

Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores

Luis C. Ávila Rincón^{a*}, Javier M. Naranjo Vasco^b, Juan C. Higueta Vásquez^c

^a Ingeniero Físico, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

^b Ingeniero Químico, Ph.D. Programa de Ingeniería Ambiental, Universidad Católica de Manizales.

^c Microbiólogo, Ph.D. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.

Recibido: 23/09/2015. Aprobado: 10/11/2015.

RESUMEN

La liofilización es un método ampliamente utilizado para la conservación de microorganismos debido a que permite que estos mantengan su viabilidad a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo con una buena estabilidad genética. Dado que es un proceso físico de deshidratación, donde el agua pasa por diferentes fases, las células pueden verse afectadas estructuralmente disminuyendo su viabilidad. Es por esto que es muy importante el uso de agentes lioprotectores y condiciones de liofilización adecuadas para cada tipo de microorganismos. En este artículo se analizan cuatro formulaciones de lioprotectores reportadas en la literatura para la conservación de levaduras y bacterias, comprobando el efecto lioprotector de la leche descremada más trehalosa en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*, así como de la miel de abejas en cepas de *Bacillus megaterium* y *Cupriavidus necator*, con porcentajes de viabilidad entre 85 % y 94 % después de la liofilización. Además, de establecer las mejores condiciones de liofilización para dichos microorganismos, se presenta una discusión sobre las diferentes teorías del mecanismo de acción de los lioprotectores y su interacción con las células buscando posibles explicaciones sobre el desempeño de los agentes lioprotectores utilizados (inositol, miel de abejas, leche descremada y trehalosa).

Palabras clave: conservación, liofilización, lioprotectores, bacterias, levaduras.

Viability of yeast and bacteria preserved by lyophilization: Effect of lyoprotectant agents

ABSTRACT

Lyophilization is a widely used method for preserving microorganisms because it allows them to maintain their viability at room temperature for long periods of time with good genetic stability. Since it is a physical process of dehydration where the water passes through different phases, cells may be affected structurally decreasing viability. This is why it is very important to use lyoprotectant agents and lyophilization conditions for each type of microorganisms. Four lyoprotectant formulations reported in the literature for the conservation of yeast and bacteria are analyzed in this article checking the lyoprotectant effect of skim milk plus trehalose on *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* strains as well as the protective effect of bee honey on *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator* strains, with viability percentages for both yeast and bacteria between 85 % and 93 % after lyophilization. Besides establishing the best lyophilization conditions for these microorganisms, a discussion for the different theories of the lyoprotectors mechanism of action and their interaction with cells for possible explanations of the performance of lyoprotectant agents used (inositol, bee honey, skim milk and trehalose) is presented.

Key words: preservation, lyophilization, lyoprotectant, bacteria, yeasts.

1. Introducción

La liofilización es un método que se usa con gran frecuencia para la conservación y almacenamiento de muestras biológicas. Consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas para detener su metabolismo y así poder ser conservadas a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo.

Sin embargo, este método presenta efectos indeseados en las células preservadas tales como destrucción de su estructura celular debido a la formación de cristales de hielo intracelular y extracelular, daño por deshidratación excesiva, daño celular por incremento en la concentración de solutos dentro de la célula gracias a la pérdida de agua provocando un gradiente osmótico perjudicial entre otros (Morgan *et al.*, 2006; Berny y Hennebert, 1991; MacKenzie, 1977).

Para controlar estos efectos, además de la selección de una rampa de congelación y sublimación adecuadas, se emplean diferentes sustancias denominadas

* Autor de correspondencia.
E-mail: lucavilari@unal.edu.co (L. Ávila)

Cómo citar este artículo:

Ávila Rincón L.C., Naranjo Vasco J.M., Higueta Vásquez J.C. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Revista Vector*, 10: 7-13.

lioprotectores los cuales protegen a las células de los daños causados durante la liofilización. Algunos disacáridos (trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa) (Leslie *et al.*, 1995; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Palmfeldt *et al.*, 2003), la leche descremada y diversos polialcoholes, han mostrado gran eficacia como agentes lioprotectores (Berny y Hennebert, 1991; MacKenzie, 1977).

