



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

*Desarrollo de estrategias para disminuir el daño celular en
agentes de control biológico durante el proceso de secado y
su almacenamiento.*

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

IBQ Ana Laura Muñoz Celaya

TUTORES

**Dr. Leobardo Serrano Carreón
Dr. Juan Jáuregui Rincón**

ASESOR

Dra. Iliana E. Medina Ramírez

Aguascalientes, Ags., 14 de febrero 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

LB.Q. ANA LAURA MUÑOZ CELAYA,
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Muñoz:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Desarrollo de estrategias para disminuir el daño celular en agentes de control biológico durante el proceso de secado y su almacenamiento", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 8 de febrero de 2013.
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLARDO



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Estimado M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos

Por medio de la presente doy el visto bueno a la tesis de doctorado titulada "*Desarrollo de estrategias para disminuir el daño celular en agentes de control biológico durante el proceso de secado y su almacenamiento*" de la Ingeniero Bioquímico **Ana Laura Muñoz Celaya** quien es alumna regular del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Dicho trabajo ya fue revisado por un servidor y Ana Laura ya realizó los cambios propuestos.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

Cuernavaca, Mor. 6 de enero de 2013

Dr. Leobardo Serrano Carreón
Co-tutor



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

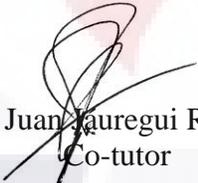
Estimado M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos

Por medio de la presente doy el visto bueno a la tesis de doctorado titulada “*Desarrollo de estrategias para disminuir el daño celular en agentes de control biológico durante el proceso de secado y su almacenamiento*” de la Ingeniero Bioquímico **Ana Laura Muñoz Celaya** quien es alumna regular de nuestro programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Dicho trabajo ya fue revisado por un servidor y Ana Laura ya realizó los cambios propuestos.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

Aguascalientes. Ags. 6 de enero de 2013



Dr. Juan Jauregui Rincón
Co-tutor

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Estimado M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos

Por medio de la presente doy el visto bueno a la tesis de doctorado titulada "*Desarrollo de estrategias para disminuir el daño celular en agentes de control biológico durante el proceso de secado y su almacenamiento*" de la Ingeniero Bioquímico **Ana Laura Muñoz Celaya** quien es alumna regular de nuestro programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Dicho trabajo ya fue revisado por una servidora y Ana Laura ya realizó los cambios propuestos.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
Aguascalientes. Ags. 6 de Febrero de 2013


Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez
Asesora



DEDICATORIA

A MIS PAPAS

Don BENJAS y Doña PILY, por su apoyo incondicional en todo momento, gracias por darme las alas y dejarme volar, sé lo difícil que fue para ustedes. Agradezco a Dios el privilegio de ser su hija, este logro es también suyo.

A MIS HERMANAS

Pily, Lily y Mayis, por ser mis mejores amigas y cómplices, porque han estado siempre a mi lado a pesar de la distancia y por las porras siempre que las necesité.

A MI CUÑADO Y SOBRINOS

Oscar gracias por ser uno más de los Muñoz Celaya, por el apoyo y por traer a nuestras vidas a esos dos terremotos **Fernando y Nicolás**, quienes con su sonrisa y un simple hola Lú me animan en los peores momentos.

A MIS MADRINAS

Ana Rosa y Catalina por el apoyo durante todo este tiempo, y porque siempre que necesité me apapacharon y animaron.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores **Dr. Leobardo Serrano** y **Dr. Juan Jáuregui** por haber confiado en mí, por haber guiado mis esfuerzos y alcanzado de manera compartida éste triunfo con paciencia y con coraje. Sobre todo por brindarme su amistad y sus consejos.

A la **Dra. Iliana E. Medina** por su apoyo durante el desarrollo de mi investigación.

Al **Dr. Enrique Galindo** por recibirme en su grupo de investigación y por los comentarios que enriquecieron mi trabajo de tesis.

Al **Dr. Jaime Vernón Carter** por los conocimientos vertidos en mi investigación, recibirme en su laboratorio y por los buenos momentos compartidos en la revisión del artículo.

A la **Dra. Angélica Meneses** por el invaluable apoyo en el montaje de la técnica de citometría y así como tu amistad.

Al personal de la **planta piloto del Instituto de Biotecnología de la UNAM**, por el apoyo técnico y humano en la elaboración de las fermentaciones y formulados: **QFB Myriam Ortiz, IQ Verónica Alviter, Biol. Mario A. Caro, Sr. Arturo Escobar** y en especial al **M. en B. Raunel Tinoco**, chaparrito gracias por tu amistad, apoyo y por las horas interminables en el secador.

A la **Dra. Ma. Soledad Córdoba** por su apoyo en el manejo del microscopio y el software ImagePro, así como por tu amistad y jalones de orejas cuando fueron necesarios.

A mis **tíos y primos**, tanto los Muñoz como los Celaya, porque por el simple hecho de preguntar ¿cómo vas? me motivaban a seguir adelante, por estar siempre en las buenas, pero sobre todo en las malas, gracias por su cariño familia muégano.

A mis amigas las biocómicas, **Sandy, Ana, Jackeline, Meche, Erandi, Maryté e Inés**, por ser las hermanas que escogí, por estar siempre presentes a pesar de la distancia y por todos estos años de amistad.

A **Core** vieja chula gracias por ser mi mejor compañía, por ser otra hermana para mí, y motivarme a salir adelante, por todos los faciales, manicures y chinazos, y por las horas

interminables de chorcha. Gracias también por traer a mi vida a otros grandes amigos: **Paulina, Aline, Janette, Toño y Daniel**, gracias por las noches de juego y risas.

A **Ibeth** por tu amistad y porque siempre me ayudaste con todos los trámites que no podía hacer por estar lejos.

A **Cessna y Less** por el tiempo que compartimos juntas y su amistad que sigue a pesar de la distancia y cambios en la vida.

A mis amigos y compañeros del grupo Galindo: **Alicia, Axel, Claus, Kike, Sergio, Diego, Wendy, Itzel, Cinthya, Faby, Abisai, Armando, Karina** por todo el apoyo y los buenos momentos compartidos.

A mis amigos del IBT y CCG **Dany, Cristina, Lorena, Pancho, Adriana, Martha Ingrid, Tabita, Mars, Abraham, Sergio A., Agustín**, chicos muchas gracias por su compañía, por las porras, por los juegos, el baile, las fiestas, los jueves pozoleros, etc., etc., etc., han hecho de estos años del doctorado una gran experiencia de vida, los quiero.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	I
Índice de Tabla	lii
Índice de Gráficas	lv
Resumen	1
Abstract	3
1.Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Manejo integrado de plagas y control biológico	7
2.1.1 Uso de <i>T. harzianum</i> como agente de control biológico	8
2.2 Pasos para el desarrollo de productos comerciales de ACB de fitopatógenos	10
2.3 Formulación	10
2.4 Conservación de microorganismos	11
2.5 Daño celular durante el proceso de secado	12
2.5.1 Daño por deshidratación	12
2.5.2 Estrés térmico	14
2.5.3 Oxidación de macromoléculas	16
2.6 Factores de daño celular en <i>Trichoderma harzianum</i> durante el secado y almacenamiento	17
2.7 Microencapsulación	19
2.8 Determinación del daño estructural en esporas de <i>T. harzianum</i>	24
3 .Hipótesis	26
4. Objetivos	27
5. Metodología	28
5.1 Determinación de la energía de activación de los agentes encapsulantes	28
5.2 Producción de esporas de <i>T. harzianum</i>	28
5.2.1 Preparación de inóculo	28
5.2.2 Medio de cultivo	29
5.2.3 Producción en cultivo sumergido de esporas	29
5.3 Evaluación del daño celular en esporas de <i>T. harzianum</i> mediante citometría de flujo	30
5.3.1 Tinción con Ioduro de propidio (IP)	30
5.3.2 Tinción con FUN 1	30

5.3.3 Cuantificación de esporas totales y esporas viables	31
5.4 Evaluación del efecto de la energía de activación y las temperaturas de proceso en la sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> después del secado	31
5.5 Evaluación del efecto de la energía de activación y las temperaturas de almacenamiento en la sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i>	32
5.5.1 Determinación de la actividad de agua (A_w)	32
5.5.2 Obtención de una curva patrón para el cálculo de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares	33
5.5.3 Determinación de ERO en esporas de <i>T. harzianum</i>	33
5.6 Evaluación de la adición de un antioxidante en la formulación de esporas de <i>T. harzianum</i> microencapsuladas mediante secado por aspersion en la sobrevivencia durante el almacenamiento	34
6. Resultados y Discusión	36
6.1 Evaluación de daño celular en esporas de <i>T. harzianum</i> mediante citometría de flujo	36
6.2 Evaluación del efecto de la energía de activación (E_a) y las temperaturas de proceso en la sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> después del secado.	39
6.3 Evaluación del efecto de la energía de activación (E_a) y las temperaturas de almacenamiento en la sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> .	46
6.3.1 Sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> en función de la concentración de ERO intracelulares	48
6.4 Evaluación de la adición de un antioxidante en la formulación de esporas de <i>T. harzianum</i> microencapsuladas mediante secado por aspersion en la sobrevivencia durante el almacenamiento	49
7. Conclusiones	51
8. Perspectivas	52
9. Glosario	53
10, Bibliografía	54
11. Anexos	61
11.1 Metodología para la determinación de la energía de activación de los materiales encapsulantes	61
11.2 Artículo	64

ÍNDICE DE TABLAS

5.1 Energía de activación de los agentes encapsulantes	28
5.2 Composición del medio de cultivo usado para la producción de esporas de <i>T. harzianum</i>	29
6.1 Diseño factorial 3 ³ para evaluar el efecto de la energía de activación y las temperaturas de proceso sobre la sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> al secado.	41
6.2 Sobrevivencia y concentración de ERO de esporas de <i>T. harzianum</i> encapsuladas (MD10-GA) y no encapsuladas durante el almacenamiento a 29°C	48

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Mecanismo por el cual la trehalosa ∇ impide la desnaturalización de la bicapa lipídica de la membrana celular al reaccionar con el agua (óvalos), propuesto por Crowe et al, (1992)	14
2.2 a) Muestra los porcentajes de sobrevivencia en función de la deshidratación con sales expresada como A_w . b) Muestra los porcentajes de sobrevivencia en función de la deshidratación a vacío expresada como A_w . En ambos casos se trabajó a 4°C	18
2.3 Curvas de secado isotérmico de diferentes materiales de pared (Perez-Alonso 2003)	23
5.1 Curva patrón de EROS para determinar la concentración de EROS intracelulares	34
6.1 Correlación entre la viabilidad de esporas de <i>Trichoderma harzianum</i> evaluada por cuenta en placa o PDA y la fluorescencia en rojo de FUN1. Los símbolos representan esporas: recién cosechadas (\square), muertas por calor húmedo (\diamond), secadas por aspersión (Δ), y (\circ) almacenadas a 29°C	36
6.2 Micrografías electrónicas de transmisión que muestran la diferencia en el número de vacuolas que se forman en esporas de <i>T. harzianum</i> , y que están relacionadas con la actividad de las esporas: a) Recién cosechadas (viabilidad \approx 80%), b) secadas por aspersión (viabilidad \approx 60%) y c) mezcla 1:1 de recién cosechados y dañados por calor húmedo (viabilidad \approx 35%). El aumento es 7000x	37
6.3 Correlación entre la viabilidad de esporas de <i>Trichoderma harzianum</i> evaluada por cuenta en placa o PDA y la fluorescencia de IP. Los símbolos representan esporas: recién cosechadas (\square), muertas por calor húmedo (\diamond), secadas por aspersión (Δ), y (\circ) almacenadas a 29°C.	38
6.4 Micrografías electrónicas de transmisión que muestran el daño de membrana en esporas de <i>T. harzianum</i> , debido a: (a) calor húmedo (viabilidad \approx 0%), (b) secado por aspersión (viabilidad \approx 15%) y (c) almacenadas a 29°C (viabilidad \approx 0%). Aumento 7000x	39
6.5. Superficies de respuestas representando el incremento en la sobrevivencia (IS) de las esporas de <i>T. harzianum</i> microencapsuladas como función de la temperatura de entrada y salida usando a) MD10 ($E_a = 29.0 \text{ kJ mol}^{-1}$); b) MD20 ($E_a = 24.0 \text{ kJ mol}^{-1}$); c) GA ($E_a = 19.0 \text{ kJ mol}^{-1}$) como matrices encapsulantes. Se muestran los valores experimentales de SS para cada punto del diseño experimental	42
6.6. Validación del modelo por medio de los valores experimentales contra estimados de el incremento de la sobrevivencia IS9 de esporas formuladas con la mezcla 1:1 de MD10 – GA ($E_a = 31.6 \text{ kJ mol}^{-1}$).	43
6.7. Morfología de las partículas de esporas de <i>T. harzianum</i> obtenidas mediante secado por aspersión con o sin matriz encapsulante a $TE = 150^\circ\text{C}$ y $TS = 90^\circ\text{C}$. a) Esporas libres, b) Microcápsulas con GA, c) Microcápsulas con MD10 y d) Microcápsulas con MD10-GA. El aumento es de 500x	45
6.8. Efecto de la energía de activación en el porcentaje de sobrevivencia (SA) de esporas de <i>T. harzianum</i> almacenadas a 4°C.	46
6.9. Efecto de la energía de activación en el porcentaje de sobrevivencia (SA) de esporas de <i>T. harzianum</i> almacenadas a 29°C	47
6.10 Sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> , almacenadas a 29°C, como función de la concentración intracelular de ERO. (\blacklozenge) esporas microencapsuladas en MD10 – GA (\blacksquare) Esporas no encapsuladas.	49
6.11 (a) Sobrevivencia de esporas de <i>T. harzianum</i> , microencapsuladas en una matriz MD10-GA con o sin la adición de antioxidante en la formulación y almacenadas a 29°C, (b) Evolución de la concentración de ERO en esporas de <i>T. harzianum</i> , microencapsuladas en una matriz MD10-GA con o sin la adición de antioxidante en la formulación y almacenadas a 29°C	50

RESUMEN

Para que un producto a base de agentes de control biológico sea competitivo a nivel comercial, se requiere de formulaciones de polvos secos que se puedan manejar y almacenar de igual forma que los pesticidas químicos. Es por eso que se busca que la formulación final sea en forma de polvos secos, que puedan ser rehidratados en agua. El método más común para obtener este tipo de formulado es el secado por aspersión,

El secado por aspersión es una operación unitaria mediante la cual una suspensión es asperjada en forma fina en una cámara de desecación entrando en contacto con una corriente de aire caliente lo que permite una desecación muy rápida. Sin embargo, esta técnica presenta el problema de que disminuye considerablemente el número de células viables obtenidas en el formulado final.

