsystencji i barwy: na lewym (1 jednostka): „mało charakterystyczna” i na prawym (9 jednostek) „bardzo charakterystyczna”. W ocenie smaku i zapachu oznaczeniami brzegowymi były „niewyczuwalny” i „bardzo intensywny”. Ocena pożądalności polegała na uszeregowaniu próbek wg kolejności od najbardziej pożądanej (najlepsza) do najmniej pożądanej (najgorsza).

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica ver. 12. Przeprowadzono jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji, a istotność pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem Tukey'a, przy $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Saccharomyces cerevisiae vel. *bayanus* (MYCOFERM CRU69) użyte w doświadczeniu są drożdżami pracującymi w szerokim zakresie temperatur oraz posiadają faktor killera, co czyni je wyjątkowo użytecznymi w winiarstwie. Natomiast *Saccharomyces bayanus* (SIHA 4) stosowane są również w winiarstwie do szybkiego zafermentowania oraz dokończenia zatrzymanej przedwcześnie fermentacji (E. Begerow GmbH & Co, Eversrl). Niestety drożdże te nie posiadają systemu permeazy laktozowej ani β -D-galaktozydazy, dlatego też konieczne było wcześniejsze rozłożenie laktozy do glukozy i galaktozy, aby cukry te mogły stanowić oprócz sacharozy źródło węgla dla drożdży (1, 8).

Tab e l a I. Właściwości fizykochemiczne permeatów podczas fermentacji w zależności od rodzaju drożdży
Tab l e I. Physicochemical properties of the permeates during fermentation depending on the type of yeast

Lp.	Właściwości	Dzień badań	Drożdże	
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> vel. <i>bayanus</i> (MYCOFERM CRU69)	<i>Saccharomyces bayanus</i> (SIHA 4)
1	pH	7	5,39 aD \pm 0,03	5,38 aD \pm 0,02
		14	4,53 aC \pm 0,03	4,52 aC \pm 0,02
		21	3,98 aB \pm 0,03	4,35 bB \pm 0,04
		28	3,86 aA \pm 0,00	4,27 bA \pm 0,00
2	Kwasowość ogólna °SH	7	23,40 aA \pm 0,56	22,00 aA \pm 0,84
		14	27,00 bB \pm 0,84	25,20 aB \pm 0,28
		21	32,40 bC \pm 0,32	29,20 aC \pm 0,56
		28	36,80 bD \pm 0,09	33,20 aD \pm 0,51
3	Białko %	7	0,11 aA \pm 0,01	0,10 Aa \pm 0,01
		14	0,14 aB \pm 0,02	0,13 Ba \pm 0,02
		21	0,17 aC \pm 0,01	0,14 a \pm 0,02 B
		28	0,20 bD \pm 0,01	0,17 a \pm 0,02 C
4	Cukry %	7	3,49 bA \pm 0,03	3,29 aA \pm 0,06
		14	6,77 bB \pm 0,05	6,57 aB \pm 0,03
		21	8,06 aC \pm 0,02	8,09 aC \pm 0,02
		28	9,42 bD \pm 0,03	9,07 aD \pm 0,01

a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w wierszu przy $p \leq 0,05$ (szczep drożdży),
A,B,C,D – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kolumnie w obrębie danej cechy przy $p \leq 0,05$ (czas fermentacji)

W czasie 28 dni fermentacji permeatów stwierdzono sukcesywny wzrost kwasowości ogólnej oraz obniżanie się pH nastawów MYCOFERM CRU69 i SIHA 4 (tab. I). Istotnie wyższą kwasowość ogólną oznaczono w permeacie fermentowanym przez MYCOFERM CRU69 począwszy od 14 aż do 28 dnia fermentacji. Różnica w kwasowości ogólnej nastawów w zależności od zastosowanych drożdży w 28 dniu fermentacji wynosiła 3,60 °SH.

