

Liofilización de levaduras no-*Saccharomyces* pectinolíticas para la producción de starters enológicos

María Eugenia Sevillano^{1,2}, Vilma Inés Morata^{3,4}, María Carolina Martín^{3,4*}

1. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO), Chacras de Coria M5528AHB, Mendoza, Argentina.
2. Grupo de Bioquímica Vegetal, Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) / Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO); Chacras de Coria M5528AHB, Mendoza, Argentina.
3. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (FCAI), Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO); San Rafael M5600APG, Mendoza, Argentina.
4. Grupo de Biotecnología Enológica, Instituto de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (ICAI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) / Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO); San Rafael M5600APG, Mendoza, Argentina.

*E-mail: mcmartin@fcai.uncu.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Liofilización
Aureobasidium pullulans
Actividad pectinolítica
Levaduras secas activas

RESUMEN

Se evaluó un protocolo de liofilización para la conservación y producción de un starter de *Aureobasidium pullulans* m11-2, una cepa autóctona de la región vitivinícola Oasis Sur de Mendoza (Argentina), con capacidades de producir enzimas pectinolíticas de interés enológico. La cepa fue cultivada en condiciones controladas, cosechada en fase exponencial y sometida a liofilización en presencia de distintas soluciones lioprotectoras. Su viabilidad y funcionalidad enzimática fueron determinadas durante 18 meses. Glutamato de sodio (2,4%) fue el lioprotector más eficaz, al permitir conservar tanto la viabilidad celular como la actividad pectinolítica tras períodos prolongados de almacenamiento a 4 °C. La actividad enzimática fue evaluada de forma cualitativa mediante la formación de halos de clarificación en placas, que se mantuvieron proporcionales al tamaño de las colonias. Dado que preservar la funcionalidad de levaduras no-*Saccharomyces* representa un desafío biotecnológico relevante, este trabajo presenta un protocolo estandarizado para la obtención de levaduras secas activas (starters) con actividad enzimática, aportando una alternativa útil para su uso industrial en procesos de vinificación.

Freeze-drying of pectinolytic non-*Saccharomyces* yeasts for enological starter production

KEYWORDS

Freeze-drying,
Aureobasidium pullulan
Pectinolytic enzymes
Active dry yeasts.

ABSTRACT

A freeze-drying protocol was evaluated for the preservation and production of a starter culture of *Aureobasidium pullulans* m11-2, an indigenous strain from the Oasis Sur wine region of Mendoza, Argentina, with the capacity to produce pectinolytic enzymes of enological interest. The strain was cultivated under controlled conditions, harvested at the exponential growth phase, and subjected to freeze-drying in the presence of different lyoprotectant solutions. Its viability and enzymatic functionality were assessed over 18 months. Sodium glutamate (2.4%) was the most effective lyoprotectant, allowing the preservation of both cell viability and pectinolytic activity during prolonged storage at 4 °C. Enzymatic activity was qualitatively evaluated by halo formation on agar plates, which remained proportional to colony size. Since preserving the functionality of non-*Saccharomyces* yeasts represents a relevant biotechnological challenge, this work presents a standardized protocol for obtaining active dry yeasts (starters) with enzymatic activity, providing a useful alternative for their industrial application in winemaking processes.

1. Introducción

La vinificación es un proceso microbiológico dinámico que involucra una amplia diversidad de géneros, especies y cepas de levaduras. Si bien la especie que se encarga de llevar a cabo la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, estudios previos demuestran que existen otras levaduras en las primeras etapas de la vinificación (Barata et al., 2012). En los últimos años, ha crecido el interés en la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* durante el proceso de vinificación para contribuir a mejorar la calidad del vino obtenido, debido a sus grandes potencialidades (Martín et al., 2024).

Dentro de este grupo de microorganismos se encuentra *Aureobasidium pullulans*, una de las especies más abundante en la superficie de la uva, en el mosto fresco y en etapas muy tempranas de fermentación (Merín et al., 2015; Pinto et al., 2015; Sternes et al., 2017). *A. pullulans* es un hongo euascomycete dimórfico, el cual presenta innumerables aplicaciones a nivel industrial. En vinificación tiene gran importancia por su capacidad de producir enzimas tales como pectinasas, celulasas, proteasas, lipasas, xilanases, lacasas, amilasas, entre otras (Oskay, 2022). Particularmente, las pectinasas cumplen un rol fundamental en la degradación de la pectina presente en la pared celular de la uva, facilitando la extracción del jugo, optimizando el prensado, mejorando la clarificación y filtración del vino, y promoviendo la liberación de compuestos de color y sabor que se encuentran atrapados en la piel de la uva (Claus & Mojsov, 2018; Longhi et al., 2022; Río Segade et al., 2015).