Se ha demostrado que el principal daño sufrido por las esporas de *T. harzianum* durante el secado por aspersión es debido a la temperaturas elevadas que se usan en el proceso y que durante el almacenamiento el daño sufrido por las esporas es debido a la oxidación de macromoléculas

Una estrategia empleada para la protección de microorganismos en el proceso de secado y el almacenamiento es la microencapsulación, que es un proceso mediante el cual, partículas o gotas pequeñas (núcleo) son rodeadas por una cubierta (pared) o embebidas en una matriz homogénea o heterogénea, para producir microcápsulas con diferentes propiedades funcionales.

En este proceso, el paso crítico es la selección del material que formará la pared. Se ha reportado que se puede calcular una energía de activación (E_a), mediante el análisis de las curvas de secado de los materiales encapsulantes, la cual servirá como parámetro para evaluar la efectividad de estos. Por todo lo anterior se propone que el uso de materiales con mayor E_a disminuirá el daño térmico en las esporas de *T. harzianum* durante el proceso de secado, e incrementará la sobrevivencia en el almacenamiento disminuyendo los fenómenos de oxidación.

En este trabajo se evaluó el efecto de la E_a del material encapsulante y de las temperaturas de entrada (TE) y salida (TS) del aire, durante el secado, sobre el daño térmico de

las esporas de *Trichoderma harzianum*, así como, el efecto de la Ea en los fenómenos de oxidación que dañan a las esporas durante el almacenamiento.

En las formulaciones se fijó la concentración del material encapsulante en 20% (w/v) y la de esporas en 1×10^8 esp/ml y las temperaturas de proceso utilizadas fueron: TE = 150, 135 y 120 °C y TS: 90, 80 y 70 °C. Se determinó la sobrevivencia después del secado así como la sobrevivencia en el almacenamiento a 4 y 29°C.

Los valores de Ea obtenidos fueron 31.6 kJ/mol para la mezcla 1:1 de MD10-GA, 29.03 kJ/mol para MD10, 23.94 kJ/mol para MD20, y 19.21 kJ/mol para GA. Se obtuvo un modelo del efecto de Ea, TE y TS en la sobrevivencia al proceso de secado, de acuerdo a este modelo, los tres factores tienen un efecto sobre la sobrevivencia. Resulto evidente que la combinación de alta Ea y altas temperaturas de proceso fue la que proporcionó la mayor resistencia, ya que el uso de la mezcla 1:1 de MD10-GA junto con las TE= 150°C y TS=90°C permitió incrementar 11 veces la sobrevivencia en las esporas con respecto a las no encapsuladas y 330 veces en el almacenamiento a 4°C por 8 semanas.

La evaluación de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares permitió determinar que existe una relación inversa entre esta y la sobrevivencia de las esporas en el almacenamiento, así como que al alcanzar concentraciones de ERO mayores a 6nM por 10^6 células la viabilidad de las esporas se reduce significativamente.

ABSTRACT

In order to produce a commercially competitive product based on biological control agents it is required of dry dust formulations that can be handled and stored similarly that the chemical pesticides. It is why one looks for final formulation in form of dry dust, that can be dissolved in water. Spray drying is the way to obtain these formulations,

Spray drying is a unitary operation in which a suspension is sprinkled in fine form in to a drying camera making contact with a hot airflow that allowa a drying. However, this technique presents the problem that the viable cells in the final formulation are considerably low.

There has been demonstrated that the principal damage suffered by the *T. harzianum* spores trough the drying process is due to high temperatures that are used and that during the storage the damage suffered by the spores is due to the macromolecules oxidation.

Microencapsulation is a strategy used to protect microorganisms trough drying process and to extended its shelf life. In this process, particles or droplets (core) are surrounded by a shell (wall) or embedded in a homogeneous or heterogeneous matrix to produce microcapsules with different functional properties

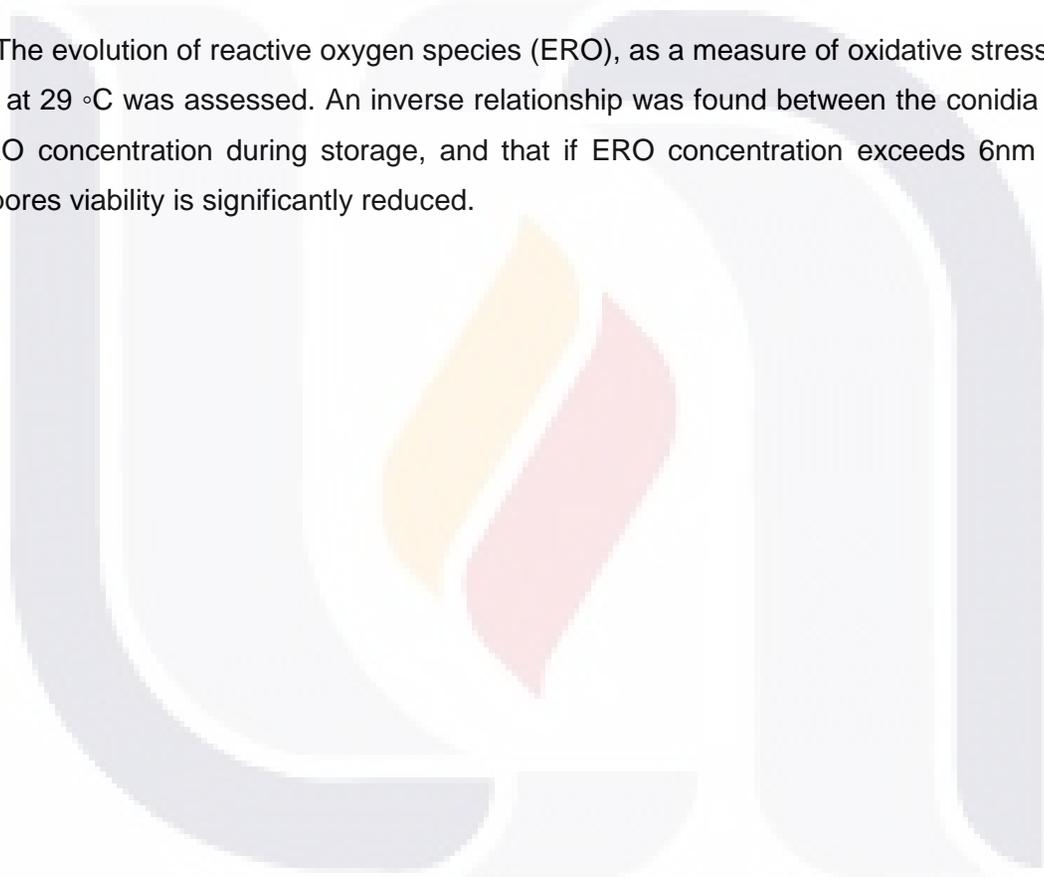
Microencapsulation´s critical step is the wall material selection. It has been proposed that an activation energy (E_a) can be calculated, by analyzing drying curves from the encapsulating materials that can be used as a parameter for evaluating the effectiveness of these. For all that its proposes that the materials with highest E_a will reduce the thermal damage in *T. harzianum* spores in the drying process, and increase the survival in the storage diminishing

In this work, the effect of spray-drying inlet (TE) and outlet (TO) air temperatures, and the activation energy (E_a) of the biopolymers on the survival of *T. harzianum* conidia was evaluated; and also the effect of the E_a in the macromolecules oxidation at storage.

In the formulations wall material concentration was set at 20% (w / v) and cell concentration was 1×10^8 spore/ml. The process temperatures used were: TE = 150, 135 and 120°C and TS = 90, 80 and 70°C. Survival was determined after drying. Survival was also evaluated after 12 weeks of storage at 4 and 29°C.

Ea values obtained were 31.6 kJ/mol for the 1:1 mixture of MD10-GA, 29.3 kJ/mol for MD10, 23.94 kJ/mol for MD20, and 19.21 kJ/mol for GA. A mathematical model for effect of Ea, TE and TS in survival to drying was calculated; the model show that the three factors have an effect on survival; and it was evident that the combination of high process temperatures and high Ea would provided the highest resistance to drying. The use of the 1:1 mixture of MD10-GA and TE = 150 ° C, TS = 90 ° C allowed to increase 11 times the survival after drying the spores, with respect to the non-encapsulated, and 330 times in storage at 4C° for 8 weeks.

The evolution of reactive oxygen species (ERO), as a measure of oxidative stress, during storage at 29 °C was assessed. An inverse relationship was found between the conidia survival and ERO concentration during storage, and that if ERO concentration exceeds 6nm per 10⁶ cells; spores viability is significantly reduced.



1. INTRODUCCION

Desde el momento en el que el hombre comenzó a depender de la agricultura para sustentar su forma de vida, se ha enfrentado ante el reto de controlar las plagas y enfermedades que atacan a sus cultivos, ya que esto representa la mayor parte de la pérdidas económicas en esta área; por lo tanto, a la par del desarrollo en las técnicas de cultivo, se han desarrollado técnicas de control de plagas, las cuales, tradicionalmente hacen uso de pesticidas químicos que atacan a un amplio espectro de fitopatógenos. Sin embargo, en el intento de aumentar los rendimientos se ha hecho uso indiscriminado de ellos lo que ocasiona efectos negativos en el medio ambiente y en la salud de los consumidores, además de que las especies fitopatógenas terminan por desarrollar resistencia a ellos.

En las últimas décadas al buscar métodos alternativos para el control de plagas, se han logrado identificar antagonistas de origen biológico para reemplazar a los agentes químicos, los cuales han sido llamados **agentes de control biológico (ACB)**, entre estos se encuentran varias especies de insectos, bacterias y hongos.

Entre los microorganismos que han sido identificados como antagonistas de diversos fitopatógenos, se encuentran varias especies del género *Trichoderma*. Aislados de este género han sido utilizados para combatir diferentes enfermedades en cultivos de cebolla, frijol, zanahoria, fresa, lechuga, maíz, vid, ciruela, manzana y algodón; las cuales son causadas por diferentes especies de hongos fitopatógenos como: *Botrytis*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, entre otros (Chet, 1987; Wang et al., 2005).

Los aislados de *Trichoderma* han resultado excelentes candidatos para usarse como agentes de control biológico, debido a que es un género que se localiza en suelos de todo el mundo, y que se ha aislado a partir de suelo, madera en descomposición y otras formas de materia orgánica y por lo tanto son capaces de crecer en sustratos de bajo costo y alta disponibilidad lo que aumenta los rendimientos y por lo tanto la ganancia económica al producirlos masivamente (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Howell, 2003).

En la actualidad se sabe que las especies del género *Trichoderma* utilizadas para el control de patógenos, pueden presentar diferentes mecanismos para funcionar como antagonistas y de estos se han descrito de manera completa: la producción de antibióticos, el

micoparasitismo, así como, la competencia por espacio y nutrientes con el parásito; sin embargo el principal mecanismo utilizado por estos microorganismos es el micoparasitismo. (Harman et al, 2004; Howell 2003).

Para poder utilizar un organismo como agente de control biológico se requiere que este tenga una estructura de propagación que le permita desarrollarse y resistir de manera eficiente los cambios ambientales a los que se vea sometido; las especies de *Trichoderma* desarrollan tres tipos de propágulos que son: micelio, clamidosporas y conidios (Papavizas, 1985); de los cuales los conidios o esporas son la estructura natural de resistencia a condiciones ambientales adversas, como aquellas que se presentan durante las operaciones de acondicionamiento para la obtención de formulaciones que serán utilizadas en campo (Jin et al, 1991).

Aun cuando en la actualidad se han desarrollado procesos de fermentación mediante los cuales se logra la obtención de concentraciones altas de esporas de *Trichoderma harzianum* con viabilidad elevada, al momento de someter el material biológico a las operaciones de acondicionamiento para preservarlos y elevar su vida de anaquel y efectividad; la concentración de células viables se ve notablemente disminuida, y por lo tanto se da una disminución en los rendimientos y por lo tanto en los costos de producción de un formulado atractivo para ser comercializado (Fernández-Sandoval et al, 2012).

La formulación es uno de los aspectos más importantes en lo que se refiere a la obtención de agentes de control biológico viables y con larga vida de anaquel, ya que afecta de manera importante el funcionamiento de los mismos (Fravel, 2005). En general el método más socorrido para la preservación de los microorganismos es el de secado, ya que permite mayor estabilidad, mejor manejo y capacidad de almacenamiento y por lo tanto es el método más utilizado para la obtención de formulados, pero esta operación genera daños en las células sometidas al mismo (Morgan et al, 2006).

Se ha logrado establecer que en el secado de esporas de *T. harzianum* el daño principal es el térmico que se produce debido a las temperaturas de entrada y salida del secador, y que la deshidratación por sí misma no afecta la viabilidad de las esporas de *T. harzianum*, mientras que la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento se debe principalmente a la oxidación de macromoléculas, por lo que es necesario el desarrollo de formulaciones que permitan disminuir el daño celular que ocasiona el proceso de secado (Fernández-Sandoval et al, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1 MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS Y CONTROL BIOLÓGICO

Desde el momento en el que el hombre comenzó a depender de la agricultura para sustentar su forma de vida, se ha enfrentado ante el reto de controlar las plagas y enfermedades que atacan a sus cultivos, ya que esto representa la mayor parte de las pérdidas económicas en esta área. Tan solo en EUA, se destinan alrededor de 26,800 millones de dólares para el combate a plagas, el cual de manera común se hace a través de pesticidas químicos que presentan una alta efectividad.