W tym terminie kwasowość czynna w obu nastawach również różniła się istotnie, o 0,41 jednostki pH. W trakcie fermentacji zaobserwowano wzrost ilości białka w obydwu badanych nastawach, co było wynikiem wzrostu biomasy drożdży. Duża zawartość białka mogłaby skutkować zwiększeniem ilości wyższych alkoholi tzw. fuzli. Obecność ich wynika z odszczepiania amoniaku z aminokwasów w celu syntezy własnego białka. Fuzle są niepożądane w produkcji etanolu do celów spożywczych, a obecność powyżej 1% dyskwalifikuje z dalszego użycia wg PN-74/A-79523. Ponadto białko sprzyja flokulacji (zlepianiu się komórek drożdży), niekorzystnie wpływa na proces fermentacji (1).

Drożdże *Saccharomyces bayanus* lepiej odfermentowały cukry, ponieważ w nastawach tych oznaczono niższą zawartość węglowodanów w 7, 14, 21 i 28 dniu fermentacji. Wyraźniejsze wykorzystanie cukrów podczas fermentacji potwierdzają także badania *Rajkowskiej* i współpr. (10), którzy stwierdzają wyraźną odmienną międzyszczepową drożdży *Saccharomyces bayanus* oraz *Saccharomyces cerevisiae*. Bezpośrednim przełożeniem lepszej dynamiki fermentacji cukrów była istotnie różna ilość alkoholu wynoszącego odpowiednio 8,50% dla napoju fermentowanego przez SIHA 4 oraz 6,50% dla Mycoferm CRU69 (tab. II).

Tabela II. Skład chemiczny i kwasowość napojów smakowych w zależności od rodzaju drożdży
Table II. Chemical composition and acidity of flavoured milk beverages depending on the type of yeast

Skład	Napój MYCOFERM CRU69	Napój SIHA 4
Białko (%)	0,05 a ±0,02	0,03 a ±0,02
Tłuszcz (%)	0,11 a ±0,01	0,10 a ±0,00
Cukry (%)	12,00 a ±0,13	12,01 a ±0,01
Alkohol (%)	6,50 a ±0,56	8,50 b ±0,03

a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w wierszu przy $p \leq 0,05$

W produkcji napojów na bazie serwatki najczęściej stosuje się dodatki w postaci skoncentrowanych soków, zwłaszcza cytrusowych (pomarańcza, grejpfrut), jak również jabłkowych czy gruszkowych skutecznie maskujących smak serwatki (1, 4). Użyta esencja mango-marakuja okazała się być efektywna w ukrywaniu niepożądanego zapachu gotowanego mleka charakterystycznego dla serwatki podpuszczkowej. Respondenci zdecydowanie bardziej preferowali napój fermentowany przez MYCOFERM CRU69 niż napój SIHA 4 (tab. III). Oceniający korzystniej ocenili w napojach MYCOFERM CRU69 barwę, nasycenie dwutlenkiem węgla, intensywność aromatu oraz wskazali na słabszy posmak gorzki i drożdżowy. Z kolei w napojach SIHA-4 intensywny smak i zapach obcy oraz smak drożdżowy przyczyniły się do ich niższej akceptacji.

Literatura przedmiotu (12) dostarcza informacji, że w wyniku fermentacji alkoholowej serwatki powstają krótkołańcuchowe estry kwasów tłuszczowych przyczyniające się do owocowego i aromatycznego aromatu oraz niskie stężenia związków lotnych (metanol, aldehyd octowy i octan etylu). Stężenie metabolitów drożdży tj. aldehydów, estrów, kwasów i terpenów uzależnione jest od drożdży (12, 13, 14). Również wyniki oceny organoleptycznej badanych napojów potwierdzają, że szczep drożdży kształtuje smak i zapach napojów z permeatu niskolaktosowego.

