

Инкапсулированные дрожжи в технологии напитка смешанного брожения на основе вторичного молочного сырья*

Иван Алексеевич Евдокимов, чл.-корр. РАН, д-р техн. наук, профессор, заведующий базовой кафедрой

E-mail: ievdokimov@ncfu.ru

Тигран Валерьевич Нерсисян, инженер

E-mail: tigran_nersesyan@mail.ru

Ирина Кирилловна Куликова, канд. техн. наук, старший научный сотрудник

E-mail: kik-st@yandex.ru

Мария Ивановна Шрамко, канд. биол. наук, старший научный сотрудник

E-mail: marusyashramko@yandex.ru

Людмила Руслановна Алиева, д-р техн. наук, ведущий научный сотрудник

E-mail: ali-ludmila@yandex.ru

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

Получение концентратов и изолятов сывороточных белков основано на мембранном фракционировании подсырной сыворотки. Побочным продуктом технологии является сывороточный пермеат, сухой остаток которого в основном состоит из лактозы и минеральных веществ. Пермеат не может напрямую сбрасываться в канализацию в качестве сточных вод, поскольку оказывает серьезное негативное воздействие на окружающую среду из-за его высокой биологической (БПК $\approx 30\,000\text{--}50\,000$ мг/л O_2) и химической (ХПК $\approx 60\,000\text{--}80\,000$ мг/л O_2) потребности в кислороде. Это является причиной того, что поиск безопасного и экономически выгодного способа переработки сывороточного пермеата в продукты с добавленной стоимостью представляет большой интерес для молочной промышленности. В данном исследовании была оценена возможность применения пермеата молочной сыворотки в качестве сырья для ферментированного напитка с использованием инкапсулированных дрожжевых клеток. Для сравнительного анализа были использованы образцы пермеата молочной сыворотки, заквашенные дрожжевой суспензией культуры *Kluyveromyces marxianus* в количестве $6,5 \times 10^4$ КОЕ/г, и микрокапсулами, содержащими суспензию дрожжей *Kluyveromyces marxianus* с равным количеством микроорганизмов. Результаты показали, что утилизация лактозы при использовании инкапсулированных микроорганизмов была более интенсивной. При этом, в первые 48 часов ферментации наличие дрожжей в образце, ферментированном инкапсулированными *Kluyveromyces marxianus*, не обнаружено. Спустя 72 часа ферментации, количество дрожжей в образце составило $1,1 \times 10^2$ КОЕ/г, тогда как в образце, заквашенном суспензией свободных *Kluyveromyces marxianus*, было обнаружено $6,1 \times 10^6$ КОЕ/г. Таким образом, проведенные исследования показали, что способ удержания дрожжевых клеток в альгинатных микрокапсулах позволяет избежать попадания и интенсивного роста дрожжей в питательной среде, не препятствуя утилизации лактозы и образованию основных метаболитов.

Ключевые слова: пермеат, молочная сыворотка, *Kluyveromyces marxianus*, альгинат, инкапсуляция

Для цитирования: Инкапсулированные дрожжи в технологии напитка смешанного брожения на основе вторичного молочного сырья / И. А. Евдокимов, Т. В. Нерсисян, И. К. Куликова [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2024. № 4. С. 42–47. <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2024-4-1>

Введение

Молочная отрасль является материало- и энергоемкой сферой экономики, поскольку более 80 % затрат в структуре себестоимости молочных продуктов составляет сырье. Промышленная переработка молока с использованием безотходных технологий, подразумевающая полное извлечение всех компонентов, рациональное использование промежуточных и побочных продуктов, а также минимизацию нормативных потерь и исключение неперерабатываемых отходов, играет ключевую роль в увеличении объемов производства молочных продуктов и повышении эффективности индустрии [1].

* Исследование финансировалось из средств гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Изучение механизмов взаимодействия молочнокислых микроорганизмов, лактозосбраживающих дрожжей и биологически активных веществ при микроинкапсулировании различных фракций микробиоты», Соглашение № 075-15-2022-1129 от 01.07.2022 г.

