

Dr inż. Monika CIOCH-SKONECZNY

Inż. Agnieszka PITEK

Dr hab. inż. Paweł SATORA, prof. UR

Mgr inż. Aneta PATER

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej
Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

REHYDRATACJA DROŹDŹY PIWOWARSKICH®

Rehydration of brewer's yeast®

Słowa kluczowe: drożdże, browarnictwo, suszenie, rehydratacja.

Rehydratacja to proces, którego celem jest przywrócenie odwodnionemu materiałowi, poprzez jego kontakt z wodą, właściwości jakie miał przed poddaniem go suszeniu. Ponowne uwodnienie drożdży jest kluczowe, aby mogły one odzyskać aktywność metaboliczną i przeprowadzić fermentację. Aktywne suszone drożdże, które poddawane są uwodnieniu, otrzymuje się w procesie suszenia. W niniejszej pracy zostały omówione trzy metody – suszenie z zastosowaniem złoża fluidalnego, rozpyłowe oraz liofilizacja. Na uzyskanie mikroorganizmów charakteryzujących się wysokim poziomem aktywności po rehydratacji ma wpływ wiele innych, poprzedzających ponowne uwodnienie zabiegów, które umożliwiają otrzymanie drożdży o zwiększonej trwałości i przechowywanie ich bez utraty jakości w dłuższym okresie czasu.

Key words: yeasts, brewing industry, drying, rehydration.

Rehydration is a process aim of which is to restore the properties of a dehydrated material, through its contact with water, it had before it was subjected to drying. Rehydration of yeasts is crucial to regain metabolic activity and to guide the fermentation. Active dried yeasts, which are subjected to rehydration, are obtained in the drying process. In this study three methods were discussed – fluidized-bed drying, spray drying and freeze drying. Obtaining microorganisms characterized by a high level of activity after rehydration is influenced by many other treatments preceding the rehydration that allow obtaining yeasts with increased durability and storing them without losing quality over a longer period of time.

WPROWADZENIE

Drożdże to drobnoustroje o bogatej historii i obiecującej przyszłości w dziedzinie biotechnologii. Ich znaczenie w procesie fermentacji piwa, wina, alkoholi destylowanych, pieczywa, serów, wędlin i innych produktów, jest niezrównane w porównaniu z innymi organizmami. Gatunek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle piekarniczym, gorzelnicznym czy browarnictwie. Jest modelowym organizmem w badaniach współczesnej genetyki i biologii molekularnej. Cechuje się krótkim czasem generacji, łatwością i niewielkimi kosztami hodowli, co sprawia, że drożdże te wykorzystywane są w badaniach dotyczących podstawowych procesów biologicznych [28].

Pozyskiwanie stabilnych, cechujących się wysokim poziomem aktywności drożdży, jest znaczące zarówno ze względów przemysłowych, jak i ekonomicznych. Proces suszenia zdobywa więc coraz większe znaczenie. Istnieje wiele metod suszenia aktywnych składników, zapewniających wysoką stabilność produktu. Należy zaznaczyć jednak, że jest to proces złożony, a jego zastosowanie wiąże się z doбором optymalnych parametrów, warunków prowadzenia hodowli drożdży, rodzajem substancji ochronnej, sposobem przechowywania oraz rehydratacji.

Celem artykułu jest przybliżenie zagadnień związanych z suszeniem i rehydratacją drożdży. W opisie przedstawiono informacje dotyczące wybranych metod suszenia komórek i ich uwodnienia oraz wpływu suszonych drożdży na cechy sensoryczne piwa.

SUSZENIE DROŹDŹY

Proces suszenia materiałów biotechnologicznych obejmuje eliminację płynu, najczęściej wody, z surowych lub przetworzonych materiałów, prowadząc do obniżenia jej zawartości, co związane jest z zatrzymaniem lub spowolnieniem wzrostu i procesów życiowych mikroorganizmów oraz zahamowaniem wszelkich reakcji enzymatycznych. Działanie to powinno być prowadzone w taki sposób, aby żywotność komórek drobnoustrojów lub poziom aktywności produktów syntezy mikrobiologicznej były jak najbardziej zbliżone do wartości w produktach wyjściowych. To zadanie niezwykle trudne, ponieważ w trakcie procesu zachodzić może wiele niepożądanych zmian fizycznych, chemicznych i biotechnologicznych [6, 34].

W odpowiedzi na rosnące potrzeby konsumentów, suszenie odgrywa coraz większe znaczenie. Obecnie dostępnych jest wiele metod służących utrwalaniu aktywnych składników,

m.in. suszenie rozpyłowe i liofilizacja. Popularność tych procesów spowodowana jest przede wszystkim wieloma zaletami, takimi jak wysoka stabilność, mała objętość i waga produktów, zmniejszenie powierzchni magazynowej, kosztów transportu, a także utrzymanie higieny produkcji oraz ułatwienie jej automatyzacji i mechanizacji [19].