Hasta el momento se han propuesto diferentes teorías sobre el mecanismo de acción de los lioprotectores en las células liofilizadas. En el caso de los disacáridos, se plantea que estos protegen a las células al sustituir a las moléculas de agua durante el proceso de liofilización (Leslie *et al.*, 1995; Crowe *et al.*, 2003). De esta forma las células no pasan de su estado de cristal líquido a la fase de gel y mantienen su estructura celular intacta (Leslie *et al.*, 1995), lo cual posibilita que la membrana no sufra rupturas durante el proceso de liofilización y/o rehidratación.

La efectividad de los agentes lioprotectores varía de acuerdo al microorganismo a preservar sin embargo, aunque se han propuesto diferentes teorías sobre el mecanismo de protección de las diferentes sustancias, aún no hay un consenso en la literatura científica sobre el mecanismo de acción de estos agentes; por tanto, no hay una última palabra en cuanto a la designación de un lioprotector efectivo para una cepa microbiana determinada (Morales-García *et al.*, 2010).

En este artículo se analizan cuatro de los principales agentes lioprotectores en diferentes formulaciones reportados en la literatura para la conservación de las bacterias *Bacillus megaterium* y *Cupriavidus necator*, así como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*, por medio de liofilización, verificando su efecto en el porcentaje de viabilidad de estas cepas después de ser sometidas a un proceso de secado por liofilización.

2. Materiales y métodos

Crecimiento microbiano

Cada microorganismo a evaluar fue tomado de la colección del laboratorio de microbiología del Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Estos fueron crecidos a 31 °C por 24 horas para levaduras y 48 horas para bacterias, con agitación magnética a 120 rpm en dos medios formulados: caldo extracto de malta para levaduras y caldo nutritivo para bacterias.

Microorganismos a evaluar

Saccharomyces cerevisiae: levadura de amplio uso como modelo biológico y como agente para la

producción de bioetanol, cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación (Madrigal *et al.*, 2013).

Pichia stipitis: también conocido como *Scheffersomyces stipitis*, levadura empleada en la producción de etanol a través de la fermentación de xilosa y producción de ácido láctico (Martínez *et al.*, 2008).

Bacillus megaterium: bacteria Gram-positiva utilizada en la producción de piruvato, vitamina B12, fármacos con propiedades fungicidas y antivirales, enzimas y deshidrogenasas de aminoácidos y polihidroxialcanoatos (Foster y Litchfield, 1964; Naranjo *et al.*, 2013).

Cupriavidus necator: también conocida como *Ralstonia eutropha*, bacteria Gram-negativa utilizada en la producción de biopolímeros de tipo polihidroxialcanoato (PHA), hidrogenasas e isobutanol (Foster y Litchfield, 1964; Naranjo, 2010).

Agentes lioprotectores a evaluar

Cuatro medios de suspensión fueron evaluados como agentes lioprotectores, su composición expresada en % (p/v) en agua desionizada es la siguiente:

- Miel de abejas 10 %.
- Leche descremada en polvo 10 %.
- Trehalosa 10 %.
- Inositol 10 %.

La elección de los agentes lioprotectores a evaluar y su composición en peso volumen fueron determinadas por los datos reportados por Berny y Hennebert (1991) y Day y Staacy (2007), los cuales presentan estas formulaciones y concentraciones específicas como los mejores candidatos para agentes lioprotectores de levaduras y bacterias.

Preparación de viales

Una vez crecidos los microorganismos se procede a separarlos del medio de cultivo. Para ello se tomaron muestras de cada microorganismo en sus respectivos medios formulados en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml y se sometieron a centrifugación a una velocidad de 12000 rpm a una temperatura de 4 °C durante 12 minutos. Luego de precipitada la biomasa en dichos tubos, se retiró el sobrenadante y se suspendió por segunda vez en 1,5 ml del medio formulado con la misma clase de microorganismo presente y se centrifugó nuevamente. Después de retirado el sobrenadante se obtuvo la biomasa concentrada equivalente a 3 ml de medio formulado con microorganismos.

Al retirar el sobrenadante, se suspendieron los microorganismos precipitados en 3 ml de las diferentes formulaciones de liopreservantes a evaluar; las cuales se esterilizaron previamente de la siguiente forma: la leche descremada, la miel de abejas y una solución de inositol fueron esterilizadas por medio de autoclave a 115 °C por 15 minutos. Con la premisa de que tanto el inositol como la trehalosa son compuestos termolábiles; una segunda solución de inositol y la solución de trehalosa fueron esterilizadas por medio de filtración al vacío con membrana (tamaño de poro 0.2 µm). Para diferenciar las dos soluciones de inositol, de ahora en adelante, se referenciará la solución esterilizada por medio de autoclave como inositol A 10 % y la solución esterilizada por filtración al vacío con membrana como inositol M 10 %.