Sin embargo, el uso indiscriminado de este tipo de sustancias ha ocasionado alteraciones en el equilibrio ecológico de los campos de cultivo, ya que en su mayoría no son biodegradables y por lo tanto se acumulan en el suelo; lo que ocasiona que el suelo se vuelva tóxico para el cultivo. Se presenta también el problema de la generación de resistencia en las plagas, esto conlleva a que su uso resulte inefectivo. Por último, los pesticidas químicos al ser absorbidos por la planta y ser ingeridos por el consumidor, ocasionan problemas graves de intoxicación (Hokkanen, 2007).

Por lo anterior, se comenzó la búsqueda de estrategias alternativas para combatir a las plagas buscando disminuir al mínimo los efectos negativos al ecosistema, es decir, dando prioridad al uso de elementos naturales y considerando los aspectos toxicológicos, ecológicos y económicos que influyen en el control de plagas. Se busca además que estas estrategias sean viables a largo plazo, lo que se conoce como **manejo integrado de plagas**. El cual, combina el uso de variedades de plantas resistentes a los patógenos, con el control químico (uso de hormonas y feromonas) y uso de control biológico para combatir de manera eficiente a las plagas.

El **control biológico** se refiere al uso de organismos que son enemigos naturales de los patógenos, o algún metabolito producido por ellos, para reducir o eliminar el desarrollo de plagas y enfermedades agrícolas (Viterbo et al., 2002). Los microorganismos utilizados en el control biológico incluyen bacterias, hongos, nemátodos y virus que tienen amplio rango de acción sobre fitopatógenos y son llamados **agentes de control biológico**. Constantemente se están aislando cepas nuevas con actividad antagónica, además de que se generan nuevas cepas con mayor actividad antagonista por medio de recombinación genética (Charnley, 1991).

Aun cuando el uso de productos de control biológico en el campo incrementa constantemente, en la actualidad estos productos solo representan alrededor del 1% de la ventas de plaguicidas agrícolas (Fravel, 2005). Aunque el uso de agentes de control biológico ha despertado gran interés, al ofrecer una alternativa distinta en el manejo de plagas, en comparación a los mecanismos usados por los diferentes pesticidas químicos, es necesario el desarrollo de productos comerciales con mayor competitividad y estabilidad.

En general el uso de agentes de control biológico en campo se ha enfocado a cultivos en los cuales no se puede hacer uso de control químico debido a que se requiere lograr un producto de alta calidad que será utilizado como alimento y que pueda ser certificado como inocuo. Tal es el caso de los productos que serán certificados como orgánicos y que en la actualidad son muy solicitados en ciertos sectores de la población. De igual forma se hace uso de los agentes de control biológico combinándolos con dosis bajas de pesticidas para reducir la resistencia que los fitopatógenos pueden desarrollar a estos últimos (Fravel, 2005). El bajo uso de los agentes de control de biológico se debe a que el mecanismo de acción de este tipo de productos no son conocidos por los agricultores, además de que se subestima la capacidad de los agentes de control biológico para eliminar a los fitopatógenos y el alto costo de producción (Fravel, 2005).

2.1.1 Uso de *T. harzianum* como agente de control biológico

Los productos utilizados en el control biológico que son elaborados a base de hongos no solo cumplen la función de actuar como antagonistas de otros hongos e insectos, sino que también presentan la capacidad de inducir el crecimiento de las plantas que se están cultivando. (Jenkins y Grzywacz, 2000)

Diferentes especies de *Trichoderma* han sido utilizadas de forma efectiva para combatir plagas de varios hongos fitopatógenos, entre los cuales están *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Phytm*, *Phytophthora* y *Fusarium*, sobre muchos cultivos (Fravel, 2005; Batta, 2004). Los hongos de esta especie actúan como hiperparásitos competitivos, ya que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular encontrados en sus hospederos, entre los que se encuentran desintegración del citoplasma, granulación, vacuolización y lisis celular (Ezzyyani *et al*, 2004).

Las especies de *Trichoderma* son los organismos más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, puesto que presentan características que los hacen candidatos ideales para esta tarea, como su alta adaptabilidad e inocuidad a plantas superiores (Papavizas et al, 1982). Los organismos del género *Trichoderma* hacen uso de tres mecanismos para atacar a los fitopatógenos, y estos son: producción de antibióticos de naturaleza volátil o no volátil, competencia directa por el espacio y nutrientes y parasitismo directo sobre los hongos fitopatógenos. (Yedida et al, 1999, Harman et al, 2004)

En el caso específico de *T. harzianum* para poder actuar como micoparásito, esta especie produce enzimas que degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos como son: β -1,3-glucanasas, quitinasas, proteasas y celulasas (Herrera-López et al, 1999; Sid Ahmed et al, 2000); además produce antibióticos como lactonas, isonitrilos, poliquétidos, peptaiboles, entre otros (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

La especie *Trichoderma* produce tres propágulos: micelio, clamidiosporas y esporas; de ellas el micelio es la forma mediante la cual estos organismos realizan su acción antagónica sobre el patógeno, pero presenta el inconveniente de que es poco resistente a las operaciones necesarias para el acondicionamiento, por lo que es poco práctico utilizarlas con este propósito. Las clamidiosporas surgen de la modificación de segmentos de hifas producidas asexualmente, que requieren un mayor tiempo de producción y maduración, y que aun cuando son capaces de sobrevivir en el suelo por periodos largos de tiempo, solo el 8% resiste el proceso de secado (Papavizas et al, 1984; Agosin y Aguilera, 1998).

Los conidios o esporas son la estructura de resistencia que de manera natural genera el hongo al encontrarse en condiciones ambientales adversas, requieren menos tiempo de producción para obtener concentraciones más altas que las obtenidas en la producción de clamidiosporas, y presentan la gran ventaja de poseer una mayor resistencia al proceso de secado (Jin et al, 1991). A partir de todo esto es sencillo deducir que los conidios son la estructura más deseable para ser utilizada en la formulación de productos para control biológico, ya que se les puede dar un mejor manejo y acondicionamiento; además de que se adaptarán fácilmente a las condiciones ambientales en las que sean aplicados.

De acuerdo con Agosin y Aguilera (1998) las características indispensables para que un agente de control biológico con base en esporas de *Trichoderma* sea económicamente viable son:

1. Un sistema de producción eficiente ($>1 \times 10^7$ esp/ml).
2. Una relación esporas/micelio elevada.
3. Resistencia a las operaciones de acondicionamiento, en particular al secado.
4. Presentar una alta estabilidad y vida de anaquel del producto final, sin refrigerar.
5. Capacidad de soportar cambios ambientales de temperatura, deshidratación y humedad relativa que le permitan establecerse en el suelo.
6. Eficacia consistente de lote a lote de producción.

2.2 PASOS PARA EL DESARROLLO DE PRODUCTOS COMERCIALES DE ACB DE FITOPATÓGENOS

1. Obtención y aislamiento de antagonistas.- Obtención de cultivos puros.
2. Selección de antagonistas.- Ensayos *in vitro* e *in vivo*
3. Tecnología de producción y escalamiento del proceso
4. Formulación
5. Registro y comercialización

Aun cuando cada paso es importante para el desarrollo del producto, la tecnología de producción, escalamiento del proceso y la formulación son los pasos críticos en lo que a rendimiento del proceso se refiere, ya que de estos dependerá la cantidad y calidad obtenida de conidios en el producto comercial. En el caso específico de *T. harzianum* se han desarrollado procesos de obtención de conidios en los que se logra producir hasta 5.4×10^8 conidio ml^{-1} , con una viabilidad hasta del 60%. Pero aún no se han desarrollado procesos de formulación que permitan mantener los mismos niveles de viabilidad después del acondicionamiento.

2.3 FORMULACIÓN

Aun cuando se ha demostrado que los agentes de control biológico tienen un gran potencial en contra de fitopatógenos protegiendo diversos cultivos agrícolas; es necesario que sean formulados y acondicionados para la obtención de productos capaces de ser almacenados, distribuidos y aplicados dentro del mercado agrícola. La formulación puede

afectar aspectos de la función del agente de control biológico, como la vida de anaquel y efectividad (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Hasta la fecha se han empleado varios métodos para formular y liberar agentes de control biológico, entre estos se incluyen los medios líquidos, sin embargo, estos formulados son voluminosos, difíciles de transportar y de baja estabilidad biológica, por lo que se han descartado para uso comercial. Por otra parte las formulaciones sólidas deshidratadas no presentan dichas desventajas y son las más utilizadas para la formulación de esporas de hongos antagonistas (Fravel, 2005).

Uno de los factores limitantes en el uso de productos microbianos de control biológico es la vida de anaquel, la cual se refiere al periodo de tiempo durante el cual los propágulos del agente microbiano son capaces de mantenerse viables e infectivos. Para poder competir con los productos de control químico, la vida de anaquel de los productos biológicos deberá ser tan larga como sea posible y, estos no deberían requerir refrigeración o tratamientos especiales. Se ha sugerido que el producto deberá tener una vida de anaquel de por lo menos 1 a 2 años, a temperatura ambiente, para ser comercialmente aceptable (Pedreschi y Aguilera, 1997; Abadías et al., 2000).

Las formulaciones que permiten a un agente de control biológico encontrarse en un estado de baja actividad metabólica hacen al agente más tolerante a diferentes tipos de estrés ambiental, tales como cambios bruscos de temperatura y humedad, y por lo tanto se aumenta su vida de anaquel (Elzein et al., 2004). Así, la conservación del agente de control biológico depende del éxito con que se logre una reducción de su actividad metabólica mediante las operaciones de acondicionamiento pero minimizando los daños debidos a la temperatura y a una gran remoción de agua, en conjunto con optimizar las condiciones de almacenamiento (Horaczek y Viemstein, 2004b).

2.4 CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

La conservación de microorganismos para aplicaciones comerciales y de laboratorio por medio de secado ha sido practicada desde comienzos del siglo XX (Aguilera y Karel, 1997). Una gran variedad de microorganismos son deshidratados para conservar sus propiedades biológicas, como por ejemplo, levaduras para la panificación, cultivos utilizados en

fermentaciones comerciales y agentes de control biológico (Teixeira, et al., 1995; Bayrock y Ingledew, 1997; Horaczek y Viemstein, 2004a). La liofilización, el secado por aspersion o por lecho fluidizado son las metodologías de deshidratación, más utilizadas para preservar alimentos, productos agrícolas y farmacéuticos, entre otros (Teixeira et al, 1995; Morgan, et al, 2006). Sin embargo, un problema que se presenta de manera general en el secado de microorganismos es la obtención de una baja viabilidad que depende de las condiciones de operación, como temperatura de secado y deshidratación producida.

La liofilización es el método más usado para la preservación de colecciones de cultivos. Durante este proceso el producto se deseca congelándolo primero y sublimando después el agua. Sin embargo, no se utiliza ampliamente para acondicionar agentes de control biológico debido a que eleva los costos de producción de manera considerable y se requiere de mucho tiempo para deshidratar el producto, por lo tanto no es factible su uso a nivel industrial (Morgan et al., 2006). Por otro lado, mediante el secado se pueden producir grandes cantidades de material deshidratado a menor costo y menor tiempo que con la liofilización. El secado por lecho fluidizado usa un flujo ascendente de aire caliente que es forzado a través de un lecho de sólidos de forma tal que los sólidos quedan suspendidos en el aire y así son deshidratados (Morgan et al., 2006); mientras que en el secado por aspersion, una suspensión es asperjada en forma fina en una cámara de desecación entrando en contacto con una corriente de aire caliente lo que permite una desecación muy rápida (Perry y Green, 1997).

2.5 DAÑO CELULAR DURANTE EL PROCESO DE SECADO

Tres son los factores principales que provocan daño celular durante el secado: la deshidratación, la temperatura (estrés térmico) y la oxidación de macromoléculas (Bayrock y Ingledew, 1997).

2.5.1 Daño por deshidratación

La deshidratación es la eliminación de agua de un material por diferentes mecanismos, como la evaporación en el proceso de secado, la sublimación en la liofilización, la adsorción de agua por algunos solutos en la osmosis, entre otros. El parámetro más adecuado para expresar el grado de deshidratación de un producto es la actividad de agua (A_w). La actividad de agua está definida como la relación entre la presión de vapor de agua en un material y la presión de

vapor de agua pura a la misma temperatura. La A_w es un parámetro mucho más determinante de la calidad y estabilidad de un producto biológico que la cantidad total de agua presente (Fennema, 1996), ya que se refiere a el agua disponible, desde el punto de vista termodinámico, para efectuar reacciones biológicas (Grant, 2004).

La deshidratación es, generalmente, el factor de mayor peso en el daño celular durante el proceso de secado (Jin et al., 1996; Bayrock y Ingledew, 1997). Generalmente se acepta que el daño por deshidratación ocurre primero en la membrana, lo cual constituye la principal causa de inactivación de microorganismos debido a la remoción de moléculas de agua de las moléculas de fosfolípidos y proteínas de membrana (Lieveense y Van't Riet, 1993).

Durante la deshidratación, la integridad funcional y estructural de las membranas biológicas se daña irreversiblemente, ya que al rehidratarlas se provoca la fusión entre vesículas y redistribución de partículas intermembranales, como proteínas y lípidos (Jin et al., 1991). Además existe una pérdida de viabilidad inherente, la cual se ha atribuido a alteraciones en proteínas intracelulares, debido a que la deshidratación induce interacciones proteína-proteína que pueden provocar cambios irreversibles en su conformación; en tanto que, en enzimas provoca una pérdida de su actividad (Crowe et al., 1996).

La desestabilización de membranas durante la deshidratación se debe principalmente a la fusión y transición de fase de los lípidos (Crowe et al., 2002). La fusión de membranas puede ser observada con microscopía electrónica cuando éstas son deshidratadas sin azúcares; también es posible apreciar la prevención de este proceso cuando se deshidratan en presencia de sacarosa o trehalosa (Crowe y Crowe, 1982; Crowe et al., 1998). La transición de fase de lípidos es promovida por la remoción del agua ligada por puentes de hidrógeno a las regiones hidrofílicas de los fosfolípidos de membrana, lo que incrementa las interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas adyacentes; ya que, la distancia entre ellos se reduce. Esto causa un incremento en la temperatura de transición de fase (T_m) de los lípidos de membrana y, por tanto, su transición a la fase de gel a temperatura ambiente. Después de la rehidratación, las membranas deshidratadas, que están en fase de gel, experimentan una transición a líquido cristalino. Como la membrana cambia de fase hay regiones con defectos de unión en la bicapa lipídica, lo que resulta en la pérdida de la integridad de la membrana (Leslie et al., 1995; Billi y Potts, 2002).