Ze względu na dużą różnorodność postaci drobnoustrojów, a także ich właściwości fizykochemiczne, kluczowy jest dobór odpowiedniej techniki suszenia. Do metod usuwania wody, które pozwalają na zachowanie wysokiej żywotności komórek mikroorganizmów zalicza się m.in. suszenie sublimacyjne i konwekcyjne z zastosowaniem materiałów inertnych oraz metodę rozpyłową i fluidyzacyjną.

Suszenie sublimacyjne (liofilizacja)

Liofilizacja jest jednym ze sposobów suszenia, wykorzystywanym w mikrobiologii, mającym na celu stabilizację i przechowywanie kultur. Proces ten polega na przejściu wody ze stanu stałego w gazowy z pominięciem fazy ciekłej, pod zmniejszonym ciśnieniem. Początkowy etap obejmuje zamrożenie materiału pod ciśnieniem atmosferycznym, a następnie próżniową sublimację lodu. Końcowa faza polega na dosuszeniu materiału do żądanej wilgotności [19].

Zastosowanie liofilizacji pozwala na osiągnięcie dużej przeżywalności drobnoustrojów, wskutek uniknięcia wysokich, destabilizujących temperatur. Mimo to, proces suszenia jest niezwykle stresujący dla komórek i w wyniku tej operacji może zachodzić wiele zmian, oddziałujących na zmniejszenie aktywności mikroorganizmów. Przyczyniać się do tego może zmiana struktury membran lipidowych, uszkodzenia mechaniczne wywołane przez kryształy lodu, utrata właściwości półprzepuszczalnych, czy też denaturacja substancji białkowych [5, 15, 37]. Dlatego, aby uzyskać drożdże charakteryzujące się wysoką aktywnością i żywotnością, często niezbędnym etapem jest użycie substancji chroniących te mikroorganizmy [27]. W zależności od mechanizmu protekcyjnego, jakim odznaczają się zastosowane związki, można podzielić je na dwie grupy: środki stabilizujące (trehaloza, mannitol, ksylozy) oraz substancje zmniejszające aktywność wody (gliceryna, maltitol i ksylitol) [3].

Mechanizm ochronny cukrów polega głównie na zastępowaniu wody związanej (usuwanej w czasie suszenia) w strukturach membran i biopolimerów oraz zapobieganiu uszkodzeniom mechanicznym podczas tworzenia kryształów lodu w procesie zamrażania.

Jednym z cukrów, charakteryzujących się unikalnymi właściwościami, decydującymi o jego roli ochronnej w czasie gdy komórka wystawiona jest na działanie czynników stresowych, jest trehaloza. Wykazuje ona zdolność do ochrony błon komórki przed przesuszeniem oraz eliminuje wodę z powierzchni białka, chroniąc je przed denaturacją w komórkach uwodnionych. Do jej szczególnych właściwości zalicza się wysoką hydrofilowość, stabilność chemiczną oraz brak tworzenia wewnętrznych wiązań wodorowych. Wykazuje cechy związku osmotycznie czynnego i ochrania integralność struktur komórkowych, zwłaszcza błon biologicznych. Disacharyd ten pełni rolę markera odpowiedzi metabolicznej komórek drożdży na stresy środowiskowe, a w konsekwencji umożliwia wyodrębnienie gatunków wykazujących najlepsze przystosowanie do trudnych warunków przemysłowych [7].

Drożdże *S. cerevisiae* różnią się zawartością trehalozy w zależności od modyfikacji warunków środowiskowych i zmian w cyklu życia. Jej poziom jest bardzo niski w komórkach drożdży rosnących wykładniczo, a zwiększa się, podczas gdy wchodzi w fazę stacjonarną lub poddane są stresowi. Akumulacja cukru następuje w okresach zmniejszonego wzrostu, między innymi w momencie pozbawienia mikroorganizmów azotu, fosforu lub siarki. Trehaloza pełni także kluczową rolę w procesie suszenia komórek drożdży. Chroni membrany i białka komórkowe w odpowiedzi na warunki stresu, takie jak szok cieplny czy osmotyczny, towarzyszące procesowi odwadniania [18, 20]. Ilość trehalozy zwiększa się zatem w mikroorganizmach poddanych suszeniu. Drożdże *lager* zawierają 10-15% tego disacharydu, drożdże *ale* 15-20%, natomiast piekarnicze 16-20%.