En este contexto, diversas investigaciones han explorado el uso de cultivos iniciadores (starters) mixtos, que combinan cepas no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae*, con el fin de generar enzimas in situ y lograr vinos de mayor calidad (Binati et al., 2019; Buzzini Pietro et al., 2017; Y. Chen et al., 2022; Pietrafesa et al., 2020). Para ello, es necesario que los cultivos iniciadores se mantengan viables y en cantidad suficiente para que, al ser inoculados en los mostos, desempeñen adecuadamente sus funciones.

Una de las estrategias más utilizadas para conservar cepas microbianas y mantener sus actividades biológicas a largo plazo es la liofilización. Este proceso permite prolongar la vida útil de los microorganismos, posibilitando el almacenamiento de grandes volúmenes en forma de polvo durante más de un periodo de vendimia, sin pérdida de propiedades fermentativas y/u organolépticas, con

beneficios financieros y protección frente a la contaminación (Nikolaou et al., 2020). En vinificación, se aplica para la obtención de cultivos iniciadores mixtos de levaduras secas biológicamente activas (LSA) que deben conservar sus propiedades tecnológicas tras la preservación.

La liofilización consiste en la sublimación del hielo intracelular bajo vacío, luego de una congelación previa, lo que detiene el metabolismo microbiano y permite preservar los cultivos durante períodos que pueden extenderse entre 5 y 20 años, dependiendo de la cepa (Burguet-Lago et al., 2014; Merivaara et al., 2021). Sin embargo, la deshidratación puede inducir daños estructurales en la membrana celular, desnaturalización de proteínas y ADN, y reducción significativa en la viabilidad celular al momento de su rehidratación (Dimitrellou et al., 2016; Wang et al., 2020; Wang et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021).

Para minimizar estos efectos, se emplean estrategias como el control de parámetros térmicos y cinéticos, y el uso de lioprotectores, como azúcares y aminoácidos (Polo et al., 2017; Yang et al., 2019). Estos compuestos reducen el daño celular tanto durante la liofilización como en la fase de rehidratación, ayudando a conservar la actividad fisiológica de las células y su estabilidad a largo plazo (Shu et al., 2017; H. Wang et al., 2020). No obstante, aún no existe un lioprotector universalmente eficaz para todas las cepas, ya que su efectividad depende del tipo de microorganismo, por lo que resulta imprescindible evaluar la supervivencia celular en cada caso específico (Ávila et al., 2015; Burguet-Lago et al., 2014). Entre los compuestos que han demostrado propiedades protectoras se encuentran ciertos azúcares y polioles empleados en concentraciones del 1 al 10% (Han et al., 2018). Asimismo, extractos complejos como la leche, el extracto de levadura o el mosto de uva han sido propuestos como alternativas viables por su composición rica en proteínas, péptidos y otros nutrientes celulares (Ávila et al., 2015).

En este sentido, y considerando la importancia de conservar cultivos iniciadores viables y funcionales para su aplicación en vinificación, resulta fundamental estudiar el efecto de distintos agentes protectores durante la liofilización y su impacto sobre la viabilidad celular y la funcionalidad metabólica posterior. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diversos lioprotectores sobre cultivos puros de *A. pullulans* m11-2, con el fin de obtener levaduras secas activas mediante liofilización, y estudiar su estabilidad durante el almacenamiento a 4°C, corroborando

además la conservación de su actividad enzimática post-liofilización.

2. Materiales y métodos

Microorganismos y medios de cultivo

El microorganismo utilizado fue una levadura del género no-*Saccharomyces*, *Aureobasidium pullulans* m11-2, previamente aislada y seleccionada por nuestro grupo de trabajo, a partir de superficie de uvas Malbec provenientes de la región vitivinícola San Rafael, Mendoza, Argentina (Longhi et al., 2022). La cepa forma parte de la Colección de Cultivos “Biodiversidad San Rafael” de SCCM-AAM (Asociación Argentina de Microbiología). Para su cultivo se empleó caldo YPD (g/L: extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20; pH 4,5) y YPD agarizado cuando se requirió en medio sólido (g/L: agar, 20). Las incubaciones se realizaron en un baño termostático con agitación (Semedix, SHZ-88) a 28°C por 48-72 h a 100 rpm.

