

ENOLOGÍA

**LEVADURAS SECAS ACTIVAS (LSA)
AUTÓCTONAS DE LA DOC SAN RAFAEL-MENDOZA:
RESISTENCIA AL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN**

- Martín, María Carolina
- Muñoz, Flavio Andrés
- Morata de Ambrosini, Vilma Inés

FCAI, UNCUYO - CONICET

Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael-Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización

Martín, María Carolina^{1,2}; Muñoz, Flavio Andrés¹; Morata de Ambrosini, Vilma Inés^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO; ² CONICET

mcmartin@fcai.uncu.edu.ar; vmorata@fcai.uncu.edu.ar; flavio_m500@hotmail.com

Resumen

La conservación de microorganismos por liofilización es una técnica que se aplica frecuentemente para mantener la viabilidad de cultivos iniciadores, resultando menos dañina que los procesos de deshidratación convencionales. Sin embargo, existen diversos factores que afectan la resistencia de los microorganismos al estrés del proceso de liofilización y a su posterior almacenamiento, que llevan a que se deban ajustar las condiciones para cada cepa microbiana. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue diseñar un protocolo de preparación de levaduras secas activas (LSA) mediante liofilización, para su posterior uso en el proceso de vinificación, de cepas autóctonas de la región DOC-San Rafael (Mendoza-Argentina), tanto del género *Saccharomyces* como No-*Saccharomyces*, previamente seleccionadas por sus cualidades enológicas. Se evaluó la viabilidad de las mismas en distintas soluciones lioprotectores, así como el efecto intrínseco del congelamiento previo a la liofilización, y se comparó con el secado convencional en estufa. La cepa no sacaromícética resistió completamente el proceso de liofilización empleando glutamato de sodio al 2,4% como agente protector, alcanzando casi un 100% de sobrevida. Mientras que para *S. cerevisiae*, los procesos más eficientes fueron la liofilización en presencia de mosto de uva como agente lioprotector, y el secado a baja temperatura (32°C), con 20,7 y 11,5% de sobrevida, respectivamente. La obtención de un protocolo óptimo de preparación de un cultivo iniciador es importante para poder llevar este desarrollo a bodega, y así llevar a cabo la inoculación de mostos en fermentación y sustitución de insumos importados, para la producción de vinos que potencien las cualidades organolépticas propias de la región.

Palabras Claves: Levaduras Secas Activas, Levaduras Autóctonas, Liofilización, *Saccharomyces*, Vino.

Introducción

La industria enológica hace uso de cultivos iniciadores para llevar a cabo la fermentación alcohólica en forma controlada y estandarizada. Comercialmente, se trata de levaduras secas activas (LSA), las cuales pueden ser cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* o cultivos mixtos de *S. cerevisiae*-levaduras *Non-Saccharomyces*, de cepas que, en el caso de Argentina, son originarias de otras regiones del mundo, las cuales se deben adquirir a precios elevados y además no potencian las cualidades de los vinos de la región.

Los microorganismos que se incluyen en el diseño de un cultivo iniciador para vinificación deben mantenerse viables y en alto número para que, al ser inoculados en los mostos, desempeñen adecuadamente sus funciones, como es la fermentación alcohólica. Estos requerimientos se relacionan directamente con el método que se aplica para obtener un elevado número de microorganismos y luego conservarlos. El almacenamiento a bajas temperaturas (congelación o refrigeración) y la liofilización son técnicas que se aplican frecuentemente para mantener la viabilidad de cultivos iniciadores (Pradelles y col., 2009; Zhao y Zhang, 2009).