Zachowanie struktury i funkcji wyizolowanych białek podczas suszenia umożliwia również sacharoza. Zdolność stabilizacji protein tłumaczy się tworzeniem z nimi wiązań wodorowych, gdy następuje usunięcie wody, a tym samym zapobieganie ich denaturacji. Trehaloza i sacharoza mogą być więc wykorzystywane do utrzymania komórek drożdży w stanie nienaruszonym podczas liofilizacji [15].

Również maltodekstryny pełnią funkcję ochronną, ich dodatek do zawiesiny odwadnianych komórek, pozwala na przebieg tego procesu w niższych temperaturach, a także zwiększenie ich żywotności [31].

Warto zaznaczyć, że środki protekcyjne nie tylko przyczyniają się do zwiększenia przeżywalności mikroorganizmów podczas procesu suszenia, ale również zapobiegają niekorzystnym zmianom w trakcie ich przechowywania, kiedy komórki drożdży narażone są na uszkodzenia ściany błony komórkowej lub deformacje, spowodowane utlenianiem lipidów błonowych. Dodatkowo, niższe temperatury umożliwiają utrzymanie szybkości reakcji chemicznych i biochemicznych na niewysokim poziomie oraz wzrost stabilności podczas składowania. Stąd lepsza przeżywalność liofilizowanych kultur w niższych wartościach temperatury spowodowana jest zmniejszeniem szybkości utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych. Zaleca się więc składowanie liofilizowanych drożdży w zakresie temperatur 0-5°C w próżni lub z kontrolowaną aktywnością wody w ciemności [21].

Produkty poddane suszeniu sublimacyjnemu są powszechnie stosowane w procesie fermentacji. Przykładem są drożdże wykorzystywane jako kultury starterowe, ponieważ technika liofilizacji może kontrolować istotne parametry jakościowe, w tym zawartość wilgoci, aktywność wody i żywotność komórek [17].

Warto jednak zaznaczyć, iż różne szczepy z tego samego gatunku mogą zachowywać się zupełnie inaczej podczas przebiegu liofilizacji. Wymagane jest więc zoptymalizowanie warunków dla poszczególnych mikroorganizmów, aby została osiągnięta maksymalna żywotność i trwałość. Tolerancja może być zwiększona przez zastosowanie różnych związków chroniących komórki drożdży [19].

Suszenie sublimacyjne znajduje szerokie zastosowanie w biotechnologii, jednak ma także wady, wśród których wymienia się wysokie koszty związane ze sprzętem, energią, czy samym jego przebiegiem. Ponadto, jest to czasochłonna technika suszenia, mogąca trwać nawet kilka dni [3].

Suszenie rozpyłowe

Proces ten obejmuje: rozpylanie surowca, stycność rozpylonego surowca z czynnikiem suszącym, odparowanie rozpuszczalnika (wody) oraz rozdzielanie produktu od powietrza. W dalszym etapie surowiec poddawany procesowi suszenia pompowany jest do dyszy, po czym następuje jego rozpylenie w komorze, w której odbywa się przepływ gorącego gazu suszącego. Przemieszczanie się gorącego powietrza wewnątrz komory powoduje odparowanie wody z rozpylonych cząstek i przekształcenie wodnego roztworu do suchego produktu [2].

Suszenie rozpyłowe jest korzystne pod względem wytwarzania sypkiego materiału o kontrolowanym zakresie wielkości cząstek w szybkim tempie suszenia [8]. Wadą tej techniki utrwalania materiału biologicznego są znaczne straty substancji lotnych i degradacja termiczna materiałów wrażliwych na ciepło z powodu działania wysokich temperatur [2].

Proces rozpylania przeprowadzany jest z zastosowaniem dysków obrotowych, dysz ciśnieniowych, pneumatycznych oraz ultradźwiękowych. Istotnym parametrem w procesie suszenia jest temperatura, która wpływa na szybkość odparowywania wody, co oddziałuje na finalne cechy produktu. Do innych parametrów podlegających monitorowaniu zalicza się szybkość i natężenie przepływu czynnika odwadniającego. Wśród gazów używanych w suszeniu rozpyłowym wymienia się powietrze, azot lub dwutlenek węgla.

Suszenie z zastosowaniem złoża fluidalnego

Proces suszenia z wykorzystaniem złoża fluidalnego ma wiele zalet. Zalicza się do nich m.in. wysokie ciepło i transfer masy między gazem i cząstkami ze względu na dobry kontakt i dużą powierzchnię międzyfazową styku pomiędzy nimi, intensywne mieszanie substancji stałych, niemal równomierny rozkład wilgotności w całym złożu, a także możliwość kontrolowania w nim temperatury. Do wad tego procesu zaliczyć można natomiast znaczny spadek ciśnienia, erozyjne działanie na powierzchnie ciał zanurzonych w złożu, a także duże zużycie energii do napędu pomp lub wentylatorów [29].