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de la cepa en estudio se realizó a partir de cultivos desarrollados en medio YPD agarizado a 28°C después de 3 a 7 días de incubación. Para el análisis macroscópico, se evaluaron características de las colonias tales como forma, tamaño, borde, textura, color y presencia de pigmentos. La observación microscópica se llevó a cabo mediante la preparación de montajes simples: se tomó una porción de colonia con ansa estéril y se distribuyó sobre un portaobjeto con una gota de agua estéril, cubriéndose con cubreobjeto. Las preparaciones se observaron en microscopio óptico, utilizando aumentos de 40x y 100x, con el fin de examinar la morfología celular y la formación de estructuras reproductivas, tanto en su fase levaduriforme como micelial.

Soluciones lioprotectoras

Se prepararon soluciones acuosas de distintos lioprotectores utilizando agua destilada estéril: glutamato de sodio al 2,4%, extracto de levadura al 4%, fructosa al 10%, glucosa al 10%, leche descremada al 10% y mosto de uva variedad Bonarda (corregido a 18° Brix y pH 5,0). Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración mediante membranas Millipore de 0,22 µm de poro, a excepción de la leche, que se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Los tubos Falcon se sellaron con microfilm para asegurar una esterilidad prolongada durante el almacenamiento.

Liofilización

La cepa en estudio se cultivó en 20 mL de caldo YPD al 2% y se incubó a 28 °C durante 24 h o hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, las células se recolectaron mediante centrifugación a 3000 xg durante 20 min; el precipitado resultante se lavó una vez y se resuspendió en 1 mL de la solución lioprotectora. Dicha suspensión se fraccionó en viales o ampollas de 300 µL para su posterior liofilización. Los viales se colocaron inicialmente en freezer a -40 °C y, posteriormente, se sometieron a liofilización en un equipo Rificor S.H. (L-A-E50-CRT, Industria Argentina), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (temperatura de congelado de producto: -36°C; vacío: 0,022 mmHg; tiempo: 8 h). Una vez finalizado el proceso, los viales se cerraron en condiciones de vacío utilizando el sistema integrado del equipo de liofilización y se almacenaron a 4 °C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resistencia al proceso de liofilización

Inmediatamente después del proceso de liofilización, el material liofilizado fue resuspendido en 300 µL de una solución de sacarosa al 5% y se incubó a 35 °C durante 10 min. Posteriormente, se colocó en un agitador orbital a 65 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y, finalmente, se incubó a 28 °C durante 20 min.

La viabilidad celular (UFC/mL) se determinó mediante el método de diluciones seriadas y siembra en superficie en placas de Petri. Para evaluar la resistencia al proceso de liofilización, se definió un factor de sobrevida (FS) según la siguiente fórmula:

$$FS = 1 - \frac{\left(\frac{UFC}{mL_{inicial}} - \frac{UFC}{mL_{final}} \right)}{\frac{UFC}{mL_{inicial}}} \quad (1)$$

Alternativamente, los resultados fueron expresados como porcentaje de sobrevida, utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Sobrevida = \left(\frac{\frac{UFC}{mL_{final}}}{\frac{UFC}{mL_{inicial}}} \right) * 100 \quad (2)$$

Evaluación de la viabilidad a lo largo del tiempo

Para analizar la estabilidad de la cepa liofilizada a lo largo del tiempo, se conservaron viales a 4 °C y, a intervalos definidos, se realizaron pruebas de viabilidad que consistieron en la rehidratación de la cepa m11-2 liofilizada, seguida de diluciones seriadas y siembras en superficie en placas de Petri con medio YPD. Posteriormente, las placas fueron

incubadas a 28 °C durante 48-72 h para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Detección de actividad pectinolítica

La capacidad de la cepa para hidrolizar pectina se evaluó mediante el método de halos de clarificación de acuerdo a Merín et al. (2015). El cultivo se inoculó de forma puntual sobre un medio de pectina-agar (g/L: cloruro de calcio, 0,05; fosfato de potasio, 0,2; sulfato de magnesio, 0,8; sulfato de amonio, 1; sulfato de manganeso, 0,05; extracto de levadura, 1; pectina cítrica, 2; agar, 15; pH 4,5) y se incubó a 28°C durante 48-72 h. La actividad enzimática se evidenció por la aparición de halos claros alrededor de las colonias, observables sobre un fondo marrón-púrpura tras la adición de solución de Lugol.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las diferencias significativas entre los valores medios de cada tratamiento se evaluaron mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significancia de 0,05. El análisis de los datos se efectuó utilizando el software InfoStat (versión 2022).

