



Comunicación

Influencia del proceso de liofilización en la estabilidad microbiológica del yogur

Influence of lyophilization on the microbiological stability of yogurt

Geânderson **dos Santos**^{1*}, Tatiana **Pacheco Nunes**², Maria Aparecida **A. P. da Silva**²,
Amauri **Rosenthal**³, Alessandra **Almeida Castro Pagani**²

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe, Campus Glória.
Nossa Senhora da Glória, Sergipe, Brasil.

²Universidade Federal de Sergipe (UFS), Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Aracaju, Sergipe, Brasil.

³Embrapa Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, Brasil.

*Autor para correspondencia: geanderson2010@yahoo.com.br

Aceptado 14-Septiembre-2015

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la supervivencia de las bacterias ácido lácticas en el yogur antes, durante y después del proceso de liofilización con diferentes temperaturas de congelación y diferentes concentraciones de sacarosa. La elaboración del yogur tradicional y el liofilizado, fue con concentraciones de sacarosa de 0 % y 5,0 % y se emplearon temperaturas de 5, -25 y -80 °C. El análisis y cálculo de bacterias ácido lácticas se realizó mediante la técnica de disolución en placa, utilizando medio de cultivo Agar Base M17 y Agar Lactobacillus MRS, a pH 5 ajustado con ácido acético, para determinación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, respectivamente. Los resultados microbiológicos mostraron que la cantidad de UFC/g fue mayor que la requerida por la legislación durante y después de la etapa de procesamiento a las 2 temperaturas. No hubo efecto de la concentración de sacarosa en la protección o mantenimiento de la microflora del yogur. El yogur liofilizado y rehidratado elaborado en este trabajo, además de cumplir con la legislación, es también una opción para el mercado debido a la conservación por un período más largo. Se mantuvo a los microorganismos viables y en cantidad superior a 10^7 UFC/g antes, durante y después del proceso de liofilización y rehidratación.

Palabras claves: liofilización, microbiología, microestructura, yogur.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the survival of lactic acid bacteria in yogurt before, during and after the lyophilization process with different freezing temperatures and different concentrations of sucrose. The traditional preparation of yogurt and lyophilized with sucrose concentration was 0 % and 5.0 % and if use temperatures of 5, -25 and -80 °C. The analysis of lactic acid bacteria and the calculation was performed using the dissolution technique plate, culture medium using M17 Agar Base and Lactobacillus MRS Agar, besides pH 5 with acetic acid for determination of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, respectively. The microbiological results showed that the number of UFC/g was larger than that required by legislation during and after the processing step at the two temperatures. There was not effect of sucrose concentration on the protection or maintenance of yogurt microflora. The yogurt lyophilized and rehydrated elaborated in the present study, in addition to complying with the legislation, is also an option for market due to conservation for a longer period. Microorganisms remained viable and the amount exceeding 10^7 UFC/g before, during and after lyophilization and rehydration process.

Key words: lyophilization, microbiology, microstructure, yogurt.

INTRODUCCIÓN

El yogur es la leche fermentada más popular y consumida en el mundo, muy probablemente se originó en los pueblos nómadas de las regiones montañosas cerca del Mediterráneo hace miles de años; Bulgaria es el país responsable de la difusión de este producto en el mundo (Tamime y Deeth, 1980). Debido al aspecto sensorial, y en especial, a sus características funcionales y nutricionales, se ha difundido mucho durante los últimos años, sin embargo, el consumo per cápita en Brasil es todavía bajo, ya que muchas personas lo aprecian solo como un postre. Según la Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) del Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), yogur se define como los productos resultantes de la fermentación de la leche pasteurizada o esterilizada cuya fermentación se realiza con cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que pueden estar acompañados de forma complementaria con otras bacterias ácido lácticas que por su

actividad contribuyen para la determinación de las características del producto final; estos fermentos lácticos tienen que ser viables, activos y abundantes (DOU, 2000).