Proces ten składa się z dwóch etapów. Pierwszy polega na przepływie gorącego gazu przez złożę z surowcem poddanym suszeniu, co powoduje rozluźnienie materiału i przemieszczanie cząstek otoczonych przez gaz w obrębie złoża, jego upłynnienie, a w konsekwencji odparowanie wody. W kolejnym natomiast, w komorze chłodzenia przez wentylator przepływa powietrze atmosferyczne, powodując dalsze upłynnienie złoża materiału i jego przemieszczenie w kierunku wylotu, jednocześnie zapewniając mu chłodzenie i odparowanie pozostałej wody. Zastosowanie suszenia fluidalnego do materiałów ziarnistych jest obecnie dobrze znane i szeroko stosowane w przemyśle [34].

Drożdże *S. cerevisiae* są produktem ziarnistym, a proces suszenia zmniejsza w nich zawartość wilgoci z 65-70% do 4-6%. Luna-Solano i in. [16] badali suszenie drożdży piwowarskich metodą fluidalną i rozpyłową. Jako nośniki wykorzystano karboksymetylocelulozę, skrobię kukurydzianą i maltodekstrynę. Dodatek nośników przed suszeniem zmniejszał termiczną inaktywację drożdży. W przypadku metody fluidyzacyjnej stwierdzono, że im niższa temperatura i krótszy czas, tym stopień przeżycia komórek był większy. Zaobserwowano większą aktywność komórek po procesie w odniesieniu do drożdży suszonych rozpyłowo [37].

WPŁYW SUSZONYCH DROŻDŻY NA CECHY SENSORYCZNE PIWA

Aktywne suszone drożdże (ADY) znajdują szerokie zastosowanie w procesach przemysłowych. Wykorzystywane są w szczególności w winiarstwie, gorzelnictwie, piekarnictwie oraz piwowarstwie rzemieślniczym. Do niewątpliwych korzyści stosowania aktywnych suszonych drożdży zalicza się możliwość ich długiego przechowywania oraz wygodę użycia [11]. Wykorzystanie ADY w browarnictwie zyskuje coraz większą popularność. Zastosowanie mikroorganizmów w takiej postaci ma wiele zalet dotyczących zarówno aspektów przemysłowych, jak i ekonomicznych. Pozytywny wpływ drożdży suszonych na przebieg procesu fermentacji, a w efekcie uzyskanie finalnego produktu o pożądanym właściwościach, jest celem przemysłu browarniczego. Proces suszenia w przemyśle piwowarskim został początkowo zastosowany do drożdży *ale*. W ostatnich latach poddawane są suszeniu również drożdże *lager*. Głównymi dostawcami drożdży suszonych są Fermentis i Lallemand [3].

Użycie aktywnych suszonych drożdży zapewnia szybszy proces fermentacji, zwiększenie poziomu związków aromatu i smaku oraz stężenia etanolu. Obniża ponadto ilość metabolitów wtórnych, takich jak pirogronian, acetaldehyd czy ketoglutaran, a także hamuje rozwój drobnoustrojów dzikich. Drożdże te wykorzystywane są zarówno do fermentacji pierwotnej, jak i wtórnej (kondycjonowanie w butelce). Charakteryzuje je stabilność genetyczna w temperaturze pokojowej oraz możliwość ich przechowywania przez dłuższy czas (do dwóch lat w 4-8°C). Ważną cechą tych drobnoustrojów jest stabilność podczas transportu, dystrybucji i magazynowania [9, 11, 25].

Oprócz wykorzystania ADY do bezpośredniego zaszczenia brzezki, mogą one również znaleźć zastosowanie jako kultura startowa do propagacji, prowadząc do skrócenia czasu tego procesu [11, 24]. Należy jednak wspomnieć, że wykorzystanie aktywnych suszonych drożdży w przemyśle piwowarskim jest znacznie mniej rozpowszechnione niż w innych gałęziach gospodarki. Piwowarstwo rzemieślnicze jest bardziej otwarte na proponowaną technologię, co wynika często z braku aparatury do namnażania własnych drożdży. Zazwyczaj browary produkujące na większą skalę wyposażone są w stacje propagacji, w efekcie czego nie uznają konieczności zmiany istniejących praktyk. Niewątpliwą zaletą aktywnych suszonych drożdży jest to, że poddane procesowi rehydratacji są gotowe do wprowadzenia do brzezki w ciągu około godziny. Niestety, konwencjonalne metody namnażania komórek zajmują kilka dni, a nawet tygodni.