3. Resultados y Discusión

Caracterización morfológica de la cepa *A. pullulans* m11-2

En la industria enológica, se requieren organismos capaces de producir enzimas líticas que faciliten la degradación de la pared celular vegetal. *Aureobasidium pullulans* ha sido ampliamente reconocido por su eficiencia en la producción de enzimas hidrolíticas (Longhi et al., 2022; Oskay, 2022). Aunque presenta fases de crecimiento similares a las levaduras, es un organismo multicelular con un ciclo dimórfico, lo que le confiere ventajas adaptativas y funcionales. Su presencia predominante en la superficie de la uva y en etapas tempranas de fermentación, junto con su capacidad para liberar enzimas al medio, lo posicionan como una herramienta biotecnológica prometedora en vinificación.

En el análisis macroscópico (Figura 1A), la cepa m11-2 desarrolló colonias de forma circular con márgenes irregulares y superficie lisas, viscosas y brillantes. Los diámetros oscilaron entre 2 y 5 mm, alcanzando hasta 9 mm tras 3 días de incubación en medio YPD a 28 °C. La coloración fue rosada amarillenta, intensificándose con el tiempo hacia tonos marrones oscuros o negruzcos. Este cambio cromático fue consistente con la producción de melanina, un pigmento asociado a la maduración del

micelio y a mecanismos de protección frente a condiciones ambientales adversas (Prasongsuk et al., 2018). Las estructuras radiales superficiales observadas se corresponden con hifas que no forman micelio aéreo, lo que concuerda con lo reportado con otras cepas de *A. pullulans* aisladas de frutas y suelos (Chen et al., 2024; Zalar et al., 2008).

Desde el punto de vista microscópico (Figura 1B y 1C), se observó la coexistencia de dos tipos morfológicos: conidios piriformes dispuestos homogéneamente, algunos en proceso de gemación (fase levaduriforme), e hifas septadas con conidióforos terminales e intercalares que generaban endoconidios (fase micelial). Esta capacidad dimórfica es una característica distintiva de *A. pullulans*, relacionada con su versatilidad metabólica y su habilidad para colonizar distintos nichos ecológicos (Gostinčar et al., 2014). La expresión simultánea de ambas formas en la cepa m11-2 refleja un estado de transición y adaptabilidad a las condiciones del medio de cultivo.

En conjunto, las características morfológicas observadas en la cepa m11-2 coinciden con las descripciones clásicas de *A. pullulans*, la cual se encuentra registrada en GenBank bajo el número de acceso PV659872.

Proceso de liofilización y conservación de la cepa *A. pullulans* m11-2

La liofilización, ampliamente utilizada para conservar cepas microbianas y mantener sus actividades biológicas a largo plazo, prolonga la vida útil de los microorganismos, permitiendo almacenar grandes volúmenes de material seco por más de un periodo de vendimia. Este método mantiene propiedades fermentativas y/u organolépticas, a la vez que ofrece ventajas financieras y reduce el riesgo de contaminación (Nikolaou et al., 2020). Aunque existen pocos estudios sobre la liofilización de levaduras vínicas, investigaciones previas han evaluado protocolos y la resistencia de cultivos mixtos de *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces* y *Oenococcus oeni*, destacando la necesidad de ajustar las condiciones específicas para cada cepa (Bergenholtz et al., 2012; Bravo-Ferrada et al., 2018).

El efecto de la liofilización en *A. pullulans* m11-2 se evaluó siguiente como referencia la investigación de Martín et al. (2017), en la cual se comparó el impacto de este proceso con el secado convencional a baja temperatura en levaduras vínicas. El porcentaje de viabilidad de la cepa liofilizada en presencia de distintos agentes protectores se muestra en la Figura 2.

