

Nuevos Horizontes  
en la  
Viticultura y Enología



# Efecto de la temperatura de congelación en la conservación de levaduras vínicas mediante a técnica de liofilización

Lucía Polo<sup>1</sup>, Sergi Ferrer<sup>1</sup>, Isabel Pardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología y Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Valencia 963544390.  
e-mail: Lucia.Polo@uv.es

## Resumen

La liofilización es el método más utilizado por las colecciones internacionales de cultivos tipo para la conservación de los microorganismos. Básicamente consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos y eliminar el agua congelada como vapor de agua, sin pasar por el estado líquido intermedio. Por lo tanto, combina dos técnicas: congelación y sublimación. El objetivo de nuestro trabajo ha sido el estudio de la influencia de la temperatura de congelación sobre la viabilidad final de levaduras vínicas tras el proceso de liofilización. Para ello se evaluó la supervivencia de 11 cepas de diferentes especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Dekkera*, y *Schizosaccharomyces* sometidas a una liofilización de 16 horas tras congelación a distintas temperaturas (-20°C, -80°C y nitrógeno líquido). Los resultados obtenidos hasta el momento nos muestran que la congelación en nitrógeno líquido disminuye drásticamente la viabilidad tras la liofilización y que se obtienen supervivencias mucho más elevadas cuando la congelación se realiza a -20°C o a -80°C. Los resultados son semejantes en todas las levaduras estudiadas, lo que permite concluir que se optimiza el proceso de conservación por liofilización de las levaduras cuando se congelan previamente a una temperatura de -20°C en lugar de en nitrógeno líquido.

**Palabras clave:** liofilización, levaduras, congelación, liofilización, conservación, viabilidad.

## 1. Introducción

La liofilización es una forma de desecado en frío que sirve para conservar sin daño los más diversos materiales biológicos. En el proceso, primero se congela el material, y luego el hielo se elimina por sublimación. En la industria podemos encontrar alimentos liofilizados como sopas, cafés, frutas finas como frambuesas, frutas tropicales. También podemos liofilizar para su conservación plasma sanguíneo, suero, soluciones de hormonas, productos farmacéuticos como vacunas. La forma y características del producto final son esencialmente las originales, debido a que a la baja temperatura que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles se minimiza, se reduce el peligro de contaminación microbiana y se evita la alteración de los enzimas. Es el proceso idóneo para sustancias termolábiles. Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado. Debido a esta serie de ventajas la liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos y es el método más utilizado por las colecciones de cultivos públicas. Este método de conservación reduce el riesgo de variación de las propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas de los microorganismos, permite su conservación durante largos periodos de tiempo, simplifica el uso industrial de los cultivos y facilita su transporte y distribución en lotes [1]. La capacidad de las levaduras de soportar la congelación depende de varios factores como son la fase de crecimiento, la temperatura de congelación, el contenido intracelular en trealosa, etc. [2]. La formación de cristales de hielo grandes en el interior de las células es letal [3]. Para evitar esta formación de cristales es necesario estudiar la mejor temperatura de liofilización.

## 2. Material y Métodos

### 2.1 Especies de levaduras utilizadas en este trabajo

En este trabajo estudiamos 11 especies pertenecientes a 9 géneros de levaduras que se suelen encontrar en vino. Las especies sometidas al estudio fueron las siguientes;

ESPECIE	CEPAS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ENOLAB 2056
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CECT 11982
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CECT 10688
<i>Pichia anomala</i>	CECT 1114
<i>Candida stellata</i>	CECT 11046
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CECT 1015
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CECT 11202
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CECT 1444
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CECT 1451
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	CECT 11204
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT 10685