Produkcja ADY wymaga w pierwszej kolejności wytworzenia znacznej ilości biomasy drożdży (propagacja). Następnie ma miejsce etap zmniejszenia ilości wody (zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej), zakończony suszeniem w złożu fluidalnym [1]. Podczas procesu suszenia drożdże narażone są na stres, związany z odwodnieniem i późniejszą rehydratacją [11, 12]. Pierwszym etapem suszenia jest usunięcie pożywki, w której namnażały się komórki, poprzez wirowanie i przemywanie biomasy. Uzyskuje się wówczas koncentrat drożdży o zawartości około 20% suchej masy. Wstępny etap usuwania wody oparty jest na filtracji próżniowej (30-32% suchej masy), następnie wykorzystuje się suszenie ze złożem fluidalnym. Zastosowanie tej metody pozwala na równomierne

suszenie agregatów komórkowych, poprzez duży poziom kontaktu między powietrzem i drożdżami, a także utrzymanie produktu w pożądanej temperaturze (35-37°C). Suszenie kontynuuje się do momentu, aż sucha masa drożdży wyniesie 93-95% [1].

Proces suszenia może przyczyniać się do zmniejszenia żywotności drobnoustrojów, co związane jest bezpośrednio z wydajnością fermentacji. Dlatego tak ważne jest, aby żywotność komórek wprowadzanych do brzezki była jak największa [11]. Niska, może przyczyniać się do powstawania zmętnień, mniej stabilnej struktury piany czy nieprawidłowej flokulacji, odgrywającej kluczową rolę w sedymentacji na dnie zbiornika fermentacyjnego [38].

Stopień żywotności aktywnych suszonych drożdży zależy od procesu ich ponownego uwodnienia, podczas którego komórki tych mikroorganizmów mogą odzyskać aktywność jaką miały przed poddaniem ich suszeniu. Bezpośrednie wprowadzanie aktywnych suszonych drożdży do brzezki wpływa na niewłaściwy przebieg procesu fermentacji [11].

Stwierdzono, że zastosowanie drożdży suszonych powoduje szybszą fermentację oraz obniża końcowe pH piwa. Ponadto, produkt finalny charakteryzuje się niższym stężeniem estrów kwasu octowego, jednak wartość ta nie jest na tyle duża, aby wpłynąć na smak produktu w ocenie degustatorów. Odnotowano, że zarówno drożdże suszone, jak i świeże, flokulują w tym samym czasie. Nie zaobserwowano także znaczących różnic w wydajności biomasy i etanolu [9].

REHYDRATACJA

Celem rehydracji jest przywrócenie materiałowi poddanemu suszeniu, poprzez jego kontakt z wodą, właściwości jakie miał przed tym zbiegiem. W trakcie procesu tkanki wysuszonego materiału chłoną wodę, co skutkuje zwiększeniem jego masy i objętości oraz wypłukiwaniem substancji, m.in. cukrów, kwasów, minerałów i witamin, z rehydratowanego surowca. Ubytek rozpuszczalnych składników suchej substancji podczas ponownego uwodnienia uzależniony jest przede wszystkim od składu chemicznego i struktury materiału [26].

Proces ponownego uwodnienia drożdży jest kluczowy, aby mogły one odzyskać aktywność metaboliczną i przeprowadzić fermentację. Przeżywalność komórek podczas suszenia uzależniona jest od stanu w jakim były przed rozpoczęciem procesu. Istotny jest dobór odpowiednich parametrów rehydracji, które w dużym stopniu uzależnione są od rodzaju użytego szczepu.

Aktywne suszone drożdże zawierają około 8% wody. Jest to ilość niewystarczająca, aby komórki mogły odzyskać aktywność metaboliczną. Rehydracja jest więc koniecznym procesem przed wprowadzeniem ich do brzezki [30]. Istnieje wiele czynników, które wywierają wpływ na żywotność drożdży podczas tego procesu. To m.in. wewnątrzkomórkowe stężenie trehalozy, długość i temperatura uwadniania, pH pożywki, obecność składników pokarmowych, mineralnych oraz dostępność ergosterolu. Wymienione czynniki mają wpływ na strukturę membrany przez modyfikację przepuszczalności, powodując zmiany w przepływie cząsteczek i jonów, które determinują stopień żywotności nawodnionych komórek drożdży [35]. Temperatura rehydracji aktywnych suszonych drożdży mieści się w zakresie 35-40°C, który

zapewnia elastyczność plazmolemy [35]. Zbyt niska uniemożliwia komórce odzyskanie stanu, jaki miała przed poddaniem zabiegowi suszenia. Tolerancja termiczna drożdży jest warunkowana ich rodzajem- *lager* charakteryzują się optimum temperaturowym niższym niż *ale*. Ponadto, zależy ona również od obecności protektantów czy białek szoku cieplnego. Ustalenie odpowiedniej temperatury rehydracji jest kluczowe dla uniknięcia uszkodzeń struktury w czasie przejść fazowych w obrębie błony komórkowej. Dlatego tak istotne jest, aby jej wartość była dostosowana do optimum temperaturowego każdego szczepu, w przeciwnym wypadku może niekorzystnie wpływać na żywotność komórek, obniżając wydajność fermentacji [35].