Particularmente, la liofilización implica la eliminación del agua u otros solventes pasando directamente al estado gaseoso, a

partir de un producto congelado (proceso de sublimación), lo cual se logra aplicando vacío. De este modo, la viabilidad de los microorganismos se mantiene por 5 a 20 años, según la cepa. Los productos liofilizados son de alto valor comercial, debido a su elevado costo de producción ocasionado por la maquinaria requerida y la alta demanda energética. Existen diversos factores que afectan la resistencia de los microorganismos al estrés del proceso de liofilización y a su posterior almacenamiento, tales como el medio de cultivo que se emplea para obtener alta biomasa, el número inicial de células a liofilizar, la velocidad y temperatura de congelamiento y la temperatura de almacenamiento (Carvalho y col., 2004; Berner y Viernstein, 2006; Schoug y col., 2006; Schoung Bergenholtz y col., 2012). También la resistencia microbiana depende de factores intrínsecos relacionados con el género, la especie y el tamaño de la célula microbiana (Carvalho y col., 2004). Diversas publicaciones indican que las condiciones de liofilización y almacenamiento son muy diferentes y específicas para cada cepa, por lo que se deben ajustar para cada microorganismo (Carvalho y col., 2004; Berner y Viernstein, 2006; Schoung-Bergenholtz y col., 2012).

Otros métodos frecuentemente utilizados para la producción de cultivos microbianos son el secado *spray* o deshidratadores de

lecho fluidizado. Sin embargo, también se han reportado problemas de disminución de la viabilidad y efectividad de los cultivos, además de ser críticos los parámetros como la temperatura de secado, tamaño del gránulo a secar y humedad final del producto seco (Turker y col., 2006). Por otra parte, Tsaousi y col. (2008) reportaron un método de muy bajo costo y con muy buen rendimiento y efectividad, secando una cepa *S. cerevisiae* térmicamente a baja temperatura, colocando una capa fina de células prensadas en placas de vidrio en estufa a 32°C. Por lo que resulta necesario seguir investigando métodos de secado efectivos para la obtención de LSC al menor costo posible.

Objetivos

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la liofilización y del secado de levaduras vínicas autóctonas, para definir un protocolo más adecuado para la producción de levaduras secas activas (LSA).

Materiales y Métodos

Microorganismos y medios de cultivo:

Los microorganismos empleados fueron levaduras tanto del género *Saccharomyces* (*Sc* 13A-21) como no-*Saccharomyces* (NoS 8A-5), aisladas y seleccionadas previamente a partir de uvas y mostos en fermentación de la región vitivinícola San Rafael, Mendoza, Argentina (Cabeza y col., 2011). Como medio de cultivo

para el crecimiento de las cepas se utilizó caldo YEPG (en g/L: extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20, pH 5,5), así como YEPG agarizado cuando se requirió en medio sólido (g/L: agar, 15). Se emplearon tubos tipo Falcon con 20 mL de cultivo y la incubación se realizó en un baño termostático con agitación (Semedix, SHZ-88) por 24 h a 28°C (Figura 1).



Figura 1. Baño termostático agitado mostrando los tubos tipo Falcon con los cultivos de levaduras.

Soluciones lioprotectoras:

Como lioprotectores se emplearon soluciones en agua destilada estéril de: glutamato de sodio 2,4%, extracto de levadura 4%, fructosa 10%, glucosa 10%, leche descremada 10%, y mosto de uva (Bonarda, corregido a 18° Bx y

pH 5,0). Todas las soluciones se esterilizaron por filtración utilizando membranas Millipore (0,22 µm), con excepción del mosto de uva que se trató a 90°C durante 10 min para evitar su descomposición térmica.

Liofilización:

Las cepas en estudio se cultivaron en 20 mL de caldo YEPG al 2% y se incubaron a 28°C por 24 h o hasta alcanzar la fase estacionaria. Una vez obtenido el cultivo, las células fueron colectadas por centrifugación (3000xg, 20 min) y el precipitado fue lavado una vez y resuspendido en 1 mL del lioprotector. Seguidamente, se fraccionó en viales o ampollas para liofilización en volúmenes de 300 µL. Los viales se colocaron en freezer a -40°C y posteriormente se liofilizaron en un equipo Rificor S.H. (L-A-E50-CRT, Industria Argentina), en las condiciones indicadas por el fabricante (temperatura de congelado de producto: -36°C; vacío: 0,022 mm Hg; tiempo: 8 h). Una vez finalizado el proceso, los viales se cerraron en condiciones de vacío con el sistema de cierre del equipo de liofilización y se almacenaron a 4°C. En la Figura 2 se observa el liofilizador utilizado y los viales con el material biológico una vez terminado el proceso. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