Se procede a suspender los microorganismos en 3 ml de cada formulación, de los cuales se tomaron 0,5 ml para su siembra en agar a fin de tener una referencia inicial para medir su viabilidad después del proceso de liofilización.

Los viales a liofilizar terminan con 2,5 ml de la formulación de lioprotector a evaluar con microorganismos suspendidos en ella, volumen elegido al mostrar los mejores resultados en el estudio realizado por Berny y Hennebert (1991).

El anterior procedimiento se realizó en cada microorganismo y en cada proceso de liofilización efectuado, variando las formulaciones a evaluar dependiendo del microorganismo.

Liofilización

El proceso de liofilización se llevó a cabo en un liofilizador piloto VirTis Genesis 25L propiedad del Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, con una rampa de congelación de -3 °C/min hasta alcanzar los -30 °C, para luego iniciar la sublimación con una rampa de calentamiento de 0,5 °C/min sin exceder los -20 °C a una presión de 1200 mTorr aproximadamente. La rampa de congelación fue elegida después de comparar las distintas rampas evaluadas por Berny y Hennebert (1991), de las cuales la rampa de congelación de -3 °C/min es la que reporta mejores resultados. La rampa de sublimación y la presión de trabajo se obtuvieron de datos suministrados por Berny y Hennebert (1991).

Determinación de las células viables

Se tomaron muestras de los viales con los microorganismos antes del proceso de liofilización y

con base en un conteo celular, en cámara de Neubauer realizado para las levaduras, se efectuaron diluciones de 1:10000 (10⁻⁴), 1:100000 (10⁻⁵), 1:1000000 (10⁻⁶) y 1:10000000 (10⁻⁷) para cada formulación, las cuales se sembraron por extensión en superficie utilizando un volumen de 0,15 ml en cajas de petri con agar extracto de malta. Para la siembra de bacterias se mantuvieron las medidas de diluciones y de igual forma se sembraron por extensión en superficie utilizando un volumen de 0,15 ml en cajas de petri con agar nutritivo. Los microorganismos se incubaron a 31 °C durante 24 horas para levaduras y 48 horas para las bacterias.

Una vez crecidas las colonias, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y se procedió a calcular su concentración sobre mililitro (UFC/ml) mediante la ecuación 1.

$$\text{Número de UFC/ml} = \frac{(\text{Número de UFC contadas por placa})}{(\text{factor de dilución})(\text{volumen de la muestra sembrada [ml]})} \quad (1)$$

Después del proceso de liofilización se rehidrata el contenido de los viales en 2,5 ml del medio en el que se creció previamente el microorganismo (extracto de malta para levaduras y caldo nutritivo para bacterias) y se repite el mismo procedimiento descrito previamente para realizar el cálculo de UFC/ml.

Se calcula el porcentaje de viabilidad de los microorganismos en cada formulación de acuerdo a la ecuación 2.

$$\text{porcentaje de viabilidad} = \left(\frac{x_f}{x_i}\right) \times 100 \quad (2)$$

Donde,

X_i: corresponde al número de UFC/ml antes de la liofilización.

X_f: corresponde al número de UFC/ml contadas después de la liofilización.

3. Resultados y discusión

Determinación del tiempo de liofilización

Para determinar el tiempo de liofilización adecuado para los microorganismos se realizó un primer proceso de liofilización antes de evaluar los efectos de los lioprotectores sobre las cepas. El microorganismo para esta primera prueba fue la levadura *S. cerevisiae* y la formulación elegida fue la de miel de abejas 10 % + leche descremada 10 %, formulación reportada por Berny y Hennebert (1991) para la lioprotección de levaduras. La figura 1 muestra el histograma del proceso de liofilización.