## 2.2 Protocolo de liofilización

Se partió de 100 mL de un cultivo puro de levadura crecida en medio líquido GPYA en fase estacionaria (en la cual las células son usualmente más resistentes). A continuación se centrifugó el cultivo a 6000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con 100 mL de suero fisiológico. Se recogieron las células por centrifugación y se descartó el sobrenadante, resuspendiéndose el sedimento en una mezcla de 2 mL de leche descremada estéril (Oxoid) y 1 mL de glucosa estéril al 15%. Se realizó un recuento de viables de esta suspensión en placas de GPYA por duplicado. Se transfirieron 200 µL de suspensión celular a diferentes viales de vidrio, que se distribuyeron en 3 lotes de tres viales que se congelaron, respectivamente, a -20°C, -80°C y en nitrógeno líquido. Los viales sometidos a temperaturas de -20°C y -80°C permanecieron 1 hora en los congeladores antes de ser introducidos en el liofilizador. Posteriormente, se introdujeron todos los viales en el liofilizador previamente enfriado a -52°C. Se mantuvieron en el liofilizador durante 16 horas. A continuación, se rehidrataron las células de cada vial con 200 µL de suero fisiológico estéril y tras realizar las oportunas diluciones seriadas se sembraron en medio GPYA por duplicado. Las placas se incubaron durante 3-4 días a 28°C y tras este periodo se efectuó el recuento, expresándose el resultado como ufc/mL. La relación entre viables antes y después de la liofilización nos permitió el cálculo el porcentaje de supervivencia tras la liofilización realizada a diferentes temperaturas de congelación.

Los resultados de supervivencia de los cultivos se procesaron mediante el programa estadístico "Statistica V.8". Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) para observar si las diferencias entre tratamientos eran estadísticamente significativas y, en los casos en los que fue así, se realizaron comparaciones "post-hoc" para comprobar qué tratamiento proporcionaba la mayor supervivencia.

## 3. Resultados y Conclusiones

Como podemos observar en la Figura 1, la temperatura que proporcionó el porcentaje de supervivencia más bajo, en todos los casos estudiados, fue -196°C (correspondiente al N<sub>2</sub> líquido).

Todas las especies exhibieron un mayor porcentaje de supervivencia a -20°C que a -80°C, con la excepción de la especie *Issatchenkia orientalis* (CECT 10688), la cual exhibió mayor supervivencia a -80°C. Las especies *Dekkera bruxellensis* (CECT1451), *Saccharomyces cerevisiae* (ENOLAB 2056), *Issatchenkia occidentalis* (CECT 11204) y *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 10685) mostraron una muy baja viabilidad (inferior a 0.5 %) tras el proceso de liofilización a las tres temperaturas estudiadas. Por el contrario, las especies *Pichia membranaefaciens* (CECT 11982), *Candida stellata* (CECT 11046) y *Metschnikowia pulcherrima* (CECT 11202) mostraron porcentajes de viabilidad superiores al 24% llegando incluso al 38.25% en el caso de *Pichia membranaefaciens* para la temperatura de -20°C. La viabilidad de estas mismas especies a -80°C mostró ser 1.17 veces inferior frente a la viabilidad obtenida a -20°C.

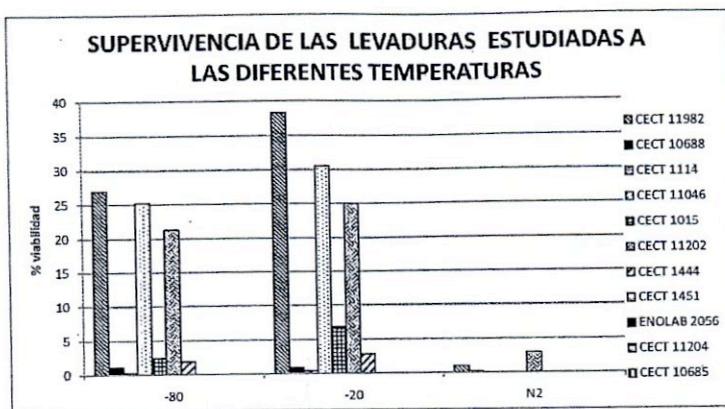


Fig1: Supervivencia media, expresada en %, de las levaduras estudiadas en relación a las distintas temperaturas de congelación ensayadas. En las cepas CECT 1451, 2056, 11204 y 10685 no se aprecian en la figura por exhibir porcentajes de supervivencia muy reducidos.