Medium użyte do rehydracji

Podczas procesu rehydracji następuje wyciek substancji z wnętrza komórek drożdży. Często powoduje to rozległe uszkodzenia, prowadząc nawet do ich śmierci. Przepuszczalność suszonych drożdży gwałtownie wzrasta podczas uwodnienia. Utratę składników komórkowych ocenia się na ok. 30% suchej masy, co tłumaczy się obecnością pęcherzyków, kropli i klastrów o różnych kształtach i wymiarach na powierzchni nawodnionych komórek. Odpowiedni skład medium do rehydracji, determinuje ilość wyciekających substancji wewnątrzkomórkowych.

Aby komórki zostały uwodnione w bezpiecznych warunkach wymagane jest by woda, w której przeprowadza się proces rehydracji miała około 25 ppm zawartości minerałów. Gdy ich stężenie wewnątrz komórki drożdży jest wyższe niż w otaczającym środowisku, zgodnie z prawem osmozy, woda będzie napływać do jej środka, powodując rozerwanie. Z tego powodu, woda destylowana nie jest dobrym medium nawadniającym aktywne suszone drożdże.

Jony wapnia i glukoza mogą przeciwdziałać nadmiernemu wypływowi substancji wewnątrzkomórkowych z rehydratowanych komórek. Pierwsze zwiększają sztywność konstrukcji membranowej, oddziałując na naprawę uszkodzonych błon cytoplazmatycznych. Glukoza natomiast przenikając do wnętrza komórki, stymuluje tworzenie się żeli białkowych, których obecność zapobiega dyfuzji substancji wewnątrzkomórkowych [26].

Stresy związane z dehydracją i rehydracją komórek

Woda jest niezbędnym składnikiem do życia, jednak wiele organizmów może przetrwać w warunkach całkowitego odwodnienia (anhydrobioza), co związane jest z ich przejściem w stan uśpienia metabolicznego. Chociaż suszenie drożdży jest powszechnie stosowaną techniką, oprócz niewątpliwych zalet, ma także wady. Do najważniejszych zalicza się utratę żywotności komórek. Dokładne przyczyny tego zjawiska nie są znane, jednak prawdopodobnie wiążą się z ogromnym stresem, napotkanym podczas produkcji ADY. W procesie odwadniania, utrata wody jest oczywistym i znaczącym stresem dla drożdży, a niektóre badania określają ją jako kluczowy czynnik, odpowiedzialny za zmniejszenie ich żywotności [1]. Istnieje również wiele niekorzystnych czynników, takich jak stres oksydacyjny i osmotyczny [22].

Komórki drożdży narażone są na stres osmotyczny już przed procesem suszenia, a mianowicie podczas propagacji,

co związane jest z dużym stężeniem cukrów obecnych w pożywce wzrostowej [22]. Wypływ i napływ wody z komórki podczas odwadniania i rehydratacji, może powodować jej uszkodzenia i niszczyć samą strukturę błony komórkowej [13]. Uważa się, że obkurczanie komórek może powodować ich rozerwanie w czasie stresu osmotycznego. Ponadto, prowadzi również do niepożądanych interakcji molekularnych w komórce [36]. Warto jednak wspomnieć, że istnieją mechanizmy u drożdży, które podnoszą ich odporność na stres osmotyczny. Błona komórkowa zawiera białka błonowe (akwaporyny), które w pewnych okolicznościach mogą ułatwiać napędzany osmotycznie wypływ wody [32], zmniejszając uszkodzenie membrany. Pod wpływem szoku osmotycznego indukowany jest szlak kinaz MAP-HOG [4]. Ma to na celu akumulację glicerolu w komórce, co skutkuje wyrównaniem osmolarności wewnątrz i na jej zewnątrz. Chroni to komórkę przed potencjalnymi uszkodzeniami związanymi ze zwiększonym ciśnieniem osmotycznym [11].