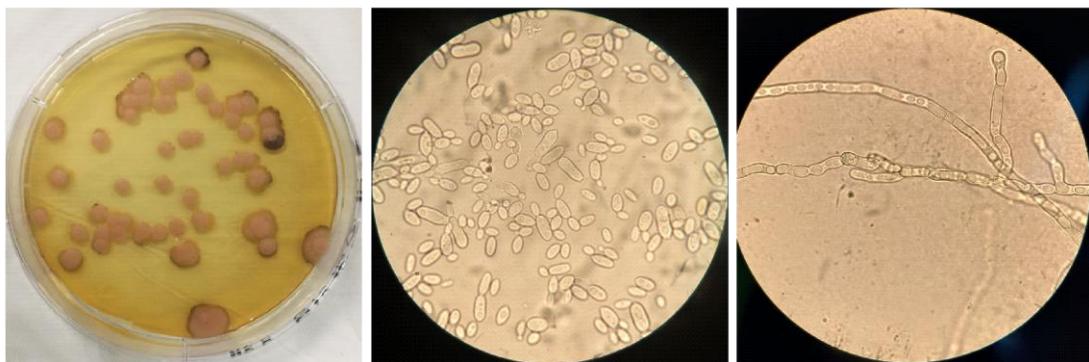


Figura 1. Caracterización morfológica de la cepa *A. pullulans* m11-2. Morfología macroscópica observada luego de 3 días de incubación en medio YPD a 28 °C, seguida de 7 días de conservación a 4 °C (A). Morfología microscópica en su estadio levaduriforme (B), donde se observan conidios piriformes distribuidos homogéneamente, algunos de ellos en proceso de gemación (blastoconidios). Estado micelial observado por microscopía (C), con hifas septadas que contienen estructuras compatibles con enfoconidios formados de manera intercalar.

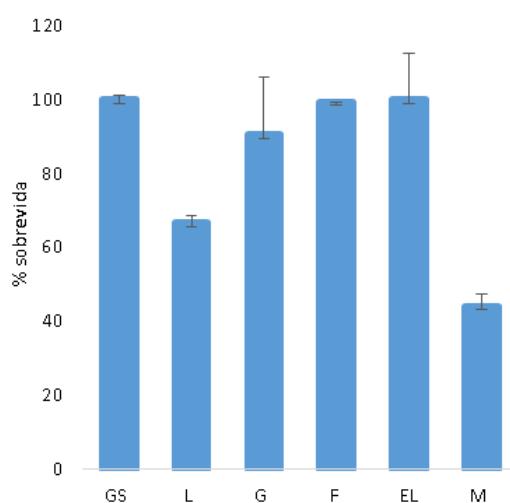


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de *A. pullulans* m11-2 tras la liofilización con distintos lioprotectores: glutamato de sodio 2,4% (GS); leche descremada 10% (L); glucosa 10% (G); fructosa 10% (F); extracto de levadura 4% (EL); y mosto 18% (M). Los segmentos verticales indican desviación estándar (n=3).

De acuerdo con estos resultados, la cepa mostró buena adaptación a varios lioprotectores, como glutamato de sodio (2,4%), fructosa (10%) y extracto de levadura (4%), alcanzando un 100% de viabilidad tras la liofilización; en el caso de la glucosa (10%), el porcentaje fue del 90%. En los restantes tratamientos, la viabilidad fue significativamente más baja. En la Tabla 1 se presentan los recuentos celulares finales, los cuales fueron suficientemente elevados como para constituir un inóculo significativo por unidad de volumen. El agente más eficiente fue el glutamato de sodio, alcanzando un valor de $4,04 \times 10^7$ UFC/mL.

Estos resultados coinciden con los reportados por Martín et al. (2017), quienes observaron que las cepas no-*Saccharomyces* presentaron niveles de viabilidad significativamente superiores a los de *Saccharomyces* tras la liofilización. De manera similar, Bravo-Ferrada et al. (2018) reportaron una elevada resistencia a la liofilización en *Oenococcus oeni* en presencia de trehalosa como crioprotector. A pesar de observarse cambios fenotípicos menores en la superficie celular mediante microscopía de fuerza atómica, no se detectaron fenómenos de lisis ni disruptión de membrana, lo que sugiere una conservación estructural adecuada del microorganismo durante el proceso.

Asimismo, Han et al. (2021) obtuvieron altos porcentajes de sobrevida utilizando combinaciones de compuestos como leche, trehalosa y polietilenglicol para la preservación de cepas de biocontrol, lo que resalta la efectividad de azúcares, proteínas y polialcoholes como agentes protectores frente al estrés de secado.

Estabilidad de sobrevida en el tiempo

Considerando que la liofilización permite preservar la viabilidad de los cultivos durante años, se continuó el estudio de conservación de la cepa *A. pullulans* m11-2 liofilizada, almacenada a 4 °C.

En primer lugar, con el objetivo de discriminar cuál de los lioprotectores evaluados ofrecía una mejor estabilidad, se analizaron las tasas de sobrevida tras 6 meses de almacenamiento a 4 °C. Tal como se observa en la Figura 3, el glutamato de sodio al 2,4% resultó nuevamente el lioprotector más eficaz, superando el 90% de sobrevida, mientras que el resto de los tratamientos mostró una pérdida marcada en la viabilidad.

Tabla 1. Recuento de células viables (UFC/mL) antes y después de la liofilización en distintos lioprotectores para la cepa *A. pullulans* m 11-2.