Sin embargo, la adición de un disacárido como la trehalosa antes de secar, ocasiona que la T_m de los lípidos de membrana disminuya al reemplazar el agua entre las cabezas de los fosfolípidos, previniendo la transición de fase y su desarreglo después de la rehidratación (Chen et al., 2000). Así, las membranas estarán en fase de líquido cristalino a temperatura ambiente, incluso las deshidratadas, y no pasarán por la transición de fase durante la rehidratación esto se esquematiza en la figura 2.1 (Crowe et al., 1992).

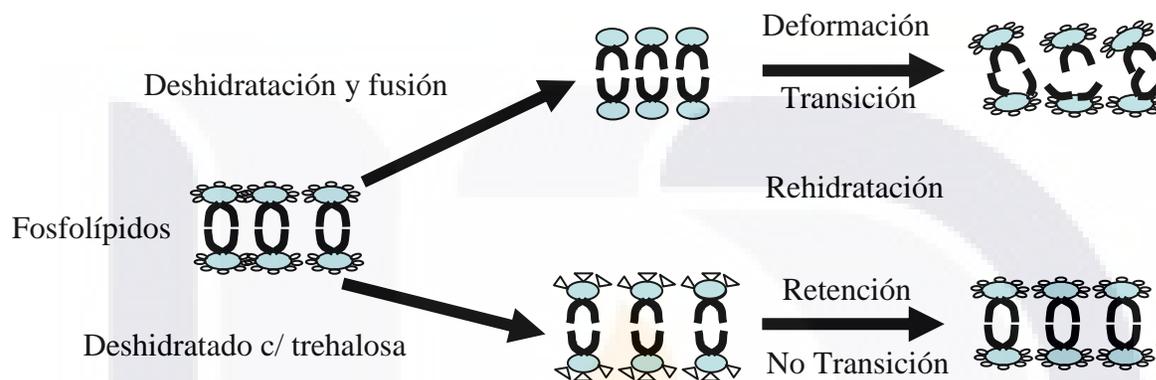


Figura 2.1 Mecanismo por el cual la trehalosa ∇ impide la desnaturalización de la bicapa lipídica de la membrana celular al reaccionar con el agua (óvalos), propuesto por Crowe et al, (1992)

De manera general las células conservadas a A_w entre 0.4 a 0.7 tienen mayor vida de anaquel, que aquéllas almacenadas a A_w más bajas o más elevadas que éstas (Potts, 1994). En este rango de A_w , las células presentan muy baja actividad metabólica y se incrementa la estabilidad de proteínas y lípidos de membrana o pared celular debido a la interacción que presentan estas moléculas con algunos compuestos como la trehalosa u otros azúcares, los cuales estabilizan las membranas (Crowe et al., 1992).

2.5.2 Estrés térmico

La temperatura tiene un impacto importante sobre la viabilidad de los microorganismos. La exposición a altas temperaturas por largos periodos de tiempo, es extremadamente perjudicial para las enzimas no termoestables, ya que cambian su configuración espacial, lo que las hace inactivas y detiene múltiples vías metabólicas indispensables para la célula (Hutter et al, 1995). Asimismo, se presenta una desnaturalización de proteínas citosólicas y de membrana, rompiendo el equilibrio osmótico y ocasionando finalmente la muerte celular.

La velocidad de muerte celular (relacionada al estrés térmico) depende de la resistencia intrínseca del microorganismo (relacionada con su energía de inactivación), de la temperatura y del tiempo que es sometido a dicha temperatura. Para la mayoría de las reacciones químicas, incluyendo reacciones enzimáticas, de crecimiento y muerte celular, se ha encontrado que la constante de velocidad (k) depende de la temperatura (T) y se ajusta a la ecuación de Arrhenius (Ec 1)

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (\text{Ec 1})$$

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (\text{Ec 2})$$

Donde k_0 es el factor de frecuencia o constante de Arrhenius y E_a es la energía de activación de la reacción, que se define como la energía requerida para que se lleve a cabo una reacción, en este caso la muerte celular (Perry y Green, 1997).

A través de esta ecuación se puede calcular la energía de inactivación de un microorganismo conociendo las constantes de velocidad de muerte térmica a diferentes temperaturas y tomando el logaritmo natural de la expresión de Arrhenius (Ec. 2).

En el caso de *T. harzianum*, el medio de cultivo en el cual se producen las esporas tiene un gran impacto en la resistencia de las esporas a diferentes tipos de estrés, incluyendo el térmico; esporas producidas en medio sólido presentaron una pared celular gruesa además de pocos organelos celulares. Por el contrario, esporas producidas en medio sumergido en cultivo por lote presentaron más organelos y una delgada pared celular, siendo menos resistentes a la desecación, radiación y a otras condiciones ambientales, debido probablemente al grosor de su pared celular que es la primera estructura en contacto con el ambiente. Así, dependiendo la forma en que se produzcan estas esporas, ya sea en estado sólido o líquido, se presentará una morfología, la cual modulará su resistencia a distintas condiciones ambientales (Muñoz et al, 1995). Por otro lado se ha demostrado que el valor de la energía de inactivación de conidios de *T. harzianum* ($39.0 \text{ kcal mol}^{-1}$) es menor a la mitad de energía de inactivación de esporas de microorganismos termorresistentes, y por lo tanto son mucho más sensibles al estrés térmico (Fernández, 2006).

La actividad de agua también juega un papel muy importante en la termorresistencia de las células. Se ha reportado que la actividad de agua del medio de producción, del medio de calentamiento (donde se lleva a cabo el tratamiento térmico) y del medio de recuperación tiene

un considerable efecto en la resistencia de las esporas al tratamiento térmico. Diversos estudios demuestran que la termoestabilidad de las células también depende de factores como: la resistencia intrínseca del microorganismo, la actividad de agua del medio de cultivo en la que son producidas, las condiciones de estrés a las que son sometidas durante el cultivo, e incluso, la concentración intracelular de trehalosa, como carbohidrato de reserva y que se ha relacionado con la termorresistencia (Pedreshi et al., 1997; Blaszyk et al., 1998; Coroller et al., 2001).

2.5.3 Oxidación de macromoléculas

El oxígeno es una molécula importante para llevar a cabo diversos procesos biológicos, actúa principalmente durante el proceso de respiración celular aceptando 4 electrones y reduciéndose hasta formar agua, sin embargo, durante este proceso también se producen especies químicas por la reducción incompleta del oxígeno y en conjunto son llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO). Casi todas las clases de biomoléculas incluyendo DNA, proteínas y lípidos, pueden ser atacadas por radicales libres, pero los lípidos son probablemente los más susceptibles. La membrana celular es rica en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son fácilmente atacados por radicales de oxígeno (Kohen y Nyska, 2002; Zhonghu et al., 2003).

En sistemas biológicos los aldehídos son siempre producidos cuando los hidroperóxidos de lípidos se rompen, por lo que es de interés identificar y medir estos compuestos como un índice del grado de oxidación de lípidos (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Al contrario de las especies reactivas de oxígeno, los aldehídos son de una vida media más larga y pueden por lo tanto difundir de su sitio de origen y reaccionar y atacar sitios o blancos intracelulares, actuando como "segundos mensajeros tóxicos" de la compleja cadena de reacciones que son iniciadas, si los ácidos grasos poli-insaturados de la bicapa membranal son convertidos a hidroperóxidos de lípidos. Entre los muchos aldehídos que se pueden formar durante la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados por sus efectos dañinos dentro de las células y tejidos, son malondialdehído y los 4-hidroxi-alquenos, en particular 4-hidroxi-nonenal y 4-hidroxi-hexenal (Esterbauer et al., 1991).

El mecanismo de la oxidación ocurre principalmente posterior al secado y determina la vida de anaquel del material biológico que se ha secado (Fernández-Sandoval et al., 2012).

Este proceso de oxidación ocasionado por el proceso de secado (temperatura, actividad de agua de salida), da inicio con el ataque a los fosfolípidos de la membrana o pared celular, con la formación de radicales libres y malondialdehído, ocasionando un cambio en la relación de ácidos grasos insaturados / saturados por una peroxidación, lo que afecta directamente la permeabilidad de la misma y ocasiona la disminución de la viabilidad del microorganismo.

El agua puede actuar como antioxidante a baja A_w por hidratación de trazas de iones metálicos, formando enlaces de hidrógeno con hidroperóxidos, y promoviendo recombinaciones de radicales libres, sin embargo, también puede actuar como promotor de la oxidación a altos valores de A_w debido a que promueve la movilidad de moléculas que pueden desencadenar la oxidación dentro de la célula, la disolución de precipitados catalíticos y al aumento de nuevas superficies catalíticas (Maltini et al., 2003).

Se sugiere que la oxidación de macromoléculas además de ser una función del tiempo, depende del nivel de deshidratación o la disponibilidad del agua en las células o material almacenado. Como es reportado por Champagne et al. (1991) la remoción de agua a altos niveles en las estructuras celulares puede exponer superficies, o espacios entre éstas, al oxígeno causando degradación oxidativa de proteínas y compuestos celulares.

2.6 FACTORES DE DAÑO CELULAR EN *T. harzianum* DURANTE EL SECADO Y ALMACENAMIENTO

En estudios realizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM se observó que la pérdida de viabilidad de las esporas de *T. harzianum* después del proceso de secado es función directa de la temperatura de entrada y salida del aire en el secador.

En la figura 2.2a se muestra como al deshidratar lentamente esporas de *T. harzianum*, haciendo uso de sales que mantienen diferentes valores de actividad de agua, no se observó diferencia significativa en el porcentaje de células viables después de 15 días de secado. De igual manera, en la figura 2.2b se puede observar los porcentajes de sobrevivencia que se obtuvieron al deshidratar las esporas con vacío (2 horas), los cuales no difieren significativamente de los obtenidos por el método lento, por lo tanto ni el proceso de deshidratación, ni la velocidad del mismo influyen en el porcentaje de sobrevivencia de esporas. Por otro lado se secaron por aspersión el mismo tipo de esporas manejando tres temperaturas

de entrada del aire (80, 100 y 120°C) y diferentes temperaturas de salida, las cuales están en función de la temperatura de entrada, se observó que a menor temperatura de entrada y salida mayor porcentaje de sobrevivencia, observándose una disminución mayor al incrementar la temperatura de entrada (Fernández, 2006).

De igual forma se evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento y la actividad de agua en la vida de anaquel de las esporas de *T. harzianum*, observándose que de manera general el porcentaje de sobrevivencia es mayor si se almacena a 4°C. Después de 75 días a 4°C se llegan a tener porcentajes de sobrevivencia arriba de 70%; mientras que en las almacenadas a 25°C solo las que tienen A_w de entre 0.3 y 0.7 mantienen un porcentaje de sobrevivencia por arriba de 50%. (Fernández, 2006)

Al evaluar las concentraciones de ERO y Malondialdehído (MDA) en las muestras anteriores, se observó que a ambas temperaturas de almacenamiento la concentración de estas se incrementa con el tiempo y disminuye con la actividad de agua, la concentración de ERO y MDA es mayor (Fernández, 2006)

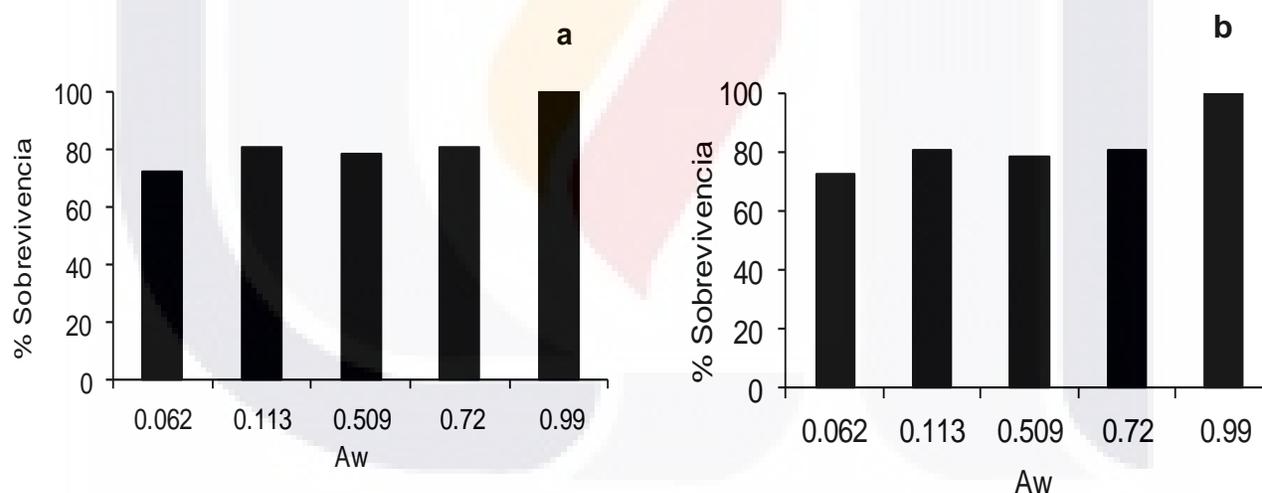


Figura 2.2 a) Muestra los porcentajes de sobrevivencia en función de la deshidratación con sales expresada como A_w . b) Muestra los porcentajes de sobrevivencia en función de la deshidratación a vacío expresada como A_w . En ambos casos se trabajó a 4°C.

Por todo lo anterior, es necesario el desarrollo de estrategias que permitan mejorar la estabilidad de las esporas de *T. harzianum* para que puedan ser usadas de manera comercial, por lo que es necesario incrementar la resistencia de las mismas al calor, pudiéndose hacer uso de técnicas de encapsulación con agentes termoprotectores, de igual forma es necesario

disminuir la oxidación de las moléculas en la espora para alargar su vida de anaquel a temperatura ambiente.

2.7 MICROENCAPSULACIÓN

El estudio de la conservación de microorganismos durante largos periodos de tiempo ha ido en incremento en los últimos años debido al desarrollo de tecnologías emergentes como la producción de probióticos y de agentes de control biológico (Morgan et al., 2006). Estas tecnologías requieren productos con una alta concentración de células viables que puedan ser almacenados por periodos relativamente largos conservando sus propiedades biológicas.