Источник изображения: t.me/handicraftcheeset



С развитием мембранных технологий появляются и новые методы обработки вторичного молочного сырья, позволяющие концентрировать и фракционировать те или иные компоненты молока, главным образом, его белковую составляющую. В процессе мембранной обработки образуется фракция, обедненная белками – пермеат. В него переходят низкомолекулярные компоненты сырья, лактоза, составляющая более 80 % сухого остатка пермеата, минеральные вещества, небелковые азотистые соединения и т. д. Можно отметить, что на сегодняшний день объемы получаемого пермеата становятся сравнимы с объемами молочной сыворотки. Так, при стандартизации белка в молоке для производства сыра и творога образуется порядка 30 % молочного пермеата от общего объема входящего сырья. При производстве концентрата сывороточных белков КСБ 35 эта цифра увеличивается до 80 %, а при выработке КСБ 60 – до 95 % исходной сыворотки [2]. С учетом высокой биологической (БПК $\approx 30000\text{--}50000$ мг/л O_2) и химической (ХПК $\approx 60000\text{--}80000$ мг/л O_2) потребности в кислороде, пермеат не может сбрасываться напрямую в качестве сточных вод. Помимо загрязнения окружающей среды это приведет к потерям ценного компонента молока – лактозы. Именно поэтому поиск инновационных и эффективных способов переработки пермеата становится все более актуальным для молочной промышленности.

Одним из вариантов решения проблемы является выработка сухого пермеата распылительной сушки. Продукт является альтернативой пищевой лактозе [2] и применяется в производстве десертов¹, хлебобулочных и кондитерских изделий², как компонент рекомбинированных молочных продуктов, таких как мороженое [3], и т. д. Однако технология сухого пермеата требует дополнительных процессов очистки, в частности деминерализации, кристаллизации, распылительной сушки, которые являются довольно дорогостоящими. Поэтому при малых объемах переработки сухой продукт имеет довольно высокую себе-

Источник изображения: t.me/handcraftcheese



стоимость. В этом случае коммерчески успешным способом переработки вторичного молочного сырья может стать ферментативная биоконверсия [1], в том числе при помощи лактозосбраживающих дрожжей *Kluyveromyces marxianus* [4].

Kluyveromyces marxianus – один из видов дрожжей, обладающих большой скоростью роста и термостабильностью. *Kluyveromyces marxianus* обычно выделяют из самых разнообразных природных сред обитания, таких как ферментированные традиционные молочные продукты, кефирный грибок, некоторые растения и т. д.

¹Мельникова, Е. И. Применение сывороточного пермеата в технологии замороженного десерта / Е. И. Мельникова, Е. В. Богданова, Д. А. Павельева, Я. А. Дорохова // Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство : VIII Международная научно-техническая конференция, Воронеж, 30 ноября 2022 года. Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2023. С. 199–201. <https://www.elibrary.ru/epxsqy>

²Писаревский, Д. С. Применение пермеата в производстве крекера / Д. С. Писаревский, Е. И. Пономарева, К. К. Полянский, С. А. Титов // Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение: Сборник научных статей и докладов IX Международной научно-практической конференции, Воронеж, 15–17 декабря 2022 года. Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2023. С. 406–407. <https://www.elibrary.ru/mclavb>

Промышленные штаммы *Kluuyveromyces marxianus* имеют статус GRAS, обладают способностью гидролизовать лактозу и применяются в производстве ряда ингредиентов [5]. Так, биоконверсия вторичного молочного сырья, включая пермеат подсырной сыворотки, при помощи дрожжей *Kluuyveromyces marxianus* предложена как способ получения различных видов спиртов, например фенилэтилового спирта [6], этанола [7]. Получение этанола исследовано не только из нативных образцов вторичного молочного сырья, но и из восстановленных [8]. Авторами [9] описан синтез этилацетата при помощи *Kluuyveromyces marxianus* DSM 5422 из безлактозного пермеата сыворотки, который был апробирован в аэрируемом биореакторе. Способность *Kluuyveromyces* ферментировать лактозу изучалась также применительно к технологии пивоподобного напитка на основе пермеата молочной сыворотки [10]. Можно отметить, что производство ферментированных напитков является одним из распространенных способов переработки вторичного молочного сырья [1]. Особенность таких продуктов заключается в том, что в процессе последующего хранения дрожжи становятся доминирующими микроорганизмами, благодаря которым продукт приобретает легкий дрожжевой вкус и специфический освежающий запах³. Срок хранения этих продуктов в определенной степени ограничивается также ростом дрожжей и последующим газообразованием. Попытки снижения газообразования использованием специальных штаммов дрожжей, либо термической инактивацией дрожжевой культуры часто приводят к снижению органолептических свойств таких продуктов. В качестве альтернативного решения может быть рассмотрен процесс инкапсулирования дрожжей.