Chociaż stres osmotyczny ma znaczący wpływ podczas odwodnienia i nawodnienia komórek, nie jest to jedyny stres, na który narażone są drożdże. Stres oksydacyjny, ze względu na produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe czy anionorodnik ponadtlenkowy, może znacznie bardziej obciążać drożdże. Czynniki te prowadzą do uszkodzeń DNA, lipidów i białek [10, 14]. ROS są nie tylko wytwarzane w trakcie produkcji ADY, ale również generowane przez mitochondria podczas metabolizmu tlenowego [33]. Podobnie, jak w przypadku stresu osmotycznego, komórka drożdży może minimalizować obrażenia wywołane przez stres oksydacyjny. Ważnym czynnikiem ochronnym jest glutation. W postaci zredukowanej (GSH), dzięki wolnej grupie tiolowej, służy do redukcji nadtlenu wodoru oraz wychwytuje reaktywne czynniki elektrofilowe, w efekcie chroniąc komórkę przed uszkodzeniem ze strony toksyn. Podczas stresu oksydacyjnego, wytwarzane są znaczne ilości utlenionego glutationu (GSSG), które przenoszone są do wakuoli. Ponadto, glutation chroni białka przed utlenieniem dzięki glutationylacji [23].

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie aktywnych suszonych drożdży w browarnictwie zyskuje coraz większą popularność. Proces ponownego uwodnienia komórek jest kluczowy, aby mogły one odzyskać aktywność metaboliczną i przeprowadzić fermentację. Bardzo istotny jest dobór odpowiednich parametrów rehydratacji, które w dużym stopniu uzależnione są od rodzaju użytego szczepu. Aktywne suszone drożdże poddawane uwodnieniu, otrzymuje się w procesie suszenia. W artykule omówiono trzy metody suszenia – liofilizację, suszenie rozpyłowe oraz z zastosowaniem złoża fluidalnego. Dobór odpowiednich parametrów procesu oddziałuje na stan drożdży. Nie bez znaczenia jest również użycie związków protekcyjnych, które odgrywają istotną rolę w czasie suszenia, przechowywania aktywnych suszonych drożdży do czasu poddania ich ponownemu uwodnieniu.

LITERATURA

- [1] **BAYROCK D., W.M. INGLEDEW. 1997.** „Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying”. *Food Research International* 30: 407-415.
- [2] **BHANDARI B.R., K.C. PATEL, X.D. CHEN. 2008.** „Spray drying of food materials-process and product characteristics”. *Drying Technologies in Food Processing* 4: 113-157.
- [3] **BOLAT I.C., M. TURTOL, M.C. WALSH. 2009.** „Influence of yeast drying process on different lager brewing strains viability”. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 15: 370-377.
- [4] **BREWSTER J.L., T. DEVALOIR, N.D. DWYER, E. WINTER, M.C. GUSTIN. 1993.** „An osmosensing signal transduction pathway in yeast”. *Science* 259: 1760-1763.
- [5] **DINIZ-MENDES L., E. BEMARDES, P.S. DE ARAUJO, A.D. PANEK, V.M.F. PASCHOALIN. 1999.** „Preservation of frozen yeast cells by trehalose”. *Biotechnology and Bioengineering* 65: 572-578.
- [6] **DOMÍNGUEZ J.M. 2016.** „Drying”. *Reference Module in Life Sciences Comprehensive Biotechnology* 2: 727-735.
- [7] **DROŹDŻYŃSKA A., D. SZYMANOWSKA, K. CZACZYK. 2009.** „Optymalizacja procesu ekstrakcji trehalozy z komórek drożdży i określenie parametrów jej oznaczania techniką HPLC”. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 5: 30-42.
- [8] **FANG Z., B. BHANDARI. 2012.** „Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice”. *Food Research International* 48: 478-483.
- [9] **FELS S., B. RECKELBUS, Y. GOSSELIN. 1999.** „Dried yeasts- A truly multifunctional product”. *Cerevisiae* 24: 17-20.
- [10] **HERDEIRO R.S., D.M. PEREIRA, A.D. PANEK, E.C. ELEUTHERIO. 2006.** „Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 340-346.
- [11] **JENKINS D.M., C.D. POWELL, T. FISCHBORN, K.A. SMART. 2011.** „Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and its Effect on Cell Viability”. *Journal of the Institute of Brewing* 117: 377-382.
- [12] **JORGENSEN H., L. OLSSON, B. RONNOW, E.A. PALMQVIST. 2002.** „Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 310-317.
- [13] **LAROCHE C., P. GERVAIS. 2003.** „Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 743-747.