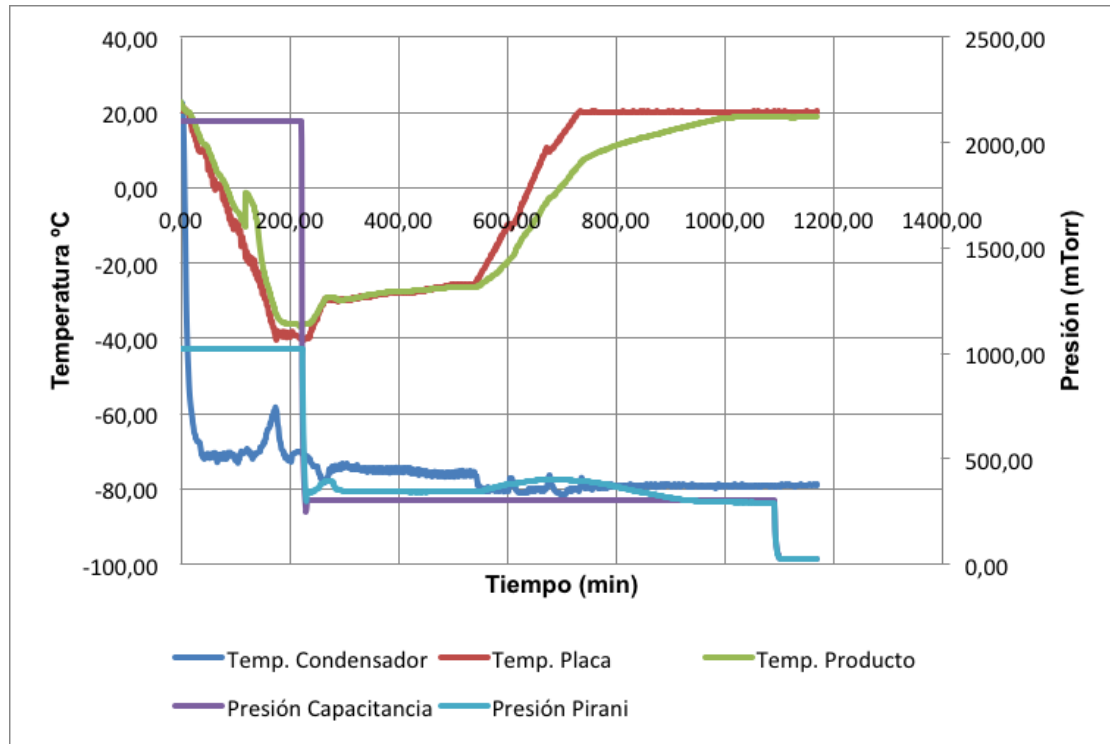


Figura 1. Perfil de liofilización para la *S. cerevisiae*.

Tabla 1

Porcentajes de viabilidad de los 4 microorganismos liofilizados bajo el efecto de las 4 formulaciones de lioprotectores evaluadas

Formulación	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>C. necator</i>
Miel 10 %	-	-	-	91,33
Trehalosa 10 %	-	-	92,24	85,33
Inositol A. 10 %	-	-	5,96	-
Inositol M. 10 %	-	-	52,08	-
Miel 10% + Leche descremada 10 %	14,56	59,62	94,88	79,97
Trehalosa 10 % + Leche descremada 10 %	93,74	80,87	21,26	-

Los espacios con el símbolo (-) indican que esa formulación no fue evaluada como lioprotector para dicho microorganismo.

En la figura 1 se puede observar que el proceso de liofilización solo requirió 16 horas y 40 minutos (1000 minutos), momento en que las líneas de presión se interceptan, lo que significa que el proceso de sublimación ha terminado. De esta manera se establece un tiempo de liofilización de 17 horas, tiempo que se utilizó como referencia en las liofilizaciones posteriores.

Liofilización de microorganismos

Para la liofilización de las cepas microbianas se sometieron a prueba 5 formulaciones con combinaciones de los 4 agentes lioprotectores a evaluar basadas en los datos reportados por Berny y Hennebert (1991) y por observaciones en procesos previos de liofilización (*S. cerevisiae*). En la tabla 1 y la figura 2 se muestran los porcentajes de viabilidad de las levaduras y las bacterias conservadas por liofilización en este trabajo.