Иммобилизация клеток инкапсулированием – одно из перспективных направлений улучшения их ферментативных и трофических свойств. Например, в исследовании [11] авторы изучали процесс инкапсулирования дрожжей *S. cerevisiae* var. *bouardii* альгинатом натрия. Данные, полученные [11], подтвердили, что микрокапсулирование обеспечивает лучшее выживание дрожжей и их контролируемое высвобождение. Инкапсуляция *S. cerevisiae* var. *bouardii* со смесью альгината и инулина использовалась для разработки новых функциональных

продуктов, таких как сыры и йогурты. Это увеличило жизнеспособность дрожжей и повысило качество продукта по сравнению с продуктом, содержащим свободные (неинкапсулированные) клетки.

С другой стороны, иммобилизация дрожжевых клеток в альгинатные микрокапсулы открывает возможность их многократного использования, улучшает и сохраняет естественный метаболизм и выживаемость, а также упрощает процесс их удаления из питательной среды. Подобный прием предложено использовать в молочной промышленности при производстве безлактозного молока [12] путем гидролиза лактозы, иммобилизованной β -галактозидазой. Это позволяет извлекать отработавший фермент из продукта, избегая дорогостоящей процедуры его термической инактивации [12].

Целью исследований было оценить возможность применения инкапсулированных лактозосбраживающих дрожжей *Kluuyveromyces marxianus* в технологии ферментированных напитков на основе пермеата молочной сыворотки.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования были образцы восстановленного сухого пермеата (ОАО Молочный комбинат «Воронежский») состав которого представлен в таблице 1. Для приготовления восстановленных образцов с массовой долей сухих веществ ($6,5 \pm 0,5$) % сухой пермеат смешивали с водой, нагретой до ($50,0 \pm 2,0$) °С, выдерживали при постоянном перемешивании (30–40) мин. до полного растворения, фильтровали через лавсановый фильтр, пастеризовали при температуре ($92,0 \pm 2,0$) °С без выдержки и охлаждали до температуры сквашивания ($25,0 \pm 2,0$) °С.

Таблица 1
Компонентный состав сухого пермеата

Наименования показателя	Значение	Метод измерения
Массовая доля влаги, %	$2,62 \pm 0,10$	ГОСТ 29246-91
Массовая доля сухих веществ, %	$97,38 \pm 0,50$	ГОСТ 29246-91
Массовая доля лактозы, %	$88,20 \pm 0,80$	ГОСТ 56833-2015
Массовая доля общего белка, %	$3,86 \pm 0,22$	ГОСТ 34454-2018

³Арсеньева, Т. П. Биотехнология продуктов из вторичного молочного сырья: учеб.- метод. пособие / Т. П. Арсеньева. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2014. – 48 с.

Заквашивание опытного образца проводилось инкапсулированным препаратом дрожжей *Kluuveromyces marxianus*, штамм ZIM 1868.

Изготовление микрокапсул было осуществлено при помощи инкапсулятора В-390 (Büchi Labortechnik, Флавиль, Швейцария). Принцип работы прибора основан на разбивке ламинарной струи путем применения вибрационной частоты с определенной амплитудой к экструдированной струе. Оптимальные параметры производства стабильных прочных микрокапсул правильной округлой формы (табл. 2) определяли в серии экспериментов, описанных в [13].

В качестве заквасочной культуры использовались дрожжи *Kluuveromyces marxianus*, штамм ZIM 1868.