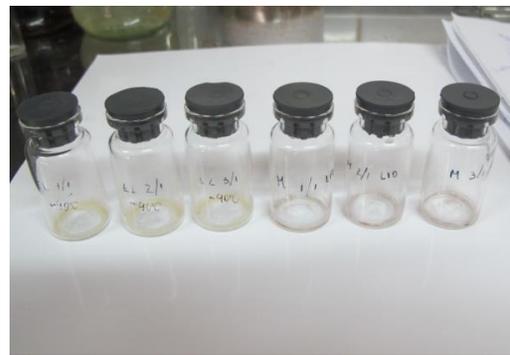


Figura 2. Liofilizador (Rificor S.H., modelo L-A-E50-CRT) y viales de vidrio con el material biológico liofilizado.

Resistencia al proceso de liofilización:

Inmediatamente después del proceso de liofilización, el material liofilizado se resuspendió en un volumen de 300 µL de agua peptona (0,1%) y se determinó la viabilidad celular (UFC/mL) de las cepas por el método de diluciones seriadas y siembra en superficie en placas de Petri. Se definió un factor de sobrevivencia al proceso de liofilización (FS) para este estudio, como sigue:

$$FS = 1 - \frac{[(UFC/mL \text{ inicial} - UFC/mL \text{ final}) / UFC/mL \text{ inicial}]}$$

Alternativamente, los resultados fueron expresados en porcentaje de sobrevivida:

$$\% \text{ Sobrevivida} = \left[\frac{\text{UFC/mL final}}{\text{UFC/mL inicial}} \right] * 100$$

Deshidratación convencional a baja temperatura:

En paralelo a la liofilización, y a modo comparativo, se llevó a cabo un ensayo de secado convencional en estufa de vacío, a 32°C. Esta consiste en la eliminación del agua pasando directamente del estado líquido al estado gaseoso, en ausencia de oxígeno. Para el ensayo, las células provenientes de un cultivo de 20 mL en caldo YEPG, de 24 h de incubación, fueron recolectadas, lavadas una vez, y resuspendidas en 1 mL de la solución protectora (mosto de uva Bonarda, corregido a 18° Bx y pH 5,0). Seguidamente, dicha suspensión fue fraccionada en placas de Petri en volúmenes de 300 µL cada una. Las placas fueron colocadas en estufa de vacío (presión de vacío: 400–550 mmHg) y el secado se realizó a 32°C, hasta obtener peso constante. Una vez finalizado el proceso, el material biológico seco se resuspendió en 300 µL de agua peptona (0,1%) y se determinó la viabilidad celular (UFC/mL) por el método de diluciones seriadas.

Análisis estadístico:

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Las diferencias significativas entre

los valores medios de cada tratamiento se determinaron con la prueba LSD de Fisher con un nivel de significancia 0,05, y el análisis de datos se realizó con el software Sthographic.

Resultados y Discusión

Los *startes* o cultivos iniciadores de levaduras consisten en un producto seco de levaduras biológicamente activas (levaduras secas activas, LSA) capaces de iniciar adecuadamente la fermentación alcohólica una vez inoculados al mosto. Existen diversos factores que afectan la resistencia de los microorganismos al estrés del proceso de liofilización y a su posterior almacenamiento. Sin embargo, se han reportado diversas estrategias para disminuir el daño de las células durante el proceso, dentro de las cuales se manejan los parámetros térmicos y cinéticos del proceso y el uso de lioprotectores, que incrementan la tasa de sobrevivida microbiana (Schoug y col., 2006). Entre estos compuestos se encuentran azúcares, aminoácidos, compuestos proteicos y moléculas antioxidantes (Huang y col., 2006; Juárez Tomás y col., 2009; Montel Mendoza y col., 2014). Por su parte, no existen muchos antecedentes que refieran al proceso de liofilización de levaduras vínicas. En un trabajo reciente, se estudiaron distintos protocolos de liofilización y resistencia a dicho proceso de cultivos vínicos mixtos de

levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, junto con la bacteria láctica *Oenococcus oeni* (Ale, 2014). Por lo que, en el presente trabajo se realizó una primera experiencia de liofilización teniendo en cuenta estos antecedentes. Los microorganismos empleados para este ensayo fueron la cepa *Saccharomyces* 13A-21 y la cepa no-*Saccharomyces* 8A-5 (levaduras no fermentativa), aisladas de uvas y mostos en fermentación de la región vitivinícola DOC-San Rafael (Mendoza-Argentina) y seleccionadas por su capacidad de crecimiento en mosto y por las cualidades organolépticas desarrolladas en los vinos producidos.