Aunque el yogur es una alternativa al almacenamiento de la leche, su duración es todavía relativamente corta en comparación con otros derivados lácteos, tales como algunos tipos de quesos, y la cantidad de bacterias ácido lácticas en el producto la determina. En este contexto, el secado por liofilización aparece como un proceso alternativo y eficiente para la conservación de yogur por un período más largo. La liofilización es la reducción de la concentración de agua de un producto por sublimación, esta forma de secado mantiene las características sensoriales, propiedades biológicas y nutricionales del producto seco cercanas a las del producto fresco. Otro hecho importante es que el producto de la liofilización es de fácil rehidratación, lo que permite recuperar la mayor parte del agua que se pierde durante el proceso (Ratti, 2001).

Teniendo en cuenta los hechos presentados, el objetivo de este trabajo fue evaluar la supervivencia de las bacterias ácido

lácticas en el yogur durante el proceso de liofilización bajo diferentes temperaturas de congelación y diferentes concentraciones de sacarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue desarrollado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LMA) y en el Laboratorio de Procesamiento de Productos de Origen Animal (LPPOA), del Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) de la Universidad Federal de Sergipe, en la ciudad de San Cristóbal (Sergipe, Brasil).

Elaboración del yogur tradicional

Se probaron varias formulaciones con diferentes concentraciones de sacarosa. Se seleccionaron 2 formulaciones con concentración de sacarosa de 0 % y 5,0 %; sobre las materias primas restantes se describe posteriormente.

El yogur tradicional se procesó con 2 L de leche UHT ('Ultra High Temperature'). La leche se transfirió a un homogeneizador ULTRA-TURRAX®, T 50 digital (IKA® Works, Inc., North Carolina, USA) donde se mezcló con 4,0 % de leche en polvo desnatada y 5,0 % de sacarosa (y sin sacarosa, 0 %), después de la homogeneización se transfirió a un recipiente de acero inoxidable calentándose a 95 °C durante 5 minutos para la pasteurización. Posteriormente, la leche se enfrió a 42 °C y se adicionó el inóculo mediante inoculación directa del cultivo iniciador Rich® (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda., Valinhos, São Paulo, Brasil) que contiene *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Después de la adición del inóculo se transfirió asépticamente a un recipiente estéril, y posteriormente a una incubadora DBO, Visomes Plus, modelo VR 130 (Visomes Comercial Metrológica Ltda., Cidade Dutra, São Paulo, Brasil) a temperatura 42 °C durante aproximadamente 5 horas, hasta

alcanzar el pH de la leche fermentada entre 4,5 y 4,6 unidades de pH; después se enfrió gradualmente el yogur hasta temperatura de ± 6 °C y se refrigeró a 5 °C durante 24 h, para disminuir el proceso de fermentación y que el yogur adquiriera características de sabor, olor y textura.

Elaboración del yogur liofilizado

Las muestras de yogur tradicional fueron depositadas sobre bandejas de acero inoxidable del liofilizador CHRIST, modelo Alpha 1-4 LSC plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Alemania), posteriormente se congelaron en un congelador Electrolux, modelo FE 26 y en un congelador SANYO de temperatura ultra-baja, modelo MDF-U73VC (SANYO Electric Co., Ltd., Japón) a temperatura de -25 ± 2 °C y -80 ± 2 °C durante 24 horas, en seguida, fueron ubicadas en el liofilizador que funcionó con temperatura de -37 °C en la cámara y condensación bajo vacío a presión mínima de 0,18 mbar durante 24 horas. Después, las muestras secas, se molieron durante 30 segundos y tamizaron para obtener un producto homogéneo que se colocó en bolsas (polipropileno y aluminio) que se sellaron al vacío en una selladora TecMaq®, modelo AP 500 (TecMaq®, São Paulo, Brasil). Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas. Después de 5 días de almacenamiento (temperatura ± 25 °C, humedad relativa 78 %) las muestras de yogur liofilizado fueron reconstituidas.