Для проведения исследований были подготовлены контрольный и опытный образцы пермеата. Для контрольного образца использовался восстановленный пермеат, заквашенный суспензией свободных дрожжей *Kluuveromyces marxianus*, штамм ZIM 1868. Количество дрожжевой суспензии для заквашивания определялось из расчета возможности сопоставления ферментативной активности инкапсулированных и неинкапсулированных дрожжей, т. е. количество дрожжей в контрольном и опытном образце должно быть максимально близким. Поскольку микрокапсулы состояли на 50 % из раствора альгината натрия и на 50 % из суспензии дрожжей [13], масса микрокапсул, добавляемая в опытный образец, в 2 раза превышала количество дрожжевой суспензии, добавляемой в контрольный образец. Для исключения влияния дрожжей, задержанных отвердителем раствором на поверхности капсул [13], инкапсулированные дрожжи промывали стерильным раствором хлористого натрия с концентрацией 0,9 %. С учетом того, что процесс инкапсулирования проводился

при достижении стационарной фазы роста дрожжей в питательной среде [13], что соответствовало содержанию дрожжей $6,5 \times 10^4$ КОЕ/см³, суспензия свободных дрожжей имела аналогичные характеристики.

Сквашивание контрольного и опытного образцов происходило при постоянном перемешивании при температуре $(25,0 \pm 2,0)$ °С в течение 48 ч. Эксперименты проводились в трехкратной повторности. Для определения органолептических и физико-химических и характеристик объектов исследования, использовались стандартные методы согласно ГОСТ 33957-2016.

Таблица 2
Оптимальные параметры инкапсуляции
***Kluuveromyces marxianus* альгинатом натрия**

Параметр	Значение
Диаметр сопла, нм	150
Напряжение, В	1200
Поток, мл/мин	$2,5 \pm 0,2$
Концентрация хлорида кальция, %	$1,5 \pm 0,1$
Концентрация альгината натрия, %	$2,0 \pm 0,1$
Соотношение дрожжевая суспензия/альгинат натрия	1/1



Источник изображения: t.me/handicraftcheese1

Результаты и их обсуждение

В процессе ферментации фиксировалась динамика изменения активной кислотности и содержание лактозы в образцах (см. рис. и табл. 3).

Анализ графических зависимостей показал, что активная кислотность опытного образца (инкапсулированные дрожжи) была несколько выше, чем у контроля (свободные дрожжи). Это можно связать с накоплением продуктов жизнедеятельности дрожжей в альгинатных капсулах, тогда как в образце, заквашенном свободными дрожжами, продукты жизнедеятельности дрожжей попадали сразу в питательную среду. Незначительное увеличение значений pH после 24 часов ферментации может быть связано с растворением и переходом CO₂ в равновесное состояние после окончания замедления ферментации.

Однако активная кислотность является косвенным признаком активности дрожжей. Для того, чтобы глубже понять динамику ферментации среды, была определена степень утилизации

основного углевода исследуемых образцов – лактозы. С этой целью в образцах определяли содержание лактозы (табл. 3) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [13].

Согласно полученным данным, инкапсулированные дрожжи демонстрировали более высокую степень утилизации лактозы по сравнению со свободно суспендированными клетками. Более того, максимальное количество лактозы метаболизировалось в первые часы ферментации: 60,0 % для инкапсулированных и 28,5 % для свободных дрожжей. После 12 часов ферментации процесс утилизации лактозы замедлялся, причем на протяжении всего процесса ферментации в образцах отмечалось наличие незначительного количества галактозы (0,1–0,2 г/л) и следовое количество глюкозы.

По внешнему виду через 48 ч. ферментации образцы, заквашенные инкапсулированными дрожжами, представляли из себя прозрачную жидкость приятного карамельного цвета с небольшим слоем пены и осадком, состоящим из микрокапсул. Образцы, заквашенные суспензией свободных дрожжей, имели вид мутной жидкости карамельного цвета с пеной на поверхности. Оба образца имели выраженный дрожжевой запах и вкус, характерный для напитков смешанного или спиртового брожения.