En la Figura 3 se puede observar el factor de sobrevivencia de las dos cepas estudiadas, liofilizadas, y empleando como soporte glutamato de Na al 2,4% o Fructosa al 10%. Los resultados fueron satisfactorios para la cepa no fermentativa 8A-5, particularmente utilizando el primer lioprotector mencionado ($FS=0,960\pm 0,382$), indicando por lo tanto una técnica de preservación muy conveniente para dicha cepa. Sin embargo, para la cepa sacaromícetica (*Sc* 13A-21), la viabilidad luego del proceso de liofilización fue prácticamente despreciable. Este resultado fue diferente del reportado por Ale (2014), donde para una cepa *S. cerevisiae* vínica se encontró que glutamato de sodio, glucosa y

maltosa fueron los mejores agentes lioprotectores.

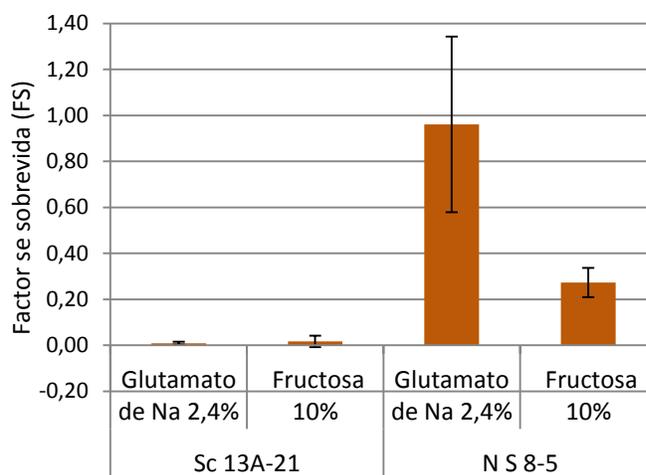


Figura 3. Factor de sobrevivencia (FS) de las cepas vínicas liofilizadas empleando como soporte glutamato de Na al 2,4% o Fructosa al 10%. Cepas: Sc13A-21) *Saccharomyces cerevisiae* 13A-21; NS8-5) No-*Saccharomyces* 8A-5.

A partir de estas experiencias preliminares se continuaron ensayando protocolos de liofilización para la cepa fermentativa *Sc* 13A-21. Por lo que se llevó a cabo un procedimiento de liofilización empleando otros agentes lioprotectores tomados de datos de la literatura. Para la elección de los lioprotectores, también se debe tener en cuenta, que sean fácilmente disponibles y en general de bajo costo. En este trabajo, entre los protectores seleccionados, se utilizó mosto de uva acondicionado (mosto Bonarda, corregido a 18° Bx y pH 5,0, pasteurizado), el cual no ha sido reportado previamente como

medio de soporte para levaduras vínicas liofilizadas. Los resultados son presentados en la Figura 4, la cual muestra el porcentaje de sobrevida de la cepa *S. cerevisiae* 13A-21 liofilizada en los distintos lioprotectores.