Reconstitución del yogur liofilizado

La rehidratación se hizo gradualmente a fin de que la textura (dureza) del producto rehidratado se aproximase a la del yogur tradicional. La textura fue medida con un texturómetro BROOKFIELD, modelo CT3 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro MA, USA) (Haully *et al.*, 2005).

Contaje de bacterias lácticas

El análisis y cálculo de bacterias lácticas se realizó mediante la técnica de disolución en placa, por duplicado, utilizando medio de cultivo Agar Base M17 y Agar Lactobacillus MRS (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) a pH 5 ajustado con ácido acético, para la determinación de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, respectivamente. En el Laboratorio de Microbiología de Alimentos las muestras fueron identificadas previamente, y la homogeneización se realizó en el propio envase. Fue retirada una alícuota de 25 g que se añadió a 225 mL de agua peptonada estéril para obtener la primera disolución. De esta se obtuvo diluciones decimales sucesivas. Después de la incubación de las placas el número de UFC/g fue entre 25 y 250. En la determinación de *S. thermophilus* las placas con medio de cultivo M17 fueron debidamente distribuidas en la incubadora para DBO (37 °C durante 48 h); y para *L. bulgaricus* las placas con medio de cultivo MRS acidificado fueron incubadas (37 °C durante 72 h) en un recipiente Gas-Pak en la incubadora para DBO en condiciones microaerófilas (FIL, 1988).

Microscopía

Las muestras de yogur liofilizado fueron analizadas en su microestructura. Se utilizó un microscopio digital Dino-Lite Plus, modelo AM313T (AnMo Electronics Corporation, Hsinchu, Taiwán), con aumento aproximado a 230X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reconstitución del yogur liofilizado

Con el objetivo de conseguir la textura (dureza) del yogur tradicional, fue realizada una rehidratación de 70 % de agua y se obtuvo una textura de 0,226 N, valor próximo a la textura

del yogur tradicional de 0,220 N. Haully *et al.* (2005) midieron dureza de 0,2052 y 0,2576 N en yogures de soya suplementados y no suplementados con oligofruktosa + inulina, respectivamente. Debido al cambio estructural del yogur durante la liofilización, este no absorbe la cantidad de agua perdida; el debilitamiento de la estructura del yogur es causado por la congelación (Rybka y Kailasapathy, 1997). Venir *et al.* (2007) afirman que las fuerzas mecánicas ejercidas por el agua en la rehidratación también causan este debilitamiento y recuperaron la resistencia modulando la cantidad de agua; estos autores para compensar las pérdidas rehidrataron el yogur liofilizado con 60, 70 y 100 % de agua y estudiaron la influencia de estas variaciones en las propiedades viscoelásticas del producto rehidratado.

Después de la liofilización de 100 g de yogur tradicional se obtuvo 18 g de yogur liofilizado. Luego de la rehidratación con 70 % de agua el producto rehidratado alcanzó aproximadamente 80 % del peso del yogur tradicional. Por lo tanto, para producir un envase de 170 g de yogur tradicional que se comercializa en el mercado brasileño serían necesarios 38,25 g de yogur en polvo.

Consideraciones generales sobre la estabilidad microbiológica

En las Normas de Identidad y Calidad de las Leches Fermentadas, de la SDA del MAPA en Brasil, se establece que es requerido un contaje mínimo de bacterias lácticas totales de 10^7 UFC/g, viables en el producto final y durante su período de validez (DOU, 2000). Los resultados microbiológicos de los análisis de los yogures (Cuadros 1 y 2) mostraron que la cantidad de colonias presentes en las placas fue mayor que la requerida por la legislación durante todas las etapas de procesamiento. Esto demostró que la liofilización es un método eficaz para mantener las características microbiológicas del yogur. De acuerdo con

Wang *et al.* (2005), el contenido de ácido láctico de la leche fermentada favorece la viabilidad de las bacterias durante la etapa de congelación, ya que el bajo pH causa cambios en las estructuras de revestimiento que ayudan a las bacterias a resistir baja temperatura.