Agente protector para la liofilización	Recuento inicial (UFC/mL)	Recuento final (UFC/mL)
Glutamato de Na 2,4%	$2,11 \times 10^7 \pm 2,90 \times 10^6$	$4,04 \times 10^7 \pm 2,02 \times 10^6$
Fructosa 10%	$3,29 \times 10^7 \pm 1,63 \times 10^6$	$3,49 \times 10^7 \pm 2,97 \times 10^6$
Mosto de uva	$5,82 \times 10^7 \pm 1,39 \times 10^7$	$2,77 \times 10^7 \pm 3,75 \times 10^6$
Extracto de levadura 4%	$1,34 \times 10^7 \pm 8,49 \times 10^5$	$1,46 \times 10^7 \pm 7,78 \times 10^5$
Glucosa 10%	$3,27 \times 10^7 \pm 9,90 \times 10^5$	$3,78 \times 10^7 \pm 1,44 \times 10^7$
Leche descremada 10%	$2,98 \times 10^7 \pm 6,79 \times 10^5$	$2,21 \times 10^7 \pm 1,56 \times 10^6$

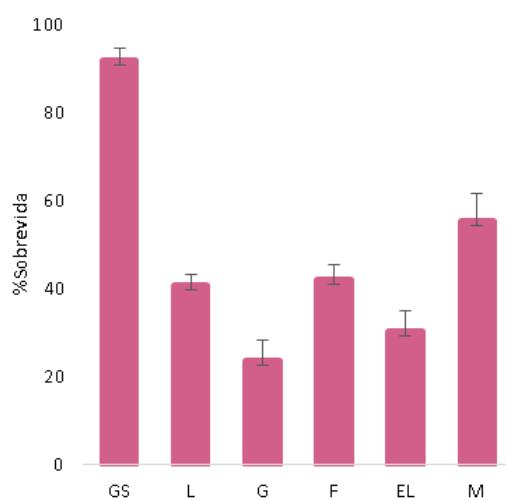


Figura 3. Porcentaje de sobrevida de la cepa *A. pullulans* m11-2 liofilizada en los distintos lioprotectores: glutamato de sodio 2,4% (GS); leche descremada 10% (L); glucosa 10% (G); fructosa 10% (F); extracto de levadura 4% (EL); y mosto 18% (M), luego de 6 meses de almacenamiento a 4 °C. Los segmentos verticales indican desviación estándar (n=3).

Posteriormente, se profundizó el estudio de viabilidad de la cepa almacenada con glutamato de sodio como lioprotector, dado su desempeño superior. La cepa *A. pullulans* m11-2 se mantuvo viable hasta, al menos, 18 meses después del proceso ($2,30 \times 10^7 \pm 7,07 \times 10^6$ UFC/mL).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodriguez et al. (2019), quienes observaron que, a pesar de ciertas modificaciones fenotípicas generadas por el envejecimiento en cepas de *Aspergillus*, su potencial biotecnológico no se vio comprometido. Este tipo de estudios refuerza la

importancia de evaluar la estabilidad celular no solo inmediatamente después de la liofilización, sino también en función de su comportamiento tras períodos prolongados de almacenamiento.

Análisis cualitativo de la actividad enzimática

La capacidad pectinolítica de la cepa *A. pullulans* m11-2 se evaluó cualitativamente mediante la formación de halos de clarificación alrededor de las colonias cultivadas en medio con pectina como única fuente de carbono (Figura 4). Los resultados obtenidos indicaron que, independientemente del lioprotector utilizado, la cepa liofilizada conservó su capacidad para degradar pectina.

La relación entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia (DH/DC) se mantuvo aproximadamente constante, con un valor de 3,0, tanto inmediatamente después del proceso de secado como luego de 6 meses de almacenamiento a 4 °C. Esto sugiere que la actividad enzimática pectinolítica no se vio afectada por la liofilización ni por el almacenamiento a mediano plazo.

Si bien se ha reportado que el proceso de liofilización conlleva inevitablemente una reducción en la actividad y función celular (Wang et al., 2020), los resultados obtenidos con la cepa *A. pullulans* m11-2 indican una notable estabilidad funcional tras este tratamiento. Resultados similares fueron reportados por (Rodriguez et al., 2019), quienes observaron que cepas de *Aspergillus* también mantenían su actividad enzimática luego del proceso de liofilización, lo que resalta la necesidad de evaluar cómo se conserva la funcionalidad celular con el paso del tiempo.