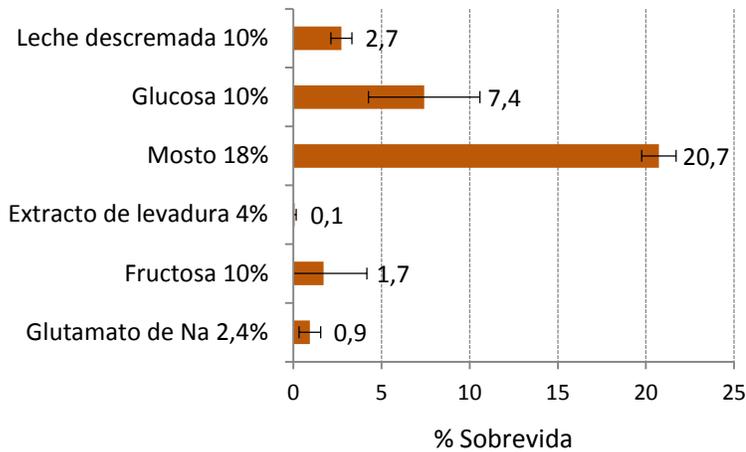


Figura 4. Porcentaje de sobrevida de la cepa *S. cerevisiae* 13A-21 liofilizada en los distintos lioprotectores.

A partir de dichos resultados, se puede observar que el mejor agente protector para la cepa *S. cerevisiae* 13A-21 resultó ser el mosto de uva acondicionado, en el cual la sobrevida fue superior al 20 %. Mientras que para los demás protectores, la sobrevida fue significativamente más baja. En comparación con los valores obtenidos para la cepa no-*Saccharomyces*, para la cual la sobrevida fue cercana al 100%, el valor de sobrevida de la cepa sacaromícética (alrededor de un 20%) parecería ser muy bajo. Sin embargo, se pudo observar que los recuentos celulares finales, los cuales se muestran en Tabla 1, fueron

suficientemente altos, representando un inóculo importante por unidad de volumen. En este sentido, para el mejor de los protocolos, que fue en el que se usó mosto como lioprotector, el valor final fue de $1,01 \times 10^8$ UFC/mL. Por otra parte, si se compara con las levaduras disponibles en el mercado, en éstas se asegura que el número de UFC/g sea superior a 10^{10} . En la presente experiencia, en 10 mg de levadura seca, que es el material producido en cada vial, se obtuvo un recuento de $1,01 \times 10^8$ UFC, de manera que en cada gramo se encuentra un número de células viables superior a 1×10^{10} UFC como se enuncia que poseen los preparados comerciales.

Tabla 1. Recuentos de células viables (UFC/mL) antes y después de la liofilización en diferentes lioprotectores para la cepa *S. cerevisiae* 13A-21.

Agente protector para la liofilización	Recuento inicial (UFC/mL)	Recuento final (UFC/mL)
Glutamato de Na 2,4%	$1,00 \times 10^9$	$9,50 \times 10^6$
Fructosa 10%	$1,05 \times 10^9$	$1,76 \times 10^7$
Mosto de uva	$3,14 \times 10^9$	$1,01 \times 10^8$
Extracto levadura 4%	$2,33 \times 10^9$	$1,76 \times 10^6$
Glucosa 10%	$1,19 \times 10^9$	$9,20 \times 10^7$
Leche descremada 10%	$1,67 \times 10^9$	$4,58 \times 10^7$

Adicionalmente, se evaluó el efecto intrínseco del frío (congelamiento a -40°C , previo a la liofilización) sobre la cepa *S. cerevisiae* 13A-21, utilizando como crioprotector extracto de

levadura al 4%. Las muestras se mantuvieron a -40°C por diferentes lapsos de tiempo, comprendidos entre 72 horas y 15 días, antes de la liofilización. Los resultados se pueden observar en la Tabla 2, los que indican que el porcentaje de sobrevida es mayor al menor tiempo.

Tabla 2. Disminución del recuento celular debido al efecto del congelamiento para la cepa *S. cerevisiae* 13A-21.