Las diferencias observadas entre las distintas temperaturas ensayadas en este trabajo resultaron ser estadísticamente significativas en todos los casos, con un pvalor <0.05. Un ejemplo de este estudio estadístico se muestra en la Figura 2, en la que se puede apreciar claramente el efecto de la temperatura sobre la supervivencia de la cepa de *Hanseniaspora uvarum* CECT 1444. La única cepa que no mostró un pvalor significativo fue la cepa CECT 1114 (Fig.3).

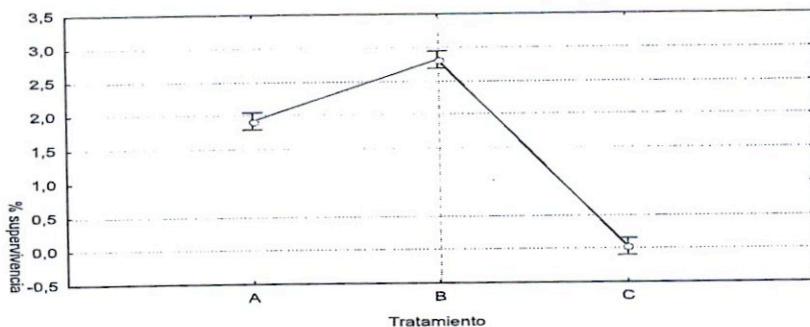


Fig.2. Resultados obtenidos con la cepa CECT 1444 frente a las distintas temperaturas de congelación previa a la liofilización. (A: -80°C, B: -20°C, C: nitrógeno líquido)

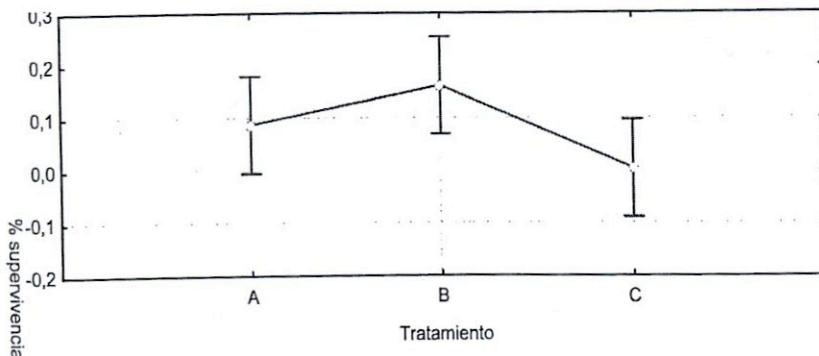


Fig3: Gráfica en la cual mostramos el comportamiento de la cepa CECT 1114 frente a las distintas temperaturas de congelación previa a la liofilización. (A: -80°C, B: -20°C, C: nitrógeno líquido)

Como conclusión se desprende que la congelación con nitrógeno líquido disminuye drásticamente la viabilidad de las levaduras vínicas sometidas a estudio, por lo que es aconsejable que el paso previo de congelación se realice a  $-20^{\circ}\text{C}$ , ya que es la temperatura que mejor resultados de supervivencia ha dado en el conjunto de las cepas analizadas, según se demuestra a partir del tratamiento estadístico de los datos.

#### 4. Bibliografía

- [1] Abreu, J.; González J. & Jaqueman F. 2003. Conservación por liofilización de diferentes especies de géneros de levaduras. *Alimentaria* 343: 119–122.
- [2] Nakamura T., Takagi H., Shima J. 2009. *Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* 58: 170-174.
- [3] Seki S., Kleinhansb F.W. Mazur P. 2009. *Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: Predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry*. *Cryobiology* 58: 157-165.

#### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, INIA y fondos FEDER a través del proyecto RM2007-00007-00-00. Agradecemos a Ángel Medina su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.