Ejemplo de lo anterior es el estudio de la producción de prebióticos a base de bifidobacterias, que son anaerobios obligados, y por lo tanto, su exposición al oxígeno ocasiona la acumulación de metabolitos tóxicos al interior de la célula, lo que lleva a una pérdida importante de su viabilidad (Talwalkar et al., 2004). Por esta razón la protección de bifidobacterias contra el medio ambiente mediante su microencapsulación es una de las estrategias que han despertado gran interés en los últimos años (O'Riordan et al, 2001; Lian et al., 2003; Ross et al., 2005; Rodríguez-Huezo et al., 2007).

De igual forma se ha reportado el uso de la microencapsulación para la estabilización de bacterias lácticas (Desmond et al., 2002; Fávaro-Trindade y Grosso, 2002; Corcoran et al., 2004, Ananta et al., 2005). En el caso de la microencapsulación de agentes de control biológico Horaczek y Viernstein (2004a) han estudiado la microencapsulación de esporas de *Beauveria brongniartii* (bioinsecticida) utilizando como método de encapsulación el secado por aspersión.

. La microencapsulación está definida como un proceso mediante el cual partículas o gotas pequeñas (núcleo) son rodeadas por una cubierta (pared), o embebidas en una matriz homogénea o heterogénea, para producir microcápsulas con diferentes propiedades funcionales (Gharsallaoui et al., 2007).

Este tipo de partículas pueden obtenerse mediante diferentes métodos como son liofilización, extrusión, co-cristalización, inclusión molecular, secado por aspersión, etcétera (Desai y Park, 2005). El más económico de todos ellos es el secado por aspersión, por lo que se ha vuelto la técnica más común de microencapsulación en la industria de los alimentos. . En

este proceso el material encapsulante se homogeniza con el ingrediente activo, esta mezcla (solución, emulsión o suspensión) es alimentada en el secador y atomizada en una cámara donde el agua es evaporada mediante aire caliente. Las microcápsulas son colectadas a la salida del secador.

En la microencapsulación, el paso más crítico es la elección de los componentes del material envolvente o pared, ya que de ello dependerá la eficiencia y estabilidad del material encapsulante. En el caso del secado por aspersion es necesario que los agentes encapsulantes, sean altamente solubles en agua, ya que se requiere alimentar una mezcla acuosa al secador (Gouin, 2004). De igual forma al seleccionar dichos componentes debe tomarse en cuenta sus propiedades fisicoquímicas como: solubilidad, peso molecular, difusividad, emulsificación, baja viscosidad en soluciones acuosas y formación de película (Reineccius, 1988).

La microencapsulación está definida como la tecnología de los sólidos o líquidos empacados en cápsulas que pueden liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas. Generalmente las microcápsulas tienen la habilidad de proporcionar ciertas propiedades funcionales, modificando y mejorando la forma física y las propiedades de una sustancia (Shahidi y Han, 1993).

Entre los materiales más usados para la microencapsulación de ingredientes se encuentran los carbohidratos, como almidones y maltodextrinas, esto porque son considerados como buenos agentes encapsulantes, pues en soluciones con alto contenido de sólidos presentan baja viscosidad y buena solubilidad. Sin embargo presentan la desventaja de que carecen de las propiedades necesarias para lograr una película estable, las cuales están asociadas con otro tipo de agentes encapsulantes como las gomas. Por lo anterior, es común que se usen mezclas de ambos materiales, para lograr una mayor estabilidad en los productos (Gharsallaoui et al., 2007).

Otros polisacáridos (alginato, carboximetil-celulosa, goma de algarrobo) y proteínas (proteínas de suero de leche, proteínas de soya, caseinatos) han sido utilizados como materiales encapsulantes usando secado por aspersion, pero su uso es poco eficiente debido a su baja solubilidad en agua y a que sus soluciones son altamente viscosas: esto implica que la

cantidad de agua a remover de la suspensión es mayor y que la concentración del ingrediente activo en el flujo de alimentación del secador debe ser reducida (Desai y Park, 2005).

Las microcápsulas tienen un tamaño entre 0.2 y 50 μm . Las microcápsulas están formadas por el material encapsulado y el material de pared; este material puede ser seleccionado de una amplia variedad de polímeros naturales o sintéticos, dependiendo del agente activo que se va a encapsular y las características deseadas en las microcápsulas finales (Ré, 1998).

Existen varias técnicas de encapsulación entre los que destacan el secado por aspersión, extrusión, aspersión en frío, lecho fluidizado, entre otros. Los materiales encapsulantes utilizados, están íntimamente ligados con el método utilizado para encapsular (Shahidi y Han, 1993; King, 1995; Risch, 1995).

El método más usado para la microencapsulación en la industria de los alimentos es el secado por aspersión ya que este proceso es flexible y económico, usa equipos fácilmente disponibles, y produce partículas de buena calidad (Judie, 1988). El proceso de formación de las microcápsulas por este método involucra las siguientes etapas.

1. Preparación de la suspensión.
2. Secado de la suspensión en un secador por aspersión.

La preparación de la suspensión es importante porque define las características y propiedades funcionales de las microcápsulas. Los materiales utilizados deben tener las siguientes propiedades (Shahidi y Han, 1993):

- Baja viscosidad a altas concentraciones y fácil manipulación durante el proceso de encapsulación.
- Capacidad para dispersar o emulsionar el material activo y estabilizar la emulsión producida.
- Que no sea reactivo con el material encapsulado durante el proceso de elaboración y almacenamiento.
- Capacidad para conservar el material activo durante el proceso de encapsulación o almacenamiento.

- Capacidad para proveer la máxima protección al material activo contra las condiciones ambientales (oxígeno, calor, luz, humedad).

Los materiales de pared deben poseer la habilidad de formar emulsiones estables, con un tamaño de partícula homogéneo, además las emulsiones deben tener un alto contenido de sólidos para que el proceso de secado por aspersion sea un proceso rentable.

El secado de la emulsión, en un secador por aspersion, ha sido ampliamente empleado para el secado de alimentos sensibles al calor, fármacos y otras sustancias, debido a la rápida evaporación del disolvente. El secado por aspersion también puede ser utilizado como un método de encapsulación, cuando éste atrapa material "activo" dentro de una matriz protectora, la cual es esencialmente inerte al material que está siendo encapsulado. Comparado con otras técnicas convencionales de microencapsulación, esta técnica ofrece la atractiva ventaja de producir microcápsulas en un simple proceso continuo (Shahidi y Han, 1993).

La microencapsulación por la técnica de secado por aspersion es buena en la medida que alcance una alta retención del material encapsulado (buena eficiencia de encapsulación) durante el procesamiento y almacenamiento (Ré, 1998). Cuando se lleva a cabo el proceso de secado existe la formación de una red fina y densa (matriz) en la superficie del material. Las pérdidas del material encapsulado están gobernadas por la difusión de la fase líquida en el material. Una vez que se forma la costra seca, las pérdidas pueden ocurrir si el material encapsulado puede pasar a través de ella por un mecanismo de difusión o el material se degrada por la difusión de oxígeno hacia el interior de la microcápsula (Ré, 1998).

Matsuno y Adachi (1993) propusieron un método que puede ser útil para seleccionar una composición adecuada del material para la encapsulación de lípidos. Este método está basado en la determinación de la velocidad de secado de una emulsión durante la deshidratación. Debido a que la velocidad de secado isotérmica está determinada por la velocidad de difusión del agua durante el secado, la velocidad de secado es un reflejo de las características de la matriz encapsulante: entre más fina y densa sea la matriz, menor será la velocidad de secado. Estos autores reportan que la mejor protección contra la oxidación de lípidos está dada por materiales que presentan un decremento rápido de la velocidad de secado. En la **figura 2.3** se muestran las curvas de secado típicas para diferentes materiales de pared; los polímeros con curvas cóncavas (1), forman capas en dos dimensiones, finas y

densas de forma inmediata durante el proceso de secado, previniendo de esta manera la interacción del núcleo con el exterior.

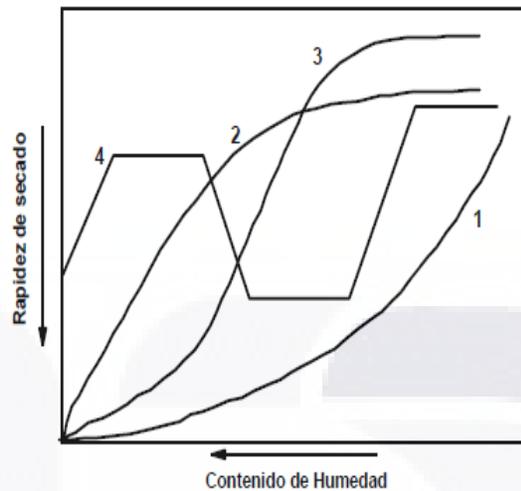


Figura 2.3 Curvas de secado isotérmico de diferentes materiales de pared (Perez-Alonso, et. al., 2003)

Este método fue reevaluado por Pérez-Alonso et al. (2003) debido a su falta de precisión y de discriminación entre materiales que presentan curvas de secado similares. Estos autores proponen que es posible calcular una energía de activación (E_a) mediante el análisis de las curvas de secado de los materiales encapsulantes. Aquellos materiales que requieren una mayor energía de activación durante el proceso de secado deberían ofrecer una mayor resistencia a la difusión de oxígeno a través de su matriz. Es importante mencionar que las maltodextrinas, los pulúlanos, la goma arábiga y la gelatina presentan este tipo de curvas de secado, lo que explica su uso extensivo y exitoso como materiales para la microencapsulación por secado por aspersion (Gharsallaoui et al., 2007).

Como ya se mencionó, el interés en el estudio de la microencapsulación para la protección de microorganismos al estrés térmico y oxidativo ha ido en aumento. Sin embargo la mayoría de estos estudios, están enfocados en bifidobacterias y bacterias lácticas. En el caso de agentes de control biológico, Horaczek y Viernstein (2004a) han estudiado la microencapsulación de esporas de *Beauveria brongniartii* (bioinsecticida). Estos autores utilizaron una matriz compuesta por leche descremada y polivinilpirrolidona lo que permitió mantener una viabilidad de las esporas secadas por aspersion del 92 % al cabo de 12 semanas a 10 °C. En 2011 Jin y Custis usaron microencapsulación mediante secado por aspersion para proteger esporas de *T. harzianum*, estos autores reportan que al usar glucosa al 2% y con

temperaturas de entrada y salida de 61 y 31°C respectivamente se logra incrementar tres veces la sobrevivencia de las esporas la secado con respecto a las esporas secadas sin protección.

2.8 DETERMINACIÓN DEL DAÑO ESTRUCTURAL EN ESPORAS DE *T. harzianum*.

La combinación de citometría de flujo y tinción con fluorescencia ha sido usada para evaluar de manera rápida la viabilidad de diferentes microorganismos reduciendo el error experimental en la determinación. (Ananta et al., 2005; Mc Hugh et al., 2007). De igual forma el uso de ciertos compuestos fluorescentes, permite evaluar el tipo de daño ocasionado a las células al ser sometidas a algún tipo de estrés.

El colorante FUN-1 se ha usado como un indicador de actividad metabólica en hongos y levaduras (Millard, et al., 1997; Marr, et al., 2001). Muchas especies de levaduras y hongos absorben dicho colorante al interior de la célula, si la membrana celular está intacta el colorante se retiene y se observa una fluorescencia amarilla-verde brillante en el citoplasma. Sin embargo las células viables son capaces de transportar el colorante hacia las vacuolas y concentrarlo en unas estructuras cilíndricas intravacuolares (CIVS) y procesar el colorante para que emita una fluorescencia roja (Millard et al., 1997; Molecular Probes, 2001). Por otra parte, es ampliamente conocido que el Ioduro de propidio (IP) puede ser usado para evaluar la viabilidad celular, pero también como indicador de daño a nivel de la membrana celular. El IP solo puede penetrar en la célula si la membrana tiene daño lo que le permite entrar al interior de la célula e interactuar con los ácidos nucleicos y producir una fluorescencia en rojo. Con todo esto se puede hacer uso de esta combinación de fluoróforos para evaluar el tipo de daño que sufren las células al ser sometidas al estrés térmico durante el secado por aspersión.

De lo anterior se puede concluir, que aun cuando la microencapsulación ha sido utilizada exitosamente para incrementar la viabilidad de microorganismos luego del secado por aspersión, poco se ha estudiado en cuanto a la protección contra el estrés oxidativo que ocurre durante el almacenamiento del material biológico. De igual forma, la mayoría de los estudios se han enfocado en el estudio empírico del efecto de las variables de estudio (tipo y concentración de agente encapsulante, variables del proceso de secado) sobre la viabilidad celular sin llevar a cabo un análisis más profundo los daños celulares ocasionados y los factores que lo originan. Por lo que se pretende hacer un estudio que permita entender cómo es que la energía de

activación al secado del material, y su interacción con las condiciones del proceso de secado (temperaturas de entrada y salida), influyen sobre los daños celulares ocasionados durante el proceso de secado (daño térmico) y durante el almacenamiento (daño oxidativo).



3. HIPÓTESIS

La microencapsulación con materiales de pared con mayor energía de activación disminuirá el daño térmico en esporas de *Trichoderma harzianum* secadas por aspersión e incrementará su sobrevivencia en el limitando el daño oxidativo de las esporas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la microencapsulación mediante secado por aspersión como una herramienta para proteger a las esporas de *Trichoderma harzianum* contra el estrés térmico (secado) y contra el estrés oxidativo (almacenamiento)

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar una técnica de citometría de flujo, que permita determinar el tipo de daño celular ocasionado a las esporas de *Trichoderma harzianum* durante el secado por aspersión.

Estudiar el efecto de la energía de activación (E_a) del material de pared y de las temperaturas de entrada y salida del aire sobre la sobrevivencia de las esporas de *Trichoderma harzianum* microencapsuladas mediante secado por aspersión.

Evaluar el efecto de la energía de activación del material de pared y de la temperatura de almacenamiento en la sobrevivencia y oxidación, de las esporas de *Trichoderma harzianum* microencapsuladas mediante secado por aspersión.

Evaluar el efecto de la inclusión de un agente antioxidante en la formulación de esporas de *Trichoderma harzianum* microencapsuladas mediante secado por aspersión sobre la sobrevivencia y oxidación durante el almacenamiento.