Tiempo de congelamiento a -40°C	% Sobrevida
72 horas	22,03 ± 7,00
15 días	14,25 ± 7,24

Estudios previos indican que, además de la presencia de un agente protector, la velocidad de congelamiento previo a la liofilización, es uno de los factores críticos para asegurar la viabilidad y estabilidad de los preparados microbianos (Gehrke y col., 1992; Berny y Hennebert, 1991). Se sabe, en términos generales, que las velocidades de congelamiento rápidas producen cristales intracelulares pequeños y éstos preservan mejor la estructura celular, mientras que el congelamiento lento da lugar a la formación de cristales grandes, que resultan muy dañinos para la célula (Badui Dergal, 2006). Bekatorou y col. (2001) observaron que la velocidad más adecuada de congelamiento era un descenso de la masa microbiana de 3°C/min. En el presente estudio, el

congelamiento de las células microbianas fue prácticamente instantáneo, ya que se trataba de muestras de muy pequeño volumen (300 µL) sometidas a congelamiento en freezer de -40°C. De acuerdo a los resultados expuestos en la Tabla 2, se observa que el porcentaje de sobrevida luego del congelamiento por 72 h es similar al obtenido luego de la liofilización empleando mosto de uva como agente protector, e incluso no hubo diferencias significativas en el recuento final ($3,17 \times 10^8$ UFC/mL luego del almacenamiento a -40°C/72 h), por lo que ensayos adicionales deben ser realizados para optimizar este paso previo a la liofilización, con objeto de mantener lo más alto posible el recuento microbiano inicial.

Por otra parte, y en base a la literatura, se realizó un ensayo de secado convencional a baja temperatura, como técnica alternativa y promisorio de un secado a más bajo costo y por tanto más accesible. Tsousi y col. (2008) investigaron el comportamiento de una cepa *S. cerevisiae* secada térmicamente a baja temperatura, colocando una capa fina de células en placas de vidrio en estufa a 32°C hasta peso constante. Estos autores concluyeron que la cepa secada térmicamente mostraba mejor capacidad fermentativa que la misma cepa liofilizada, y la composición química de volátiles producidos durante una fermentación era similar a la obtenida con la cepa sin secar. En base a estos datos

previamente reportados, se llevó a cabo un ensayo de secado en estufa de vacío, en placas de Petri, a $32 \pm 2,0^\circ\text{C}$, empleando como medio de soporte mosto de uva. En la Figura 5 se puede observar la cinética de deshidratado térmico para la cepa *Sc* 13A-21.

De acuerdo a los resultados obtenidos, por un lado, se observó que la deshidratación total se llevó a cabo en un tiempo suficientemente corto, similar a la reportada por Tsaousi y col. (2008), y que el tiempo de secado completo podría reducirse a 2 h en las condiciones ensayadas. Cabe destacar que se trata de condiciones suaves o leves, habiendo sido el secado a una temperatura promedio de $30,8^\circ\text{C}$. Por otra parte, el porcentaje de sobrevida de la cepa estudiada fue de $11,5 \pm 3,54\%$, y el recuento final de $2,36 \times 10^8$ UFC/mL luego del secado. Por lo dicha técnica resulta más conveniente que la mayoría de los protocolos utilizados para la liofilización, expuestos anteriormente, excepto para la realizada utilizando mosto de uva como lioprotector.

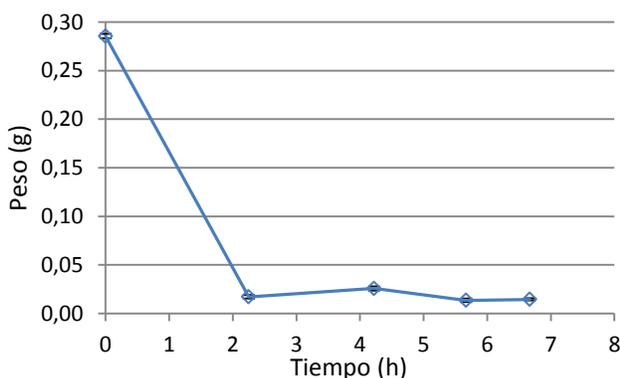


Figura 5. Cinética del secado térmico en estufa a vacío, a 32°C , de *S. cerevisiae* 13A-21.

Conclusiones

La técnica de secado y conservación aplicada sobre los microorganismos vnicos estudiados es una etapa clave en la producción de un cultivo iniciador en la forma de levaduras secas activas (LSA), y de gran interés comercial, ya que permite desarrollar un producto de fácil manipulación, transporte y administración en sistemas de mediana y gran escala. La sobrevida de los microorganismos durante un largo período de tiempo en matrices de bajo costo permitiría, además, manejar grandes volúmenes de polvo liofilizado que se podría almacenar para más de un período de vendimia con la seguridad que mantendrían las propiedades fermentativas y asegurando, así, una rentabilidad económica y la disponibilidad en bodegas.