La cantidad de bacterias del género *Streptococcus* fue siempre mayor que la del género *Lactobacillus*; esto fue debido en parte, a un desarrollo más rápido de estreptococos y su menor acción acidificante. Inicialmente los estreptococos crecen más deprisa que los lactobacilos debido a que estos últimos sintetizan factores de crecimiento (CO₂ y ácido fórmico) producidos por los estreptococos (Romero del Castillo-Shelly y Mestres-Lagarriga, 2004). En este estudio no hubo efecto de la concentración de sacarosa en la protección o mantenimiento de la microflora del yogur. En todos los tratamientos hubo notable reducción de la cantidad de bacterias ácido lácticas con respecto al producto tradicional, la reducción fue mayor en los productos liofilizados rehidratados, tanto para lactobacilos como estreptococos, y fue debido a cambios ocurridos en las especies microbianas causados por los procesos; la mayor reducción ocurrió en los lactobacilos. Heckly (1961) documentó, que entre los factores que afectan la supervivencia de microorganismos en liofilización se encuentran la tasa y método de congelación, el método de secado y extensión del mismo, las condiciones de almacenamiento y el método de reconstitución, entre otros; por otra parte, Wang *et al.* (2004) observaron en un estudio de viabilidad de bacterias ácido lácticas en leche de soya fermentada, después liofilizada y con subsecuente rehidratación y almacenamiento, que *S. thermophilus* mostró mayor porcentaje de supervivencia que *L. acidophilus*.

Bacterias lácticas del yogur sin sacarosa (0 %)

El Cuadro 1 muestra el número de bacterias ácido lácticas presentes durante todo

el proceso de liofilización del yogur sin sacarosa (0 %), donde es posible observar, una reducción de la población durante las etapas sucesivas de congelación, secado por liofilización y rehidratación (reconstitución) para las muestras sometidas a temperatura -25 y -80 °C. Gómez-Zavaglia *et al.* (2000) notaron que la resistencia de cepas de lactobacilos con alto contenido de ácidos grasos insaturados (66-70 %) disminuye con el incremento de concentraciones de ciclopropano (C19:0 cyc), y en contraste, en cepas con baja concentración de ácidos grasos insaturados (42-49 %), los incrementos en los niveles de ciclopropano fueron asociados a una mayor resistencia a la congelación-descongelación. Fonseca *et al.* (2001) han señalado que las bacterias ácido lácticas exhiben diferentes tasas de supervivencia durante la congelación y el almacenamiento congelado, dependiendo de las condiciones de procesamiento, y apreciaron que, *S. thermophilus* fue más resistente que *L. bulgaricus*, como ocurrió en este trabajo. La resistencia a la congelación y al almacenamiento congelado de *S. thermophilus* fue relacionada por Beal *et al.* (2001) a la composición de ácidos grasos de la membrana celular; asimismo, resultados de Coulibaly *et al.* (2010), indicaron que la supervivencia durante el almacenamiento y la resistencia en liofilización de especies de lactobacilos, estudiadas por estos autores, están estrechamente relacionadas a la composición de ácidos grasos de la membrana. Cabe destacar sobre la actividad enzimática intracelular, que la actividad aminopeptidasa de cepas de *Lactobacillus* es mayor y la actividad esterasa es menor cuando se compara con *S. thermophilus*. La disminución de la actividad aminopeptidasa favorece la liofilización. Y respecto a la actividad autolítica, cepas de *Lactobacillus* exhiben mayor tasa de autólisis que *S. thermophilus* (Kandil y El Soda, 2015).

La cantidad total de bacterias ácido lácticas en el yogur sometido a -80 °C, liofilizado y reconstituido, fue mayor que el

Cuadro 1.- Cantidad de bacterias lácticas del yogur durante el procesamiento sin sacarosa (0 %).