5. METODOLOGIA

5.1 Determinación de la Energía de activación de los agentes encapsulantes

Para obtener los valores de energía de activación (E_a) de los diferentes agentes encapsulantes y de las mezclas de los mismos, se utilizó la metodología reportada por Pérez Alonso, et al., en el 2003. Los agentes encapsulantes utilizados fueron: maltodextrina 10DE (MD10), maltodextrina 20DE (MD20), goma arábica (GA) y la mezcla 1:1 de goma arábica y maltodextrina 10 (MD10-GA). Los valores de E_a obtenidos se muestran en la tabla 1

Tabla 5.1. Energía de activación de los agentes encapsulantes

Material	E_a (kJ/mol)
MD10 - GA	31.67
MD10	29.03
MD20	23.94
GA	19.21

5.2 Producción de esporas de *T. harzianum*

5.2.1 Preparación de inóculo

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* variedad CIAD 012, obtenida del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo unidad Culiacán, que fue preservada en tubos inclinados con agar papa dextrosa (PDA). De estos tubos se inocularon placas de PDA y se incubaron por 6 días a 29°C, estas placas se expusieron a la luz solar diariamente durante 15 minutos para favorecer la esporulación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recuperaron las esporas en condiciones de esterilidad agregando a las placas 8 ml de solución salina (8.5 g/l NaCl, 0.05% Tween 40), se lavaron y rasparon las cajas con un asa bacteriológica, para favorecer la suspensión de las esporas, la solución de esporas se recuperó en un matraz con oliva y se inoculó el medio de cultivo a razón de 1×10^5 esporas/ml.

5.2.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo tenía la siguiente composición

Tabla 5.2. Composición del medio de cultivo usado para la producción de esporas de *T. harzianum*

Compuesto	Concentración (g/l)
Glucosa	30
Sulfato de Amonio	5.6
Fosfato de potasio dibásico	7.0
Fosfato de sodio monobásico	2.0
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1.5
Cloruro de Calcio dihidratado	0.0671
Cloruro férrico hexahidratado	0.008
Sulfato de Zinc heptahidratado	0.0001
Extracto de levadura	0.5

5.2.3 Producción en cultivo sumergido de esporas

Para los cultivos se utilizó un fermentador de 500 l con un volumen de trabajo de 270 l, con temperatura de 29 °C y pH de 5.6, con tres impulsores Rushton, a una velocidad de agitación de 360 rpm y aireación de 0.5 vvm; para medir la tensión de oxígeno disuelto se utilizó un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420), previamente calibrado a 100% de oxígeno disuelto y conectado a un amplificador de tensión de oxígeno disuelto.

Para el monitoreo de pH se utilizó un electrodo esterilizable, conectado a un transmisor – controlador de pH; para el control de pH a 5.6 se utilizó una solución de NaOH 50% (w/v) estéril que se adiciona con una bomba peristáltica.

El control de espuma se hizo mediante la adición de grasa de silicón al 20%, usando un sensor de nivel conectado a una bomba peristáltica. El tiempo de cultivo fue de 64 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se separaron las esporas del micelio por medio de tamizado con mallas del número 80, 100 y 120. La suspensión de esporas se centrifugó en una centrifuga Super Sharples a 13200 g, con un flujo de alimentación de 1.5 l/min., con lo cual se obtuvo la pasta que se utilizó para las formulaciones.

5.3. Evaluación del daño celular en esporas de *T. harzianum* mediante citometría de flujo

Cuatro tipos de muestras se utilizaron para poder obtener una correlación entre la fluorescencia de las células y la viabilidad: secadas por aspersión, almacenadas a 29 °C, esporas recién cosechadas y dañadas por calor húmedo.

Las secadas por aspersión se obtuvieron como se describe en la sección 5.4; estas mismas muestras fueron almacenadas por 3 meses a 29 °C, en ambos casos se rehidrataron los polvos de esporas en solución de glucosa al 20% (w/v) por 2 horas y posteriormente se hicieron lavados con buffer de fosfatos 50mM pH 5.6; las esporas recién cosechadas se recuperaron a partir de cajas de PDA siguiendo la técnica que se describe en la sección 5.2.1, para la preparación del inóculo fueron lavadas y resuspendidas en buffer de fosfatos; y para obtener las dañadas por calor húmedo una parte de esta solución fue esterilizada a 121°C por 15 min, todas las muestras fueron conservadas en buffer de fosfatos para su posterior tinción.

5.3.1 Tinción con Ioduro de Propidio (IP).

A una solución de aproximadamente $1 \cdot 10^8$ esporas/ ml resuspendidas en buffer de fosfatos 50mM pH 5.6 se agregó IP a una concentración final de $30 \mu\text{M}$. y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después fueron analizadas en un Citómetro de flujo FACScan Becton Dickinson para colectar la fluorescencia roja del IP.

5.3.2 Tinción con FUN 1

Una suspensión de células con aproximadamente $1 \cdot 10^6$ esporas/ml en buffer de fosfatos 50mM pH= 5.6 fue teñida con una solución de FUN 1 a una concentración final de $10 \mu\text{M}$. Las

muestras se incubaron en oscuridad por 30 min y se analizaron en el citómetro para medir la fluorescencia en verde y rojo.

5.3.3 Cuantificación de esporas totales y esporas viables

Para la cuantificación de esporas totales de las muestras, se hicieron diluciones seriadas y se contó el promedio de esporas por medio de cámara de Neubauer, para determinar el número de esporas viables se sembraron diluciones seriadas en cajas de PDA, después de dos días de incubación se contó el número de UFC que se obtuvieron. Con esto se calculó el porcentaje de viabilidad y se elaboraron correlaciones entre la viabilidad y la fluorescencia en rojo del IP y del FUN1.

El cálculo del porcentaje de viabilidad se obtuvo con la ecuación;

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{UFC} / \text{Esporas totales}) \times 100 \quad \text{Ec (3)}$$

5.4 Evaluación del efecto de la energía de activación y las temperaturas de proceso en la sobrevivencia de esporas de *T. harzianum* después del secado.

Para evaluar el efecto de la Ea y las temperaturas de proceso en la sobrevivencia de las esporas se uso un diseño factorial 3^3 , y se hizo uso del software Design Expert 5.0.7. para hacer el análisis estadístico. La matriz experimental obtenida se muestra en la tabla 6.1

Los tres materiales; maltodextrina 10 DE (MD10), maltodextrina 20 DE (MD20), goma arábica (GA) así como una mezcla 1:1 de MD10 y GA(MD10:GA) se agregaron a buffer de fosfatos 50mM pH 5.6, a una concentración de 20% (w/v) con agitación constante y una vez diluido el material, se adicionó la pasta de esporas obtenida después de la centrifugación, para lograr una concentración de 1×10^8 esp/ml y se pasó al secado una vez que se diluyeron todos los grumos de la pasta de esporas. De igual forma se prepararon soluciones control con una concentración 5×10^8 esp/ml en buffer de fosfatos 50mM pH 5.6

Después de elaboradas las diferentes formulaciones a probar, se dejaron agitando en refrigeración durante 8 horas y posteriormente se secaron 500 ml en un secador por aspersion

Bowen Engineering BE-1448 a una temperatura de entrada del aire de 120, 135 y 150 °C y de salida de 70, 80 y 90 °C. Se determinó la cuenta viable (UFC) mediante citometría de flujo antes y después del proceso, haciendo uso de la correlación obtenida entre IP y la viabilidad. El porcentaje de sobrevivencia (SS) al secado de esporas microencapsuladas se calculó de la siguiente forma:

$$SS = (\text{Viabilidad después del secado} / \text{Viabilidad antes del secado}) \times 100 \quad \text{Ec (4)}$$

De igual forma se determinó el incremento en la sobrevivencia (IS) con la siguiente ecuación:

$$IS = \text{SS de esporas encapsuladas} / \text{SS de esporas sin encapsular} \quad \text{Ec (5)}$$

5.5 Evaluación del efecto de la energía de activación y las temperaturas de almacenamiento en la sobrevivencia de esporas de *T. harzianum*.

Los polvos secos obtenidos después del secado, fueron almacenados a 4 y 29 °C, haciendo muestreos cada 2 semanas durante 3 meses. En cada muestreo se determinó la cuenta viable mediante citometría de flujo, las especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares y la actividad de agua.

El porcentaje de sobrevivencia en el almacenamiento (SA) de las esporas microencapsuladas y no encapsuladas se determinó con la siguiente fórmula:

$$SA = (\text{UFC cuando } t = t_i / \text{UFC cuando } t = 0) \times 100 \quad \text{Ec (6)}$$

5.5.1 Determinación de la actividad de agua (Aw)

La actividad de agua (Aw) de las muestras deshidratadas se determinó en un medidor Aw Sprint TH 500 de Novasina. Para determinar la Aw se colocó el equipo a la temperatura en que están las muestras y posteriormente se colocaron aproximadamente 3 gramos de muestra en los recipientes incluidos con el equipo y se mide la Aw.

5.5.2 Obtención de una curva patrón para el cálculo de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares

La determinación de la concentración de ERO, se lleva a cabo a través de una prueba fluorimétrica que se basa en la oxidación del diacetato de 2',7' – diclorofluorescina (DCFH-DA), la cual es una molécula no fluorescente que difunde a través de la membrana celular y dentro de la célula es desacetilada por estereasas para formar 2',7'- diclorofluorescina (DCFH) no fluorescente, que es oxidada por las ERO, formando la molécula fluorescente 2',7' – diclorofluoresceína (DCF). (LeBel, et al., 1992)

La curva estándar de oxidación de 2',7'- diclorofluorescina (DCFH) se hace en función de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como especie reactiva de oxígeno capaz de oxidar DCFH a DCF.

Se mezcla 0.5 mL de una solución 1 mM en etanol de diacetato de 2',7' - diclorofluorescina (DCFH-DA) con 2mL de NaOH 0.01 N y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos, para desesterificar la molécula. Pasado este tiempo, la solución se neutraliza con 10 ml de NaH_2PO_4 25 mM, pH 7.4 y de esta última solución se toman 50 μ L y se adicionan a 1950 μ L de Tris-HCl 40 mM, pH 7.4 para un volumen total de 2 mL.

La reacción se inicia agregando peróxido de hidrógeno a concentraciones de 10 a 100 μ M y $FeSO_4$ a una concentración final de 10 μ M (LeBel, et al., 1992). Después de 5 minutos, se mide la fluorescencia usando un espectrofluorímetro con longitud de onda de excitación de 504nm y de emisión de 520nm. La curva patrón obtenida se muestra en la Figura 5.1.

5.5.3 Determinación de ERO en esporas de *T. harzianum*

Se resuspende la pasta seca de esporas en buffer de fosfatos pH 5.6, a una concentración final de 0.1gr de esporas por ml; de esta solución se toman 500 μ L a los que se les añaden 12.5 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 5.6; a 1.8 mL de esta solución se le añaden 0.2mL de solución 1mM de diacetato de 2',7' – diclorofluorescina (DCFH-DA) en etanol, para lograr una concentración 10 μ M de DCFH-DA. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión se centrifuga y se lava el paquete celular 2 veces con el

mismo buffer. Las células se resuspenden en 500 μL del buffer y se adiciona 1.5 g. de perlas de vidrio de 500 μm de diámetro para lisar las esporas con 5 ciclos de agitación de 1 minuto por 1 minuto en hielo para evitar oxidaciones posteriores. Posteriormente la suspensión de esporas se diluye 1:5 en buffer de fosfatos y se centrifuga a 25,000g por 5 minutos, se recupera el sobrenadante diluyéndolo 1:10 en agua destilada y se mide la fluorescencia en las mismas condiciones que la curva estándar.

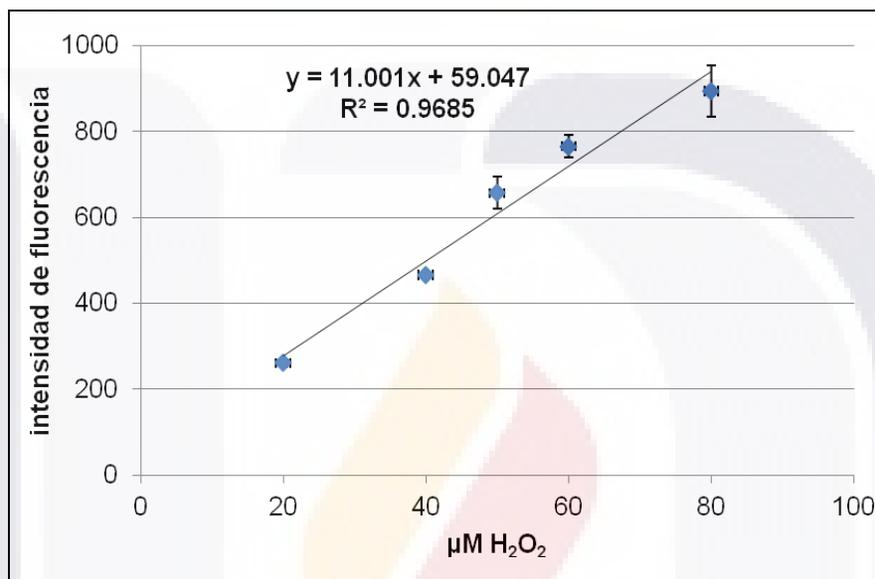


Figura 5.1 Curva patrón de EROS para determinar la concentración de EROS intracelulares

5.6 Evaluación de la adición de un antioxidante en la formulación de esporas de *T. harzianum* microencapsuladas mediante secado por aspersion en la sobrevivencia durante el almacenamiento.

Se preparó una solución de ácido ascórbico a una concentración de 5 ppm y se agregó la pasta de esporas obtenida después de la centrifugación, para lograr una concentración de 1×10^8 esp/ml y se mantuvieron en agitación por 2 horas para permitir el contacto del antioxidante con las células, después se adicionó la mezcla MD10-GA a una concentración final de 20% (w/v) en buffer de fosfatos 50mM pH 5.6 con agitación constante por 8 horas; esta solución fue secada por aspersion a una TE de 150°C y TS de 90°C. Como muestra control se utilizaron las esporas encapsuladas en MD10-GA y secadas a TE = 150°C y TS = 90°C. Mediante citometría de flujo se determinó la cuenta viable (UFC), así como las ERO después del secado.