Así, del presente trabajo de investigación se deduce que, para la cepa no sacaromictica, el mejor protocolo de producción de LSA es la liofilización empleando glutamato de sodio como agente protector, garantizando una casi total sobrevida luego de dicho proceso. Mientras que para *S. cerevisiae*, la elaboración de un cultivo iniciador sería tanto conveniente liofilizando la misma en presencia de mosto de uva acondicionado, o secándola térmicamente a baja temperatura.

Estas dos metodologías garantizarían la mejor forma de preservar y mantener activa esta importante cepa fermentativa para su uso en vinificación.

Financiamiento

- Proyecto I+D: “*Microorganismos del ecosistema uva-mosto-vino con potencial biotecnológico. Biocontrol y enzimas liberadoras de compuestos con actividad biológica*” (06/L131,Res.N°4540). SECTyP-UNCUYO. Directora: Vilma Inés Morata de Ambrosini.
- Proyecto I+D: “*Innovación de las principales herramientas biotecnológicas para vinificación, levaduras y enzimas pectinolíticas, para la diferenciación de los vinos de la región sur de Mendoza*”. Proyectos Federales de Innovación Productiva-PFIP 2009-1. Directora: Vilma Inés Morata de Ambrosini.

Bibliografía

- Ale, Cesar Emmanuel. 2014. Interacciones bacterias lácticas-levaduras vínicas: modificaciones de la expresión del metabolismo de glicerol. Tesis Doctoral. UNT. Tucumán, Argentina.
- Badui Dergal, S. 2006. Agua. Cap. 1, Química de los Alimentos. Cuarta edición, pp. 1-28, Ed. Grupo Herdez, SA de CV, Pearson Educación, México.
- Bekatorou, A.; Koutinas, A.; Kaliafas, A. Kanellaki, M. 2001. Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. *Process Biochemistry* 36, 549-557.
- Berner, D., Viernstein, H. 2006. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Sci. Pharm.*, 74, 137-149.
- Berny J-F, Hennebert GL. 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*; 83(6):805-15.
- Cabeza M.S., A.C. Drapala, M.R. Casas, V.I. Morata de Ambrosini, E.M. Puentes, R.O. Carrión, M.G. Molina. 2011. Microvinificaciones a partir de levaduras fermentativas aisladas de San Rafael, Mendoza, Argentina. *CIBIA VIII*.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., et al. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 14, 835-847.
- Gehrke H-H, Pralle K, Deckwer W-D. 1992. Freeze-drying of microorganisms: Influence of cooling rate on survival. *Food Biotechnol*; 6(1):35-49.
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lu, F., et al., 2006. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried

- Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33(1), 55-61.
- Juárez Tomás, M.S., Bru, E., Martos, G., Nader Macías, M.E. 2009. Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(5), 544-552.
- K. Tsaousi, D. Dimitrellou, A.A. Koutinas. 2008. Low- temperature thermal drying of *Saccharomyces cerevisiae* starter culture for food production. *Food Chemistry*, 547-553.
- Montel Mendoza, G., Pasteris, S.E., Otero, M.C., Nader-Macías, M.E. 2014. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from ranculture subjected to freeze-drying and storage. *J. Appl. Microbiol.*, 116 (1), 157-166.
- Pradelles, R., Vichi, S., Alexandre, H., Chassagne, D. 2009. Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine. *Int. J. Food Microbiol.*, 135, 152-157.
- Schoug Bergenholtz, A.S., Wessman, P., Wuttke, A., Hakansson, S. 2012. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*, 64 (3), 152-159.
- Schoug, A., Olsson, J., Carlfors, J., Schnurer, J., et al., 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology*, 53(1), 119-127.
- Zhao, G., Zhang, G. 2009. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. App. Microbiol.*, 99, 333-338.