Bacterias lácticas	Condiciones del procesamiento del yogur sin sacarosa (0 %)			
	Tradicional	Congelado	Liofilizado	Reconstitución
	5 °C	-80 °C	-80 °C	-80 °C
<i>Streptococcus</i>	2,80x10 ⁹	1,28x10 ⁹	1,13x10 ⁹	8,00x10 ⁸
<i>Lactobacillus</i>	2,02x10 ⁷	8,25x10 ⁶	1,31x10 ⁶	6,00x10 ⁵
Totales	2,82x10⁹	1,28x10⁹	1,13x10⁹	8,01x10⁸
	5 °C	-25 °C	-25 °C	-25 °C
<i>Streptococcus</i>	2,80x10 ⁹	1,92x10 ⁹	9,90x10 ⁸	7,10x10 ⁸
<i>Lactobacillus</i>	2,02x10 ⁷	1,65x10 ⁷	2,18x10 ⁶	7,20x10 ⁵
Totales	2,82x10⁹	1,93x10⁹	9,92x10⁸	7,11x10⁸

Los valores son unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

número encontrado para las muestras a -25 °C; y la tendencia de los lactobacilos fue un incremento cuando fueron expuestos a temperatura de -25 °C en comparación a temperatura -80 °C, indicando que estas bacterias poseen menor resistencia a temperaturas muy bajas. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos es superior a la de los estreptococos, por tanto, temperaturas más bajas favorecerán a los estreptococos y más altas a los lactobacilos (Romero del Castillo-Shelly y Mestres-Lagarriga, 2004).

Bacterias lácticas del yogur con 5,0 % de sacarosa

El Cuadro 2 muestra el número de UFC/g de bacterias ácido lácticas del yogur con sacarosa en todo el proceso de liofilización. De manera similar a las muestras sin sacarosa, es posible apreciar una disminución en la cantidad de bacterias durante las sucesivas etapas hasta la rehidratación (reconstitución), tanto para las muestras sometidas a temperatura -25 como a -80 °C.

Venir *et al.* (2007) en el estudio del

proceso de producción de yogur liofilizado encontraron reducción en los lactobacilos y los estreptococos durante la congelación y el secado. En el análisis de la influencia de la temperatura sobre la cantidad de bacterias ácido lácticas durante la congelación, no fue posible detectar diferencias entre las temperaturas estudiadas, pero las muestras tratadas a -80 °C presentaron mayor cantidad de bacterias totales respecto a las tratadas a -25 °C; un comportamiento similar al de las muestras sin sacarosa. En el producto rehidratado (reconstituido) se observó reducción en el contenido de bacterias al comparar con el producto tradicional; mayor para lactobacilos, sin embargo, todas las muestras se encontraron con cantidades de bacterias ácido lácticas totales (UFC/g) mayores al requisito establecido en la legislación para las leches fermentadas (10⁷ UFC/g).

Algunos estudios han analizado la sensibilidad de las bacterias ácido lácticas durante el secado por liofilización, con resultados cercanos a los encontrados en este trabajo. Por ejemplo, Rybka y Kailasapathy (1997) encontraron para *L. bulgaricus* una

Cuadro 2.- Cantidad de bacterias lácticas del yogur durante el procesamiento con 5,0 % de sacarosa.

Bacterias lácticas	Condiciones del procesamiento del yogur con 5,0 % de sacarosa			
	Tradicional	Congelado	Liofilizado	Reconstitución
	5 °C	-80 °C	-80 °C	-80 °C
<i>Streptococcus</i>	2,76x10 ⁹	1,70x10 ⁹	9,20x10 ⁸	4,00x10 ⁸
<i>Lactobacillus</i>	1,26x10 ⁷	1,81x10 ⁶	1,60x10 ⁵	7,60x10 ⁴
Totales	2,82x10⁹	1,70x10⁹	9,20x10⁸	4,00x10⁸
	5 °C	-25 °C	-25 °C	-25 °C
<i>Streptococcus</i>	2,76x10 ⁹	8,80x10 ⁸	3,30x10 ⁸	1,15x10 ⁸
<i>Lactobacillus</i>	1,26x10 ⁷	1,98x10 ⁶	2,80x10 ⁵	9,00x10 ⁴
Totales	2,77x10⁹	8,82x10⁸	3,30x10⁸	1,15x10⁸