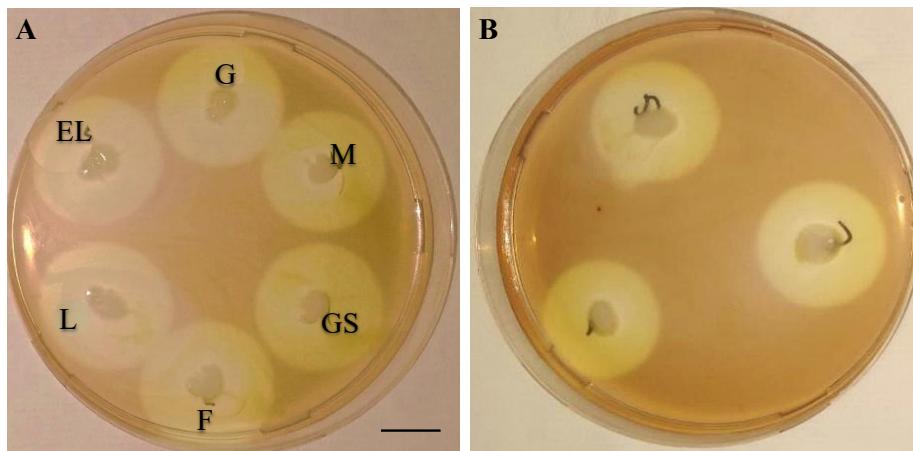


Figura 4. Actividad pectinolítica de *A. pullulans* m11-2 luego del proceso de liofilización (A), en presencia de diferentes lioprotectores: extracto de levadura (EL); glucosa (G); mosto (M); glutamato de sodio (GS); fructosa (F); leche descremada (L). Actividad pectinolítica observada tras 6 meses de conservación a 4 °C, utilizando glutamato de sodio como agente lioprotector y evaluada en 3 réplicas (B). Barra de escala: A-B = 10 mm.

4. Conclusiones

La cepa *A. pullulans* m11-2 fue conservada mediante liofilización utilizando glutamato de sodio al 2,4% como agente lioprotector, manteniendo tanto su viabilidad como su actividad pectinolítica durante al menos 18 meses de almacenamiento a 4 °C. Estos resultados demuestran la eficacia de este protocolo de conservación para obtener levaduras secas activas viables y funcionales, y refuerzan su potencial como fuente enzimática para aplicaciones enológicas específicas.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de SIIP-UNCUYO (número de subvención 06/L004-T1 y 06/L013-T1), PICT (MINCYT)-BID (número de subvención 2019-03446) y PIP-CONICET (número de subvención 2021-0074).

6. Referencias

- Ávila, L., Naranjo, J., & Higuita, J. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. Revista Vector, 10, 7–13.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. In International Journal of Food Microbiology (Vol. 153, Issue 3, pp. 243–259). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Bergenholtz, Å. S., Wessman, P., Wuttke, A., & Håkansson, S. (2012). A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. Cryobiology, 64(3), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.01.002>
- Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E., & Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. Food Research International, 122, 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.043>
- Bravo-Ferrada, B. M., Gonçalves, S., Semorile, L., Santos, N. C., Brizuela, N. S., Elizabeth Tymczyszyn, E., & Hollmann, A. (2018). Cell surface damage and morphological changes in *Oenococcus oeni* after freeze-drying and incubation in synthetic wine. Cryobiology, 82, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.014>
- Burguet-Lago, N., Sierra-Prado, N., & Estrada, M. A. (2014). Evaluación de una formulación para la conservación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. In Revista CENIC Ciencias Biológicas (Vol. 45, Issue 1).
- Buzzini Pietro, Di Mauro Simone, & Turchetti Benedetta. (2017). Yeasts as starter cultures. In Barbara Speranza, Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo, & Milena Sinigaglia (Eds.), Starter Cultures in Food Production (First Edition, pp. 16–49). John Wiley & Sons, Ltd. www.lallemand.com
- Chen, J., Lu, Y., Liu, L., Bai, R., Zhang, S., Hao, Y., Xu, F., Wei, B., & Zhao, H. (2024). Characteristic