Los polvos secos obtenidos después del secado, fueron almacenados a 29 °C, haciendo muestreos cada 2 semanas durante 3 meses. En cada muestreo se determinó la cuenta viable mediante citometría de flujo, así como las ERO.



6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Evaluación de daño celular en esporas de *T. harzianum* mediante citometría de flujo

Para evaluar el tipo de daño celular que se da en las esporas de *T. harzianum* durante el secado, se desarrolló una técnica de citometría de flujo en combinación con el uso de compuestos fluorescentes. Para evaluar la actividad metabólica se realizó una tinción con FUN1 el cual es un colorante fluorescente, que se usa para evaluar la actividad metabólica en hongos y levaduras, en células con membrana celular integra el colorante entra y se mantiene en el citoplasma y emite una fluorescencia verde, sin embargo las células que se encuentran metabólicamente activas son capaces de internalizar el fluoróforo en la vacuola y procesarlo en estructuras vacuolares cilíndricas, lo que ocasiona que haya un cambio en la longitud de onda en que emite su fluorescencia, observándose una fluorescencia en rojo.

En la **figura 6.1** se muestra la correlación obtenida entre la fluorescencia en rojo de FUN 1 y el porcentaje de células viables de las muestras analizadas, como era de esperarse la muestras con mayor número de células viables presentan una intensidad de fluorescencia mayor que las células no viables.

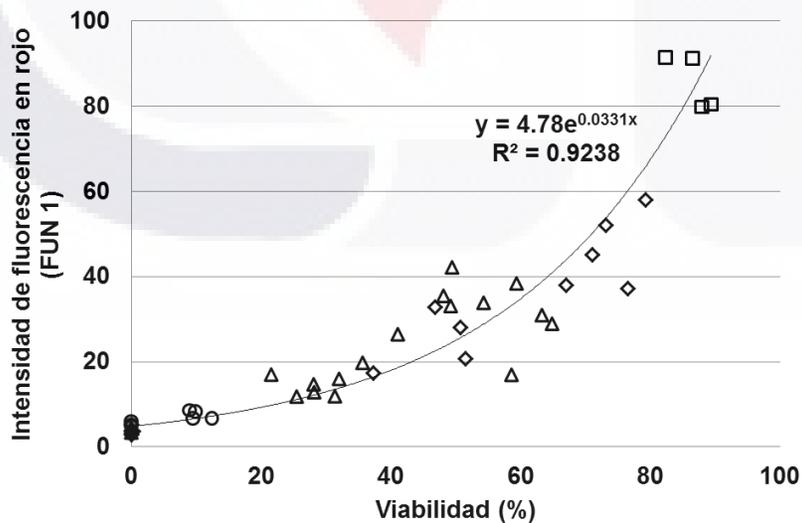


Figura 6.1 Correlación entre la viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum* evaluada por cuenta en placa o PDA y la fluorescencia en rojo de FUN1. Los símbolos representan esporas: recién cosechadas (□), muertas por calor húmedo (◇), secadas por aspersión (△), y (○) almacenadas a 29°C

Al obtener esta correlación se observó que no presentaba una tendencia lineal, como se hubiera esperado, si no exponencial, lo que indicaba que en las muestras con mayor viabilidad se tenía una mayor generación de la fluorescencia en rojo que en las que tenían menor viabilidad, lo anterior podría deberse a que las células viables de alguna forma tenían la capacidad de procesar una mayor concentración del fluoróforo, y por ello se observa ese incremento en la intensidad de fluorescencia.

Debido a la anterior se decidió realizar micrografías de transmisión (**figura 6.2**) de los tres tipos de muestras evaluadas con la técnica de citometría de flujo, esto con el fin de observar la composición de las esporas. En las micrografías se puede observar que las muestras con mayor viabilidad (**figura 6.2 a**), tienen un número mayor de vacuolas que aquellas que presentan daño por algún tipo de estrés (**figura 6.2 b y c**). Debido a la presencia de un mayor número de vacuolas en las esporas de las muestras con mayor viabilidad, la concentración de fluoróforo procesado es mayor, mientras que en las esporas que han sido sometidas a estrés se tiene una disminución en el número de vacuolas, y por lo tanto pueden procesar menor concentración del fluoróforo. La correlación mostrada en la **figura 6.1** permitirá evaluar el nivel de actividad que presentan las esporas de *T. harzianum*.

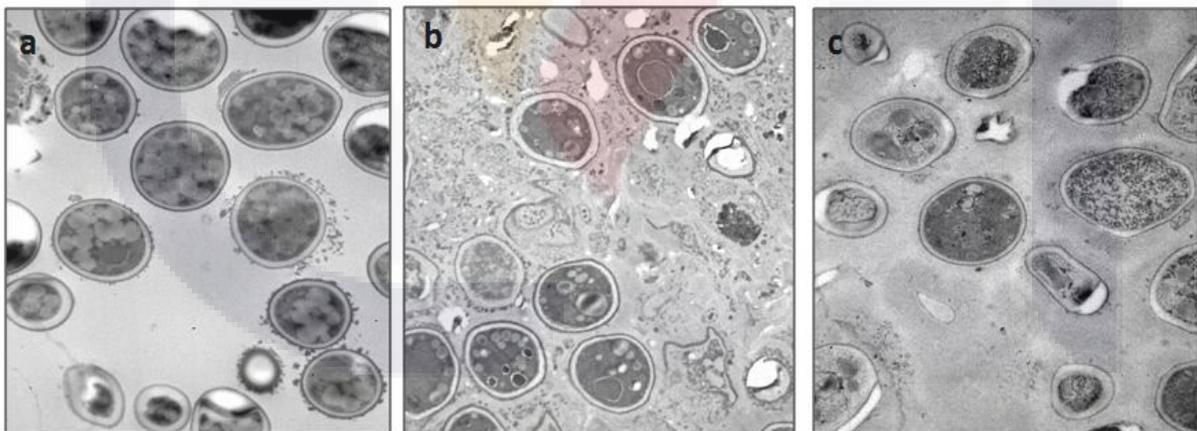


Figura 6.2 Micrografías electrónicas de transmisión que muestran la diferencia en el número de vacuolas que se forman en esporas de *T. harzianum*, y que están relacionadas con la actividad de las esporas: a) Recién cosechadas (viabilidad \approx 80%), b) secadas por aspersión (viabilidad \approx 60%) y c) mezcla 1:1 de recién cosechados y dañados por calor húmedo (viabilidad \approx 35%). El aumento es 7000x

De trabajos anteriores realizados en el grupo de investigación, se tenían indicios de que la pérdida de integridad en la membrana celular era el principal daño en las esporas de *T. harzianum* durante el secado, por lo que se decidió evaluar este mediante el uso de Ioduro de propidio. Este fluoróforo solo puede internalizarse en la célula y reaccionar con los ácidos

nucleicos si la membrana está comprometida. De igual forma se deseaba desarrollar una técnica más rápida y con menos margen de error que la cuenta en placa para la determinación de la viabilidad de las esporas.

En la **figura 6.3** se muestra la correlación obtenida para el porcentaje de células positivas para la tinción con Ioduro de propidio y el porcentaje de células viables. Como se observa en la figura se obtiene un coeficiente de correlación (R^2) de 0.96 lo que indica que este modelo nos permitirá determinar eficientemente el porcentaje de células viables en una muestra determinada.

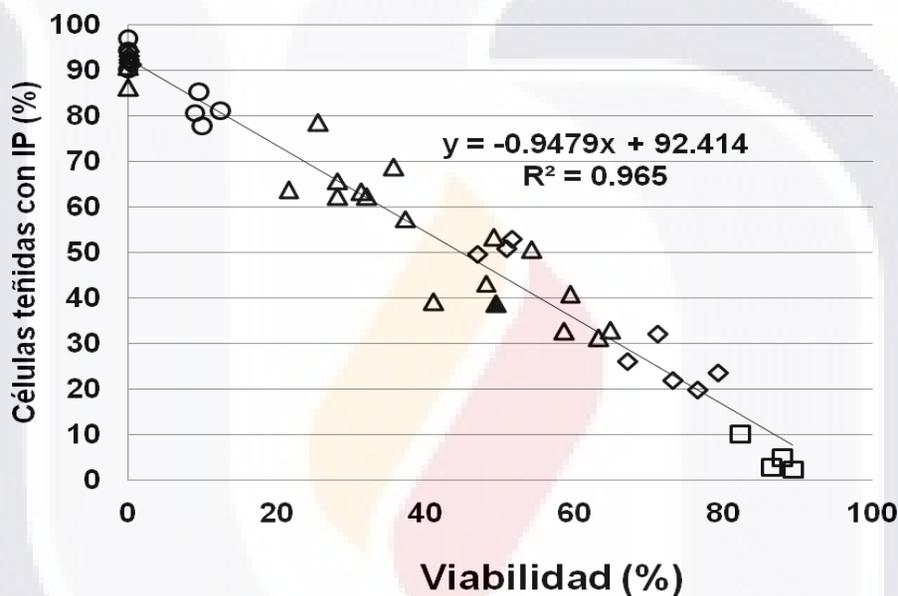


Figura 6.3 Correlación entre la viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum* evaluada por cuenta en placa o PDA y la fluorescencia de IP. Los símbolos representan esporas: recién cosechadas (□), muertas por calor húmedo (◇), secadas por aspersión (△), y (○) almacenadas a 29°C.

En la **figura 6.3** se observa que en las muestras con viabilidad $\approx 0\%$ el porcentaje de células teñidas no es del 100%, como se esperaría, por lo que aparentemente existe una pequeña parte de la población que, aun cuando conservan la integridad de membrana, pierde la capacidad de germinar después de ser sometida a algún tipo de estrés. Assaraf, et al., en el 2002 encontraron que en conidios de *F. oxysporum* sometidos a estrés térmico, se observaban algunas células que mantenían la integridad de membrana y sin embargo, aun cuando aparentemente podían germinar y generar hifas, por algún mecanismo se veía afectada su capacidad metabólica y eran incapaces de desarrollar estructuras vegetativas. Estos autores evaluaron diferentes compuestos marcadores de apoptosis y no observaron diferencias significativas en la expresión de estos en las muestras de células viables y no viables, por lo

que no es posible determinar el tipo de mecanismo que ocasiona esta pérdida de capacidad metabólica.

En la **figura 6.4** se observa el daño en membrana ocasionado a las esporas de *T. harzianum* por diferentes tipos de estrés: calor húmedo (a), calor seco (b) y oxidación (c), es evidente que aun en las muestras con valores de viabilidad de 0% se observan algunas esporas con la membrana integra, lo que demuestra que efectivamente existe un pequeño porcentaje de la población que perdió su capacidad de germinar, pero no presenta daño en membrana. Lo anterior concuerda con lo reportado por Ananta, et. al. (2005), quienes demostraron que al secar por aspersion células de *L. rhamnosus* GG el principal tipo de daño en las células se presentaba a nivel de la membrana celular, la cual perdía la integridad después del proceso de secado.

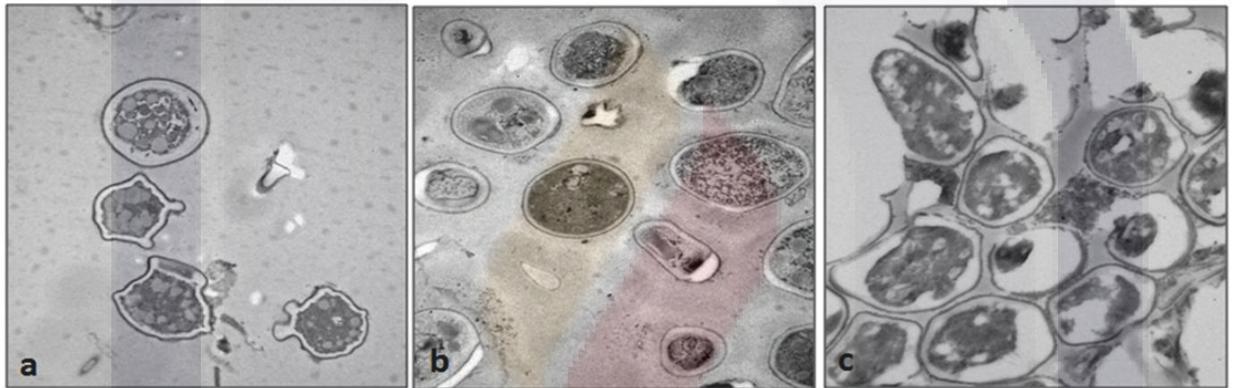


figura 6.4 Micrografías electrónicas de transmisión que muestran el daño de membrana en esporas de *T. harzianum*, debido a: (a) calor húmedo (viabilidad \approx 0%), (b) secado por aspersion (viabilidad \approx 15%) y (c) almacenadas a 29°C (viabilidad \approx 0%). El aumento es de 7000x

El desarrollo de la técnica de citometría de flujo en combinación con el uso de compuestos fluorescentes, permitirá evaluar de manera más rápida la viabilidad de diferentes muestras de esporas, en comparación con el uso de la técnica de cuenta en placa.

6.2 Evaluación del efecto de la energía de activación (E_a) y las temperaturas de proceso en la sobrevivencia de esporas de *T. harzianum* después del secado.

Para evaluar el efecto de la E_a y de las temperaturas de proceso (entrada y salida) sobre la sobrevivencia de esporas de *T. harzianum* al secado se utilizó un diseño factorial 3^3 . Los tres materiales encapsulantes seleccionados fueron: maltodextrina (con 10 y 20 equivalentes

de dextrosa, así como goma arábica, lo anterior porque los valores de E_a que presentan fueron adecuados para poder utilizar esta como una variable cuantitativa en el diseño experimental; además de que son los más comunes utilizados en la microencapsulación de microorganismos.