Поскольку во время образования микрокапсул некоторые клетки могут закрепляться на периферии и на дальнейших этапах обработки вытесняться из поверхности микрокапсулы, например, за счет почкования дрожжей, было определено количество дрожжей в жидкой фазе контрольного и опытного образцов (ГОСТ 33566-2015). Согласно полученным результатам (табл. 4), в течение 48 часов

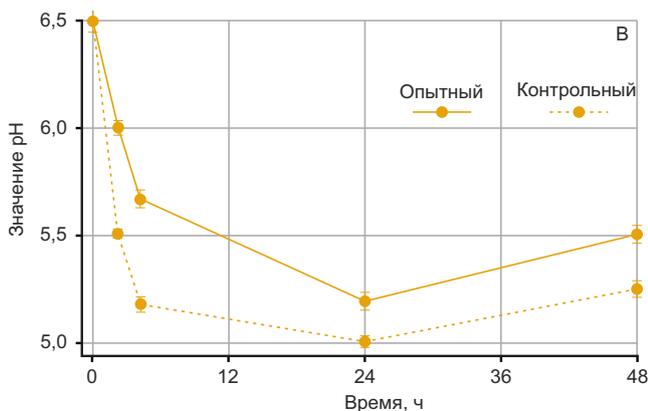


Рисунок. Динамика активной кислотности опытного и контрольного образцов в процессе ферментации

Таблица 3

Изменение содержания лактозы в образцах в процессе ферментации *Kluyveromyces marxianus*

Длительность ферментации, ч	Содержание лактозы, г/л	
	Инкапсулированные	Свободные
0	10,00 ± 0,21	10,00 ± 0,16
6	4,70 ± 0,15	7,20 ± 0,12
12	4,00 ± 0,13	7,15 ± 0,08
24	3,70 ± 0,09	7,13 ± 0,13
48	2,90 ± 0,15	6,81 ± 0,14

Таблица 4

Содержание дрожжей в ферментированных образцах

Длительность ферментации, ч	Количество дрожжей, КОЕ/г	
	Инкапсулированные	Свободные
0	–	0,9 × 10 ⁴
12	–	7,1 × 10 ⁴
24	–	13 × 10 ⁴
36	–	97 × 10 ⁴
48	–	340 × 10 ⁴
72	1,1 × 10 ²	610 × 10 ⁴

ферментации не произошло пролиферации микрокапсул, поскольку в опытном образце дрожжевых клеток не обнаружено. Дополнительное исследование образцов после 72 ч ферментации показало наличие $1,1 \times 10^2$ КОЕ/г дрожжей в опытном образце, тогда как в образце с суспендированными дрожжами количество дрожжей составляло $6,10 \times 10^6$ КОЕ/г.

Выводы

Таким образом, полученные результаты показывают, что инкапсуляция дрожжей перед ферментацией удерживает подавляющее большинство дрожжей в микрокапсулах и препятствует

их интенсивному росту в продукте. Можно предположить, что удаление инкапсулированной дрожжевой культуры после ферментации позволит избежать формирования интенсивного дрожжевого привкуса и запаха, предотвратит избыточное газообразование в напитке в процессе хранения, при этом дрожжевая культура может быть использована повторно [14]. Поэтому использование инкапсулированных дрожжей открывает широкие перспективы для улучшения качества и стабильности напитков, что делает их более привлекательными для потребителей. Разработка и изучение этой технологии является актуальной задачей для дальнейших исследований. ■

Encapsulated Yeast in Mixed Fermentation of Secondary Dairy Raw Materials

Ivan A. Evdokimov, Tigran V. Nersesyan, Irina K. Kulikova, Maria I. Shramko, Lyudmila R. Alieva
North Caucasian Federal University, Stavropol