- analysis and fermentation optimization of a novel *Aureobasidium pullulans* RM1603 with high pullulan yield. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 137(5), 335–343.
- Chen, Y., Jiang, J., Song, Y., Zang, X., Wang, G., Pei, Y., Song, Y., Qin, Y., & Liu, Y. (2022). Yeast Diversity during Spontaneous Fermentations and Oenological Characterisation of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for Potential as Wine Starter Cultures. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071455>
- Claus, H., & Mojsov, K. (2018). Enzymes for wine fermentation: Current and perspective applications. In *Fermentation* (Vol. 4, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030052>
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., & Kourkoutas, Y. (2016). Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. *LWT*, 69, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.063>
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C. Y., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I. V., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: Biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-549>
- Han, L., Pu, T., Wang, X., Liu, B., Wang, Y., Feng, J., & Zhang, X. (2018). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology*, 81, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.003>
- Han, P., Ni, L., Wei, Y., Jiang, S., Xu, F., Wang, H., & Shao, X. (2021). Optimization of the freeze-drying of marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 for its application in biocontrol of fungal infections. *Biological Control*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.bioc.2021.104707>
- Longhi, S. J., Martín, M. C., Merín, M. G., & Morata de Ambrosini, V. I. (2022). Yeast Multi-Enzymatic Systems for Improving Colour Extraction, Technological Parameters and Antioxidant Activity of Wine. *Food Technology and Biotechnology*, 60(4), 556–570. <https://doi.org/10.17113/FTB.60.04.22.7777>
- Martín, M. C., Muñoz, F. A., & Morata de Ambrosini, V. I. (2017). Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael-Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización.
- Martín, M. C., Prendes, L. P., Morata, V. I., & Merín, M. G. (2024). Biocontrol and Enzymatic Activity of Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts: Improvements in Winemaking. In *Fermentation* (Vol. 10, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/fermentation10040218>
- Merín, M. G., Martín, M. C., Rantsiou, K., Cocolin, L., & De Ambrosini, V. I. M. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 815–823. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140160>
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F. M., & Yliperttula, M. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 336, pp. 480–498). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>
- Nikolaou, A., Sgouros, G., Mitropoulou, G., Santarmaki, V., & Kourkoutas, Y. (2020). Freeze-dried immobilized kefir culture in low alcohol winemaking. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020115>
- Oskay, M. (2022). Production, Partial Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans* P56 under Submerged Fermentation Using Agro-Industrial Wastes. *Current Microbiology*, 79(10). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02991-6>
- Pietrafesa, A., Capece, A., Pietrafesa, R., Bely, M., & Romano, P. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* mixed starter cultures: Influence of microbial/physical interactions on wine

- characteristics. *Yeast*, 37(11), 609–621. <https://doi.org/10.1002/yea.3506>
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905>
- Polo, L., Mañes-Lázaro, R., Olmeda, I., Cruz-Pio, L. E., Medina, Ferrer, S., & Pardo, I. (2017). Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1603–1614. <https://doi.org/10.1111/jam.13465>
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., & Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. In *Folia Microbiologica* (Vol. 63, Issue 2, pp. 129–140). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4>
- Río Segade, S., Pace, C., Torchio, F., Giacosa, S., Gerbi, V., & Rolle, L. (2015). Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles. *Food Research International*, 71, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.012>
- Rodriguez, R., Santos, C., Simões, M. F., Soares, C., Santos, C., & Lima, N. (2019). Polyphasic, including maldi-tof ms, evaluation of freeze-drying long-term preservation on *aspergillus* (Section *nigri*) strains. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090291>
- Shu, G., Zhang, B., Hui, Y., Chen, H., & Wan, H. (2017). Optimization of cryoprotectants for *Streptococcus thermophilus* during freeze-drying using Box-Behnken experimental design of response surface methodology. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(4), 256–263. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-07-960>
- Sternes, P. R., Lee, D., Kutyna, D. R., & Borneman, A. R. (2017). A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience*, 6(7). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040>
- Wang, G. Q., Pu, J., Yu, X. Q., Xia, Y. J., & Ai, L. Z. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066–3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
- Wang, H., Tong, X., Yuan, Y., Peng, X., Zhang, Q., Zhang, S., Xie, C., Zhang, X., Yan, S., Xu, J., Jiang, L., Qi, B., & Li, Y. (2020). Effect of Spray-Drying and Freeze-Drying on the Properties of Soybean Hydrolysates. *Journal of Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9201457>
- Wolkers Willem, & Oldenhof Harriëtte. (2021). Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. In Willem F. Wolkers & Harriëtte Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Fourth Edition). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1>
- Yang, K., Zhu, Y., Qi, Y., Zhang, T., Liu, M., Zhang, J., Wei, X., Fan, M., & Zhang, G. (2019). Analysis of proteomic responses of freeze-dried *Oenococcus oeni* to access the molecular mechanism of acid acclimation on cell freeze-drying resistance. *Food Chemistry*, 285, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.120>
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhaham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>