Los valores son unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

reducción de 1,2x10⁸ UFC/mL a 3x10⁵ UFC/mL y para *S. thermophilus* de 1,6x10⁹ UFC/mL a 7,6x10⁸ UFC/mL, esto indicó que *L. bulgaricus* muestra mayor mortalidad durante la liofilización que *S. thermophilus*; información que coincide con la de Kandil y El Soda (2015), quienes por medio de sus resultados revelaron que *S. thermophilus* tuvo mayor tasa de supervivencia cuando compararon con las tasas de especies de lactobacilos, y a su vez concuerda con la conclusión de Bozoğlu *et al.* (1987), quienes en el estudio de la cinética de supervivencia de bacterias ácido lácticas durante y después del proceso de liofilización, expresaron que *S. thermophilus* es más resistente a condiciones de liofilización que *L. bulgaricus*.

En relación con la adición de 5,0 % de sacarosa en los yogures liofilizados, no se apreció un efecto en la supervivencia de las bacterias ácido lácticas con relación a los yogures liofilizados 0 % sacarosa (sin sacarosa). Miao *et al.* (2008), si observaron incremento en la tolerancia de *L. rhamnosus* GG luego de la congelación y liofilización por efecto de la adición de disacáridos (trehalosa,

lactosa, maltosa, sacarosa) en concentraciones de 15 %, asegurando menores pérdidas en la viabilidad celular. El efecto varió en función del tipo de disacárido y combinaciones de estos, y fue menor cuando se utilizó sacarosa.

Microestructura de los yogures

En las Figs. 1A y 1B se ilustran las superficies microscópicas de las muestras de yogur liofilizadas sometidas a congelamiento a -25 y -80 °C, respectivamente. La percepción de mayor estructura del yogur liofilizado a -25 °C que la liofilizada a -80 °C puede ser justificada por la formación de cristales de hielo durante el congelamiento. En la muestra congelada a -25 °C, los cristales de hielo formados tienen forma puntiaguda que destruye las células y en la muestra congelada a -80 °C, forma redonda que no provoca o minimiza el daño. Coulibay *et al.* (2010) han descrito que la formación de cristales de hielo induce daño mecánico que conduce a la muerte celular durante la congelación, y en suma, la cristalización del agua conlleva a la crioconcentración de los solutos que induce cierto daño osmótico.