- [14] LEROY C., C. MANN, M.C. MARSOLIER. 2001. „Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions”. *The European Molecular Biology Organization Journal* 20: 2896-2906.
- [15] LESLIE S.B., E. ISRAELI, B. LIGHTHART, J.H. CROWE, L.M. CROWE. 1995. „Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying”. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3592-3597.
- [16] LUNA-SOLANO G., M.A. SALGADO-CERVANTES, G.C. RODRÍGUEZ-JIMINES, M.A. GARCÍA-ALVARADO. 2005. „Optimization of brewer's yeast spray drying process”. *Journal of Food Engineering* 68: 9-18.
- [17] MAHIDSANAN T., P. GASALUCK, G. EUMKEB. 2017. „A novel soybean flour as a cryoprotectant in freeze-dried *Bacillus subtilis* SB-MYP-1”. *LWT - Food Science and Technology* 77: 152-159.
- [18] MANAGBANAG J.R., A.P. TORZILLI. 2002. „An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*”. *Mycologia* 94: 384-391.
- [19] MORGAN C., G. VESEY. 2009. „Freeze-drying of microorganisms”. *Encyclopedia of microbiology* (Third Edition; pp. 162–173). Oxford, UK: Academic Press. Neves i Francois 1992.
- [20] MURRAY B.S., H-J. LIANG. 1999. „Enhancement of the Foaming properties of Protein Dried in the Presence of Trehalose”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4984-4991.
- [21] N'GUESSAN F.K., H.W. COULIBALY, M.W.A. AL-LOUE-BORAUD, K.M. DJÉ. 2016. „Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo”. *Food Science and Nutrition* 4: 34-41.
- [22] PEREZ-TORRADO R., J.M. BRUNO-BARCENA, E. MATA LLANA. 2005. „Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making”. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6831-6837.
- [23] PIECUCH A., E. OBLĄK. 2013. „Mechanizmy oporności drożdży na stress środowiskowy”. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67: 238-254.
- [24] POWELL C.D., T. FISCHBORN. 2010. „Serial repitching of active dried lager yeast”. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 68: 48-56.
- [25] RODRÍGUEZ-PORRATA B., D. CARMONA-GUTIERREZ, G. LÓPEZ-MATÍNEZ, A. REISENBICHLER, M. BAUER, F. MADEO, R. CORDERO-OTERO. 2012. „Yeast cell death during the drying and rehydration process”. *Flow Cytometry – Recent Perspectives*: 119-132.
- [26] RODRÍGUEZ-PORRATA B., M. NOVO, J. GUILLAMÓN, N. ROZÈS, A. MAS, R. CORDERO-OTERO. 2008. „Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast”. *International Journal of Food Microbiology* 126: 116-122.
- [27] SAMBORSKA K., A. DRZAZGA. 2012. „Wpływ warunków przechowywania na aktywność sacharolityczną drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie”. *Acta Scientiarum Polonorum. Biotechnologia* 11: 2.
- [28] SCHNEITER R. 2004. „Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast”. *Yeast Genetics* 12.
- [29] SMITH P.G. 2007. *Applications of Fluidization to Food Processing*. University of Lincoln UK Wiley Online Library.
- [30] SOUBEYRAND V., A. JULIEN, J-M. SABLAYROLLES. 2006. „Rehydration protocols for active dry wine yeast and the search for early indicators of yeast activity”. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 474-480.
- [31] SZE-YIN S., C. LAI-HOONG. 2014. „Effects of maltodextrin and trehalose on the physical properties of Chinese steamed bread made from frozen doughs”. *International Food Research Journal* 20: 1529-1535.
- [32] TANGHE A., P. VAN DUCK, F. DUMORTIER, A. TEUNISSEN, S. HOHMANN, J.A. THEVELEIN. 2002. „Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains”. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5981-5989.
- [33] TRANCIKOVA A., P. WEISOVA, I. ZEMAN, J. KOLAROV. 2004. „Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-X-L”. *FEMS Yeast Research* 5: 149-156.
- [34] TÜRKER M., A. KANARYA, U. YÜZGEC, H. KAPUCU, Z. SENALP. 2006. „Drying of baker's yeast in batch fluidized bed”. *Chemical Engineering and Processing* 45: 1019-1028.
- [35] VAUDANO E., A. COSTANTINI, M. CERSOSIMO, V. DEL PRETE, E. GARCIA-MORUNO. 2009. „Application of real-time RT-PCR to study gene expression in active dry yeast (ADY) during the rehydration phase”. *International Journal of Food Microbiology* 129: 30-36.
- [36] VINDELOV J., N. ARNEBORG. 2002. „*Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses”. *Yeast* 19: 429-439.
- [37] WITROWA-RAJCHERT D., K. SAMBORSKA. 2002. „Metody suszenia mikroorganizmów i produktów syntezy mikrobiologicznej”. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2: 5-15.
- [38] ZHAO X.Q., F.W. BAI. 2009. „Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production”. *Biotechnology Advances* 27: 849-856.