Serwatkę ze hydrolizowaną laktozą w badaniach właściwości napojów zastosowali Singh i współpr. (11). Stwierdzili, że rozkład laktozy powoduje wzmocnienie smaku, zwiększenie ciśnienia osmotycznego i rozpuszczalności sacharydów, podnosi słodycz oraz ułatwia trawienie i fermentację. Cytowani badacze (11) dowodzą, że niskolaktosowe napoje odznaczają się lekkim, orzeźwiający smakiem oraz są mniej kwaśne w porównaniu z tradycyjnymi oferowanymi z dodatkiem soków owocowych.

Tab e l a III. Właściwości organoleptyczne napojów smakowych z permeatu niskolaktosowego

Tab l e III. Organoleptic properties of flavoured milk beverages from low-lactose whey permeate

Właściwości	MYCOFERM CRU69	SIHA 4
Preferencje	1,03 a±0,38	1,86 b±0,88
Wygląd	5,25 a±1,95	4,66 a±1,49
Nasylenie CO ₂	4,50 a±1,38	3,50 a±1,83
Barwa	4,91 a±1,92	4,33 a±1,22
Klarowność	3,91 a±1,19	3,90 a±1,02
Smak kwaśny	5,33 a±1,61	6,20 a±1,27
Smak słodki	3,08 a±1,67	3,91 a±1,39
Smak obcy	3,25 a±1,30	7,33 b±1,14
Gorycz	4,41 a±1,57	4,91 a±1,42
Smak drożdżowy	4,58 a±1,39	6,00 b±1,41
Wyczuwalność alkoholu	4,16 a±1,99	4,41 a±1,06
Intensywność aromatu	5,16 a±1,08	4,83 a±1,89
Trwałość aromatu i smaku	5,16 a±1,89	5,75 a±1,17
Zapach obcy	5,23 a±1,18	7,66 b±0,42

a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w wierszu przy p≤0,05

WNIOSKI

1. Niskolaktosowy permeat serwatkowy może być zastosowany do produkcji napojów naturalnie nasyconych CO₂.

2. Drożdże *Saccharomyces bayanus* (SIHA 4) lepiej odfermetowały cukry wytwarzając więcej alkoholu z permeatu serwatkowego, a wytworzone przez nie metabolity mniej zakwaszały środowisko niż *Saccharomyces cerevisiae* vel. *bayanus* (MYCOFERM CRU69).

3. Na smak i zapach napojów z permeatu duży wpływ miał szczep drożdży zastosowany do fermentacji. Oceniający zdecydowanie preferowali napój MYCOFERM CRU69 doceniając korzystniejszą barwę, nasycenie CO₂ oraz intensywniejszy aromat dodatków. Natomiast drożdże *Saccharomyces bayanus* (SIHA 4) nadawały napojom intensywny smak i zapach obcy, które to cechy dyskwalifikują zastosowanie tych drożdży do fermentacji permeatu.

P. Rożek, A. Znamirska, D. Kalicka, M. Pawlos, M. Buniowska

APPLICATION OF *SACCHAROMYCES BAYANUS* AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VEL. *BAYANUS* IN THE PRODUCTION OF BEVERAGE FROM LOW-LACTOSE WHEY PERMEATE