Después de la validación del modelo empírico de segundo orden, se pudo observar que las temperaturas de proceso y la E_a tienen un efecto significativo en la IS de las esporas microencapsuladas (F , $p < 0.001$). La ecuación ($R^2 = 0.92$) que resulta del análisis estadístico de los datos de IS es:

$$IS = 4.31 + 2.18 Ti + 1.44 To + 0.80 Ea + 0.58 (Ti)^2 + 0.51(Ea)^2 + 1.26 Ti To + 0.32 Ti Ea + 0.47 To Ea$$

(Ec 7)

En el 2003 Pérez-Alonso y colaboradores propusieron que la E_a de los biopolímeros puede ser usada como criterio de selección para su uso como material encapsulante. Estos autores sugirieron que los materiales con alta E_a forman una matriz densa y estructurada alrededor del núcleo (microorganismo o ingredientes bioactivos) la cual funciona como una barrera contra el estrés térmico, y limita la difusión de oxígeno al interior de la microcápsula. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales las temperaturas de entrada y salida, y la combinación de éstas, tienen un mayor efecto sobre el incremento de sobrevivencia (IS) de las esporas de *T. harzianum* que la E_a (Ec 7)

En la **figura 6.5 a, b y c** se muestra la superficie de respuesta de IS en función de la E_a y de las temperaturas de secado. En esta figura y la **tabla 6.1** se puede observar que el material encapsulante que permite elevar el IS, así como la sobrevivencia al secado (SS) fue MD10, el cual tiene la E_a más alta, mientras el IS disminuye al usar MD20 que tiene una menor E_a , mientras que los menores valores de IS se obtienen con GA que es la de menor E_a .

Es evidente de la **figura 6.5 a, b y c**, que sin importar el tipo de matriz encapsulante que se use, la combinación de las temperaturas de entrada y salida más altas es la que maximiza los valores de SS de las esporas de *T. harzianum*. Estos resultados sugieren que la combinación de temperaturas de proceso relativamente bajas ($120^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$) podrían resultar en un proceso de secado lento, lo que produce una matriz de protección mal estructurada.

Tabla 6.1 Diseño factorial 3^3 para evaluar el efecto de la energía de activación y las temperaturas de proceso sobre la sobrevivencia de esporas de *T. harzianum* al secado. ^a Valores experimentales. ^b Valores predichos por el modelo

Formulado	Variables codificadas			Variables de proceso		Respuestas		
	Ea	TE	TS	Ea(kJ mol ⁻¹)	TE (°C)	TS (°C)	IS ^a	IS ^b
1	1	1	-1	29	150	70	4.0	4.5
2	1	1	0	29	150	80	7.9	7.7
3	1	1	1	29	150	90	10.1	10.9
4	1	0	-1	29	135	70	3.6	2.7
5	1	0	0	29	135	80	4.2	4.6
6	1	0	1	29	135	90	5.4	6.5
7	1	-1	-1	29	120	70	2.0	2.1
8	1	-1	0	29	120	80	2.6	2.7
9	1	-1	1	29	120	90	4.2	3.4
10	0	1	-1	24	150	70	4.2	4.4
11	0	1	0	24	150	80	6.2	7.1
12	0	1	1	24	150	90	9.4	9.8
13	0	0	-1	24	135	70	3.2	2.9
14	0	0	0	24	135	80	4.3	4.3
15	0	0	1	24	135	90	5.3	5.8
16	0	-1	-1	24	120	70	1.7	2.6
17	0	-1	0	24	120	80	2.9	2.7
18	0	-1	1	24	120	90	2.0	2.9
19	-1	1	-1	19	150	70	3.2	3.2
20	-1	1	0	19	150	80	5.1	5.5
21	-1	1	1	19	150	90	7.8	7.7
22	-1	0	-1	19	135	70	2.9	2.0
23	-1	0	0	19	135	80	2.6	3.0
24	-1	0	1	19	135	90	2.9	4.0
25	-1	-1	-1	19	120	70	1.4	2.0
26	-1	-1	0	19	120	80	2.2	1.8
27	-1	-1	1	19	120	90	2.3	1.5
28	0	0	0	24	135	80	4.8	4.3
29	0	0	0	24	135	80	4.6	4.3
30	0	0	0	24	135	80	4.3	4.3
31	0	0	0	24	135	80	4.9	4.3
32	0	0	0	24	135	80	4.0	4.3

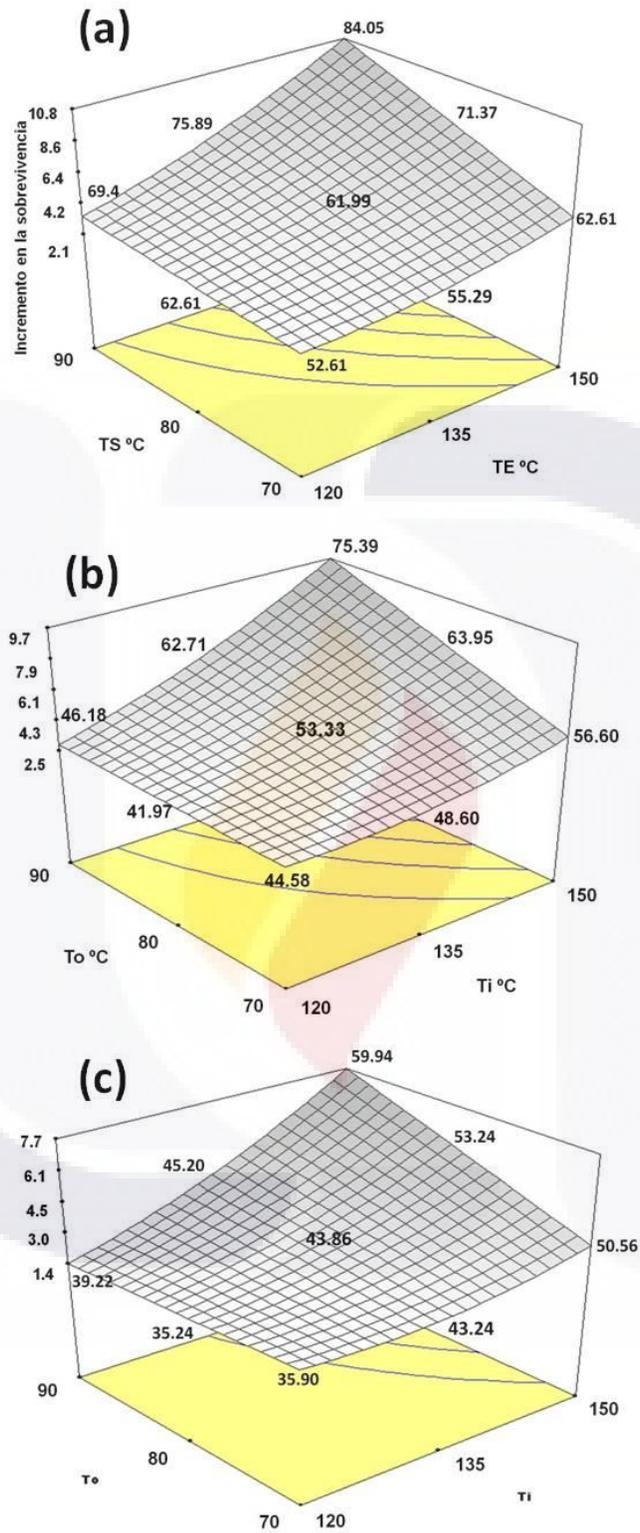


Figura 6.5. Superficies de respuestas representando el incremento en la sobrevivencia (IS) de las esporas de *T. harzianum* microencapsuladas como función de la temperatura de entrada y salida usando a) MD10 ($E_a = 29.0 \text{ kJ mol}^{-1}$); b) MD20 ($E_a = 24.0 \text{ kJ mol}^{-1}$); c) GA ($E_a = 19.0 \text{ kJ mol}^{-1}$) como matrices encapsulantes. Se muestran los valores experimentales de SS para cada punto del diseño experimental.

Los experimentos de las esporas formuladas con la mezcla MD10-GA fueron utilizados para realizar una validación del modelo obtenido por el diseño experimental, ya que esta mezcla presentó una mayor E_a (31.6 kJ/mol). En la **figura 6.6** se muestra la habilidad del modelo para predecir valores fuera del dominio experimental, al extrapolar los valores de IS se obtiene una $R^2 = 0.90$ que es un valor lo suficientemente alto para validar el modelo. De hecho, es evidente que al usar las temperaturas de proceso más altas y la mezcla MD10-GA, se alcanza un valor de SS de 86%, lo que significa que se incrementa 11 veces la sobrevivencia con respecto a las esporas sin encapsular. Por otro lado con el uso de GA solo se logra un valor de SS de 60%, que representa un incremento de 7 veces en la sobrevivencia.

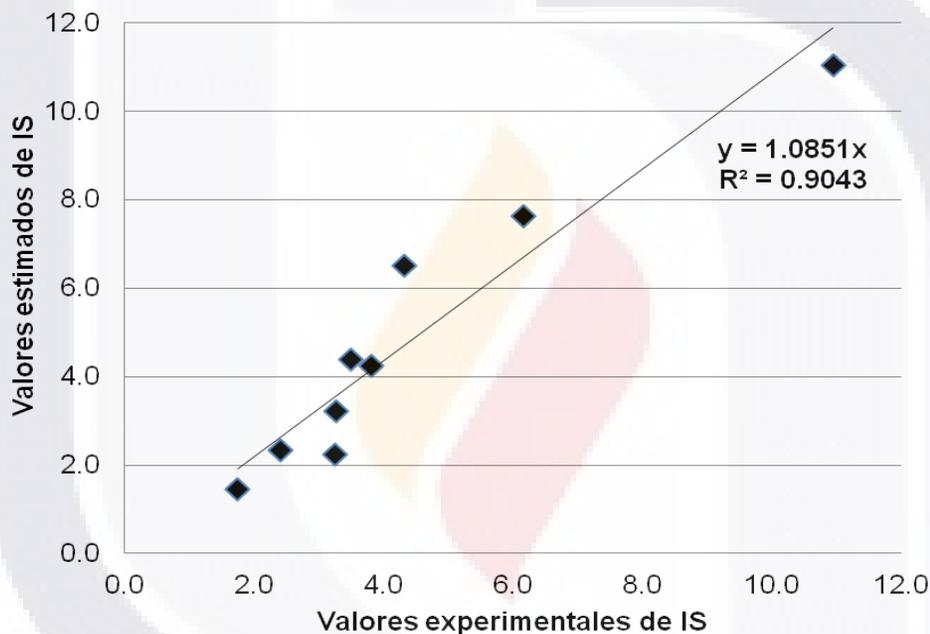


Figura 6.6. Validación del modelo por medio de los valores experimentales contra estimados del incremento de la sobrevivencia IS9 de esporas formuladas con la mezcla 1:1 de MD10 – GA ($E_a = 31.6 \text{ kJ mol}^{-1}$).

En el 2012 Fernández-Sandoval y colaboradores, demostraron que el estrés térmico en el secado y el estrés oxidativo en el almacenamiento, son las principales causas que afectan la sobrevivencia de las esporas de *T. harzianum*. El objetivo de encapsular a los microorganismos es el de proveerles un microambiente, al interior de la cápsula, que les permita sobrevivir durante el proceso de secado y el almacenamiento (Weinbreck et al., 2010). Diferentes autores han reportado el uso de la microencapsulación para proteger a las esporas de hongos, lo que demuestra que esta técnica puede ser usada para su protección durante el secado (Guijarro, Larena et al., 2006; Horaczek, et al., 2004a,b; Jin, et al., 2011; Larena, et al., 2003 a,b). Sin

embargo en la mayoría de los casos la selección del agente encapsulante y las condiciones de proceso se hace mediante prueba y error. Los resultados de IS coinciden con lo reportado por Rodríguez-Hueso et al. (2007), en el sentido de que los agentes encapsulantes con la mayor Ea son los que proveen la mayor protección de daño térmico en las células, esto debido a la formación de una matriz estructurada alrededor de las mismas y aparentemente es necesario el uso de temperaturas de proceso más elevadas para la rápida formación de las microcápsulas.

Horazcek, et al., (2004a,b) estudiaron la microencapsulación de esporas de *B. brongniartii* y *M. anisopliae* usando leche descremada y polivinilpirrolidona como agentes encapsulantes, reportando que se incrementa 2 veces la sobrevivencia de las esporas secadas por aspersión; sin embargo, después de 6 semanas de almacenamiento a 30°C las esporas perdían la capacidad de germinar. Liu, et al., (2009) reportaron que al encapsular esporas de *M. anisopliae* en una matriz de alginato-arcilla, con dextrina e hidroxipropyl-metil-celulosa como aditivos, se logra una germinación del 80% de las esporas después de seis meses de almacenamiento. Larena y colaboradores (2003b), evaluaron el efecto del secado por aspersión en la viabilidad de *P. oxalicum* al usar una mezcla de leche descremada y sacarosa como agente encapsulante, observando que la sobrevivencia fue de solo el 28%. La microencapsulación mediante secado por aspersión de *P. frequentans* usando leche descremada y TE = 150°C, resultó en una sobrevivencia del 28% (Guijarro et al., 2006). Esta misma estrategia se usó para evaluar la microencapsulación de *E. nigrum*, y se observó el mismo efecto, ya que la sobrevivencia fue solo del 10% (Larena et al., 2003a). Solamente Jin y Custis (2011) han reportado el uso de microencapsulación de *T. harzianum* mediante secado por aspersión. Ellos reportan que la sobrevivencia de las esporas incrementa 3 veces al usar sacarosa como agente encapsulante. En este trabajo se logró incrementar 11 veces la sobrevivencia de las esporas, el obtener valores más altos de SS se puede explicar por el uso de polímeros en lugar de un disacárido lo que permite la formación de una matriz más densa

Para evaluar la formación de las microcápsulas se usó Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). En la **figura 6.7a** se observa la morfología de las esporas secadas sin agente encapsulante. El diámetro de las partículas estuvo entre 2 y 5 μm . En la **figura 6.7 b, c** se presentan las formulaciones con GA, MD10 y MD10- GA respectivamente y se puede observar en las micrografías la formación de las microcápsulas con un tamaño de partícula entre 15 y 20 μm . La formulación con MD10- GA presenta una estructura más densa y robusta que la

formulación con solo GA, la cual muestra una matriz irregular, lo que podría explicar el hecho de que las formulaciones con GA son en las que presentan los menores valores de IS.

Las micrografías de la **figura 6.7** muestran diferencias en las matrices formadas por los diferentes agentes encapsulantes, es evidente que las matrices de los polímeros con mayor Ea forman microcápsulas más lisas y grandes.