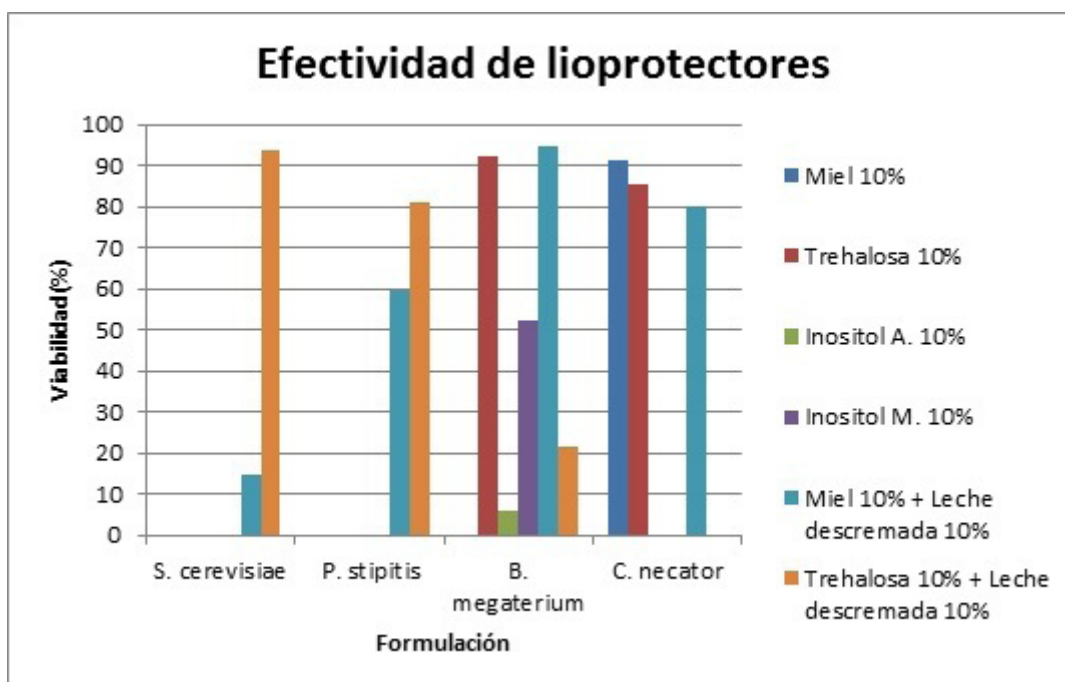


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de los 4 microorganismos liofilizados bajo el efecto de las 4 formulaciones de lioprotectores evaluadas.

La formulación de trehalosa al 10 % + leche descremada al 10 % fue la más efectiva tanto para la *S. cerevisiae* como para la *P. stipitis* (93 % y 80 % de viabilidad, respectivamente).

La leche descremada es un lioprotector ampliamente utilizado para proteger células eucariotas, especialmente las levaduras, ya que cuando se congela presenta una temperatura de transición vítrea (T_g) de -18 °C, lo que facilita la liofilización al contener una mezcla de macromoléculas (lactoalbúmina y caseína) y un disacárido. Estas macromoléculas a la vez sirven como agentes de carga y los aminoácidos contenidos en las macromoléculas ayudan a reparar el daño causado durante la liofilización (Crowe *et al.*, 1984, 1985, 1986).

Para el *B. megaterium* se obtuvieron resultados favorables con 2 formulaciones, la miel al 10 % + leche descremada al 10 % y la trehalosa al 10 %, formulaciones con las cuales el *B. megaterium* presentó una viabilidad del 94 % y 92 %, respectivamente. En el caso del *C. necator* las formulaciones de miel al 10 % y trehalosa al 10 %, presentaron los resultados más favorables con una viabilidad del 91 % y 85 %, respectivamente.

Con estos resultados se puede apreciar que si bien la leche descremada funciona como agente lioprotector para células eucariotas, su desempeño como lioprotector para las bacterias Gram-positivas varía de acuerdo al disacárido con el que se complementa en la formulación del lioprotector. A diferencia de la formulación de miel

al 10 % + leche descremada al 10 %, las cepas de *B. megaterium* protegidas con la formulación de trehalosa 10 % + leche descremada 10 %, reportaron un porcentaje de viabilidad del 21 %. Dado que los resultados con la formulación de trehalosa al 10 % fueron mejores (92,24 %), se puede suponer que la leche descremada es el agente responsable de la pérdida de viabilidad. Un efecto similar se evidencia cuando se emplea leche descremada con *C. necator* mostrando una disminución del 11 % en la viabilidad, comparado con el uso de la miel como único agente lioprotector.