Summary

The cheese production in Poland is growing rapidly. In 2016, approximately 5.4% more various kinds of cheese were produced in comparison to the previous year and about 37% more than in 2006. As a result, the amount of whey produced is increasing systematically, therefore, milk industry is faced with the use of whey. The amount of whey surpasses the current possibilities of its efficient utilization and makes the necessity for costly utilization. Whey, the liquid residue of cheese, can be processed through high-pressure membrane processes, including ultrafiltration. The production of alcoholic whey-based beverages seems to be an interesting prospect for its development and an example of the use of whey may be the sparkling beverage named "Serwowit". The aim of this work was to evaluate the use of low-lactose rennet whey permeate for the production of beverages fermented by *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae* vel. The material used for the beverages production was a permeate obtained by the ultrafiltration of rennet whey. Fermentation of permeates was performed at 23°C for 28 days with the addition of sucrose every 7 days (40 g sucrose per liter). The chemical composition, pH and total acidity were analyzed once a week, prior to sweetening. After 28 days of fermentation, beverages were enriched with the mango-passion fruit additive. Then, the whey was fermented at the temperature of 25°C for 4 days to saturate it with carbon dioxide. The beverages were chilled down to 5°C and submitted to organoleptic evaluation. Low-lactose rennet whey permeate can be used to produce naturally-saturated carbonated beverages. *Saccharomyces bayanus* yeast (SIHA 4) made better use of sugars producing more alcohol, and their metabolites less acidified than *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (MYCOFERM CRU69). The taste and aroma of permeate beverages were influenced by the yeast strain used for fermentation. The evaluators strongly preferred the MYCOFERM CRU69 beverage due to a better color, CO₂ saturation and a stronger aroma of additives. *Saccharomyces bayanus* (SIHA 4) gave the beverage intense flavors and off-flavors which disqualify the use of these yeasts for permeate fermentation.

PIŚMIENNICTWO

1. *Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z.*: Wykorzystanie serwatki w procesach biotechnologicznych. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 2014; 1:12. – 2. *Mucsi I., et al.*: Serwatka – aspekty teoretyczne. Materiały szkoleniowe opracowane w ramach projektu WhyWhey, 2014; 75. – 3. *Królczyk, J., Dawidziuk T., Janiszewska-Turak E., Sołowiej B.*: Zagospodarowanie serwatki na przykładzie wybranego zakładu mleczarskiego. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2016; 66(3): 157-165. – 4. *Chavan R.S., Shraddha R.C., Kumar A., Nalawade T.*: Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. *Journal of Food Process Technol.*, 2015; 6: 10. – 5. *Rychlik U., Marszałek A.*: Nietolerancja laktozy – współczesny stan wiedzy. *Journal of Laboratory Diagnostics*, 2013; 49(1): 71-73. – 6. *Gonchar M.V., Maidan M.M., Pavlishko H.M., Sibirny A.A.*: A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol. Biotechnol.*, 2001; 39 (1): 37-42. – 7. *Litwińczuk A., Litwińczuk Z., Barłowska J., Florek M., Król J., Grodzicki T., Kędzińska-Matysek M., Skalecki P.*: Metody oceny towaroznawczej surowców i produktów zwierzęcych. Wyd. UP w Lublinie, 2011. – 8. *Guimarães P.M.R., Teixeira J.A., Domingues L.*: Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the

valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 2010; 28: 375-384. – 9. *Lipińska E, Bonin S, Leoniuk R, Hać-Szymańczuk E*: Wpływ składu podłoża fermentacyjnego i zastosowanych szczepów drożdży na przebieg fermentacji alkoholowej oraz jakość spirytusu surowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44 (3): 964-969. – 10. *Rajkowska K, Kunicka A*: Analiza profili fermentacyjnych i cech genotypowych mezofilnych szczepów drożdży winiarskich. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005; 43(2): 164-173.

11. *Singh S, Khemariya P, Rai A*: Process optimization for the manufacture of lemon based beverage from hydrolyzed whey. *Journal of Food Science and Technology*, 2011; 3: 1-9. – 12. *Dragone G, Muscato S.L, Oliveira J.M., Teixeira J.A.*: Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 2009; 112: 929-935. – 13. *Żarkowska B*: Biosynteza i charakterystyka toksyn killerowych drożdży *Debaryomyceshansenii*. Monografie CXLVI, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, 2012. – 14. *Kłosowski G., Czupryński B., Kotarska K., Wolska M.*: Charakterystyka zanieczyszczeń chemicznych obniżających jakość spirytusu surowego. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2003; 47(9): 37-38.

Adres: 35-601 Rzeszów, ul. M. Ćwiklińskiej 2d