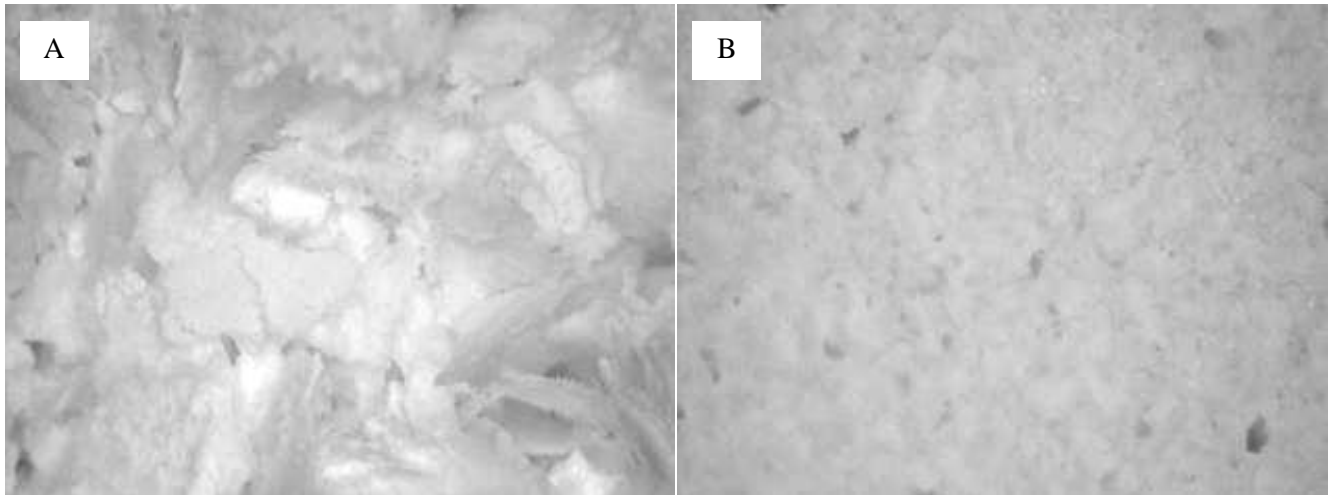


Figura 1.- Superficie microscópica de yogur liofilizado a -25 °C (A) y -80 °C (B) a \approx 230X.

CONCLUSIONES

Los yogures liofilizados rehidratados, cumplieron con el requisito de bacterias ácido lácticas totales establecido en la legislación brasileña para la leche fermentada, y se constituyen como opción de conservación. No hubo efecto de la concentración de sacarosa en la protección o mantenimiento de la microflora del yogur.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beal, C.; Fonseca, F. and Corrieu, G. 2001. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*. 84(11):2347-2356.
- Bozoğlu, T.F.; Özilgen, M. and Bakir, U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*. 9(9):531-537.
- Coulibaly, Ibourahema; Dubois-Dauphin, Robin; Destain, Jacqueline; Fauconnier, Marie-Laure; Lognay, Georges and Thonart, Philippe. 2010. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*. Article ID 625239. 9 p.
- DOU. 2000. Diário Oficial da União, Seção 1, Edição Nº 227 de 27/11/2000, páginas 109-112. Resolução Nº 5 de 13 de novembro de 2000. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) oficializa os “Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados”. Brasília, DF, Brasil: Imprensa Nacional.
- FIL. 1988. Fédération Internationale du Lait. Yaourt - Dénombrement des microorganismes caractéristiques - Technique par comptage des colonies à 37 °C. FIL standard 117A:1988.
- Fonseca, Fernanda; Béal, Catherine and Corrieu, George. 2001. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*. 43(3):189-198.
- Gómez-Zavaglia, Andrea; Disalvo, Edgardo A. and de Antoni, Graciela L. 2000. Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *Journal of Dairy Research*. 67(2):241-247.
- Haully, Maria Célia de Oliveira; Fuchs, Renata Hernandez Barros; Prudencio-Ferreira, Sandra Helena. 2005. Suplementação de

- iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista de Nutrição*. 18(5):613-622.
- Heckly, Robert J. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. In *Advances in Applied Microbiology*. Volume 3. (pp. 1-76). New York, NY, USA: Academic Press Inc.
- Kandil, S. and El Soda, M. 2015. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. *Advances in Microbiology*. 5(6):371-382.
- Miao, Song; Mills, Susan; Stanton, Catherine; Fitzgerald, Gerald F.; Roos, Yrjo and Roos, R. Paul. 2008. Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Science & Technology*. 88(1):19-30.
- Ratti, C. 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*. 49(4):311-319.
- Romero del Castillo-Shelly, Roser y Mestres-Lagarriga, Josep. 2004. *Productos lácteos*. Tecnología. España: Ediciones UPC (Universitat Politècnica de Catalunya). pp. 118, 119.
- Rybka, S. and Kailasapathy, K. 1997. Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. *Milchwissenschaft - Milk Science International*. 52(7):390-394.
- Tamime, A.Y. and Deeth, H.C. 1980. Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*. 43(12):939-977.
- Venir, Elena; Del Torre, Manuela; Stecchini, Maria Lucia; Maltini, Enrico and Di Nardo, Paolo. 2007. Preparation of freeze-dried yoghurt as a space food. *Journal of Food Engineering*. 80(2):402-407.
- Wang, Y.; Corrieu, G. and Béal, C. 2005. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science*. 88(1):21-29.
- Wang, Yi Chieh; Yu, Roch Chui and Chou, Cheng Chun. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*. 93(2):209-217.