Los disacáridos son lioprotectores altamente reconocidos en la literatura para la conservación de bacterias y se han propuesto diversas teorías sobre su mecanismo de acción. Por un lado, Israeli (1995) propone que los disacáridos (en general los azúcares) reemplazan el agua estructural en las membranas después de la deshidratación y evitan el despliegue y la agregación de las proteínas por enlaces de hidrógeno con los grupos polares de estas. Por otro, Morales (2010) sugiere que el efecto protector de los disacáridos se debe a que al sustituir las moléculas de agua al interior de la célula durante el proceso de liofilización, las células no pasan de su estado de cristal líquido a la fase de gel y mantienen su estructura celular intacta, lo cual posibilita que la membrana no sufra rupturas durante el proceso de liofilización y rehidratación.

Sin embargo, según López y García (2006), para que

los disacáridos puedan proteger una bicapa líquida es necesario que se encuentren a ambos lados de la capa; de igual manera para reemplazar las moléculas de agua dentro de la célula deben estos atravesarla, lo cual se consideraría poco probable, ya que los disacáridos debido a su masa molecular son considerados agentes no penetrantes; es decir, que solo pueden ofrecer protección al exterior de la célula. Para ello, Israeli (1995) ofrece una explicación del mecanismo de penetración de los disacáridos durante el proceso de liofilización. Él postula que cuando las células comienzan a entrar en la transición de fase, la membrana se vuelve permeable y el disacárido fluye hacia el interior de las células y debido al poco tiempo antes de la congelación y el secado, así como a la gran cantidad de azúcar que entra en la célula, la cantidad pérdida con el metabolismo es extremadamente pequeña, por lo que pueden proteger de manera efectiva tanto a la membrana como a las estructuras celulares internas. Estas conclusiones las determina Israeli (1995), observando el comportamiento de células de *E. coli* (bacteria Gram-negativa) y *B. thuringiensis* (bacteria Gram-positiva) con disacáridos (trehalosa y sacarosa) como protectores para el proceso de liofilización.

En el caso de los disacáridos evaluados en este trabajo, se presenta una acción similar en las cepas bacterianas. Sin embargo se esperaría una mayor diferencia en el efecto de los disacáridos en cada microorganismo procarionta, ya que el *B. megaterium* posee una pared celular tipo Gram-positiva la cual está conformada por una capa de peptidoglicano muy gruesa (alrededor del 90 % de su estructura), diferente a las de *C. necator* que presenta una pared celular tipo Gram-negativa la cual consta de una bicapa líquida formada por una capa fina de peptidoglicano adyacente a la membrana citoplasmática constituyendo solo el 10 % de la pared celular y una capa adicional compuesta de lipopolisacárido (Madrián *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos muestran que la trehalosa 10 % ofrece protección a bacterias sin importar su pared celular, corroborando de esta manera el postulado de Israeli (1995) sobre el efecto de los disacáridos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con porcentajes de viabilidad de 92,24 % para el *B. megaterium* y de 85,33 % para el *C. necator*.

En el caso del inositol, polialcohol que según Day y Staacy (2007) sería un lioprotector efectivo para bacterias Gram-positivas, los porcentajes de viabilidad obtenidos en este trabajo fueron extremadamente bajos. Para la solución de inositol esterilizada por autoclave el resultado tiene sentido, ya que el inositol es un producto

termolábil (sensible a cambios de temperatura), por lo que la esterilización de la solución de inositol por medio de autoclave afectaría considerablemente las propiedades físicas y químicas de este, teniendo como resultado que su efecto como agente lioprotector (esterilizado por este método) sea prácticamente nulo. No obstante, este compuesto esterilizado por filtración al vacío, a pesar de que muestra mejores resultados con respecto a la solución esterilizada por autoclave, no presentó los resultados esperados de lioprotección para bacterias como sugiere la literatura; es decir, porcentajes de viabilidad cercanos al 80 % después de liofilización (Day y Staacy, 2007).