Membrane fractionation of cheese whey produces whey protein concentrates and isolates. Its by-product is whey permeate, i.e., a dry residue of lactose and minerals. Permeate possesses high biological (30,000–50,000 mg/L O₂) and chemical (60,000–80,000 mg/L O₂) oxygen demand. As a result, whey permeate is a potential environmental hazard and cannot be discharged into the sewer as wastewater. Food scientists are looking for a safe and cost-effective method to process whey permeate into value-added products. In this study, whey permeate served as a raw material for a new mixed-fermentation beverage with encapsulated yeast. Some whey permeate samples were fermented with 6.5×10^4 CFU/g of *Kluyveromyces marxianus* suspension while others were fermented with its encapsulated suspension. The lactose utilization proved to be more intense in the experimental samples with encapsulated yeast. The same samples revealed no presence of yeast during the first 48 h of fermentation. The amount of yeast reached 1.1×10^2 CFU/g after 72 h of fermentation whereas the control sample demonstrated 6.1×10^6 CFU/g. The method of retaining yeast cells in alginate microcapsules prevented it from entering the nutrient medium and growing. The process did not interfere with the lactose utilization and metabolite formation.

Keywords: permeate, whey, *Kluyveromyces marxianus*, alginate, encapsulation

Список литературы

- Залашко, М. В. Биотехнология переработки молочной сыворотки / М. В. Залашко. – М.: ВО Агропромиздат, 1990. – 192 с.
- Евдокимов, И. А. Деминерализованный пермеат, как альтернатива молочному сахару / И. А. Евдокимов, Д. Н. Володин, В. К. Топалов, В. А. Михнева // Молочная промышленность. 2013. № 2. С. 38. <https://www.elibrary.ru/pvnbpt>
- Мельникова, Е. И. Состав и функционально-технологические свойства пермеата подсырной сыворотки / Е. И. Мельникова, Е. В. Богданова, Д. А. Павельева // Хранение и переработка сельхозсырья. 2022. № 1. С. 223–232. <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.258>; <https://www.elibrary.ru/zqqsaa>
- Guimarães, P. M. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey / P. M. Guimarães, J. A. Teixeira, L. Domingues // Biotechnology advances. 2010. Vol. 28(3). P. 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>
- Hensing, M. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus* / M. Hensing [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. 1994. Vol. 42. P. 516–521. <https://doi.org/10.1007/BF00173914>
- Drežek, K. Development of a Continuous System for 2-Phenylethanol Bioproduction by Yeast on Whey Permeate-Based Medium / K. Drežek [et al.] // Molecules. 2021. Vol. 26(23). 7388. <https://doi.org/10.3390/molecules26237388>
- Christensen, A. D. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus* / A. D. Christensen [et al.] // Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2011. Vol. 38(2). P. 283–289. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0771-0>
- Ozmihi, S. Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution / S. Ozmihi, F. Kargi // Letters in applied microbiology. 2007. Vol. 44(6). P. 602–606. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02132.x>
- Hoffmann, A. Utilization of delactosed whey permeate for the synthesis of ethyl acetate with *Kluyveromyces marxianus* / A. Hoffmann [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. 2023. Vol. 107. P. 1635–1648. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12419-1>
- Арсеньева, Т. П. Разработка пивоподобного напитка на основе пермеата молочной сыворотки / Т. П. Арсеньева, Е. В. Борздая, О. Н. Стрижнева // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2015. № 3. С. 136–141. <https://www.elibrary.ru/ukityx>
- Bevilacqua, A. Microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* into Alginate Beads: A Focus on Functional Properties of Released Cells / A. Bevilacqua [et al.] // Foods. 2020. Vol. 9(8). 1051. <https://doi.org/10.3390/foods9081051>
- Duan, F. Recent innovations in immobilization of β -galactosidases for industrial and therapeutic applications / F. Duan [et al.] // Biotechnology advances. 2022. Vol. 61. 108053. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108053>
- Osojnik Črnivec, I. G. Polysaccharide Hydrogels for the Protection of Dairy-Related Microorganisms in Adverse Environmental Conditions / I. G. Osojnik Črnivec [et al.] // Molecules. 2021. Vol. 26. 7484. <https://doi.org/10.3390/molecules26247484>
- Chen, C. C. Enhanced repeated-batch bioethanol fermentation of red seaweeds hydrolysates using microtube array membrane-encapsulated yeast / C. C. Chen [et al.] // Journal of Biobased Materials and Bioenergy. 2020. Vol. 14. № 1. P. 138–145. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2020.1932>