Una posible causa del pobre desempeño del inositol es que este polialcohol presenta nueve posibles estereoisómeros, de los cuales el más común y más extendido en la naturaleza es *cis*-1, 2, 3, 5, *trans*-4, 6, ciclohexanohehexol o mioinositol. Sin embargo, también se pueden encontrar en la naturaleza los isómeros naturales *scyllo*-, *muco*-, *D*-chiro- y *neo*-inositol (González Alcaraz, 1991), de los cuales no se especifica en la literatura cual es el usado como agente lioprotector y puesto que el origen y la clase de estereoisómero del inositol proporcionado para este trabajo se desconoce, no se puede saber con certeza si fue el mismo estereoisómero empleado en la literatura de referencia.

4. Conclusiones

En este trabajo se determinaron las mejores condiciones de liofilización y lioprotectores para la conservación de *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *B. megaterium* y *C. necator*. Para el *C. necator* no se encuentra mucha información sobre agentes lioprotectores y protocolos para su conservación por liofilización en la literatura; por lo que estos resultados son de gran valor. Se concluye que la trehalosa y los carbohidratos presentes en la miel de abejas muestran un muy buen desempeño como lioprotectores en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con porcentajes de viabilidad alrededor del 92 %; además ofrece una excelente protección para levaduras durante la liofilización ya que, con la adición adecuada de leche descremada, mantienen la viabilidad de las levaduras entre un 85 % y un 93 %. El proceso de liofilización implica fenómenos complejos que, incluso después de décadas de investigación, no se comprenden por completo porque cada nuevo estudio que se realiza aporta elementos para entender los mecanismos de acción de los lioprotectores y el fenómeno de la conservación por liofilización.

Referencias

- Andrade E., Canjura M. (2010). *Evaluación del efecto crioprotector de tres concentraciones de trehalosa sobre las propiedades físicas, sensoriales y microbiológicas de una mortadela emulsificada un jamón reestructurado*. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana: Zamorano, Honduras. 39 p.
- Berny J., Hennebert G. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: Effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 86: 805-815.
- Crowe J., Crowe L., Oliver A., Tsvetkova N., Wolkers W., Tablin F. (2001). The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology*, 43: 89-105.
- Crowe J., Crowe L., Chapman D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science*, 223: 701-704.
- Crowe J., Crowe L., Carpenter J., Aurell C. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem Journal*, 242: 1-10.
- Crowe L. (1985). Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 236: 289-296.
- Darbyshire B. (1974). The function of the carbohydrate units of three fungal enzymes in their resistance to dehydration. *Plant Physiology*, 54: 717-721.
- Day J.G., Stacey G. (2007). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press: New Jersey. 365 p.
- Diniz L., Bernardes P., Araujo S., Panek A., Paschoalin V. (1999). Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biotechnology and Bioengineering*, 65: 572-578.
- Gómez A., Tymczyszyn E., De Antoni G., Aníbal E. (2003). Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 1315-1320.
- González F. (1991). *Nomenclatura de química orgánica*. Murcia: Ediciones de la Universidad de Murcia. 683 p.
- Leslie S., Israeli E., Lighthart B., Crowe J., Crowe L. (1995). Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3592-3597.
- López J., Naranjo J.M., Higueta J.C., Cubitt M., Cardona C.A., Villar M. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17: 250-258.
- Luzardo M., Amalfa F., Nuñez A., Díaz S., Biondi A., Disalvo E. (2000). Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 78: 2452-2458.
- MacKenzie A.P. (1977). Comparative studies on the freeze-drying survival of various bacteria: Gram type, suspending media and freezing rate. *Developmental Biology*, 36: 263-277.
- Madrigan M., Martinko J., Parker J. (2003). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson: Madrid. 1096 p.
- Martínez A., Balcázar E., Dantán E., Folch J. (2008). Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50: 119-131.
- Morales Y., Duque E., Rodríguez O., Martínez R., Muñoz J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*, 14: 11-29.
- Morgan C., Herman N., White P., Vesey G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 183-193.
- Naranjo J.M., Posada J., Higueta J.C., Cardona C.A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 133: 38-44.
- Naranjo J.M. (2008). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. Tesis de Maestría. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia: Manizales, Colombia. 81 p.
- Pikal M., Chang L., Shepherd D., Sun J., Ouellette D., Grant K. (2005). Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94: 1427-1471.
- Polomska X., Wojtatowicz M., Zarowska B., Szoltysik M., Chrzanowska J. (2012). Freeze-Drying Preservation of Yeast Adjunct Cultures for Cheese Production. *Polish Journal of Food Nutritional Sciences*, 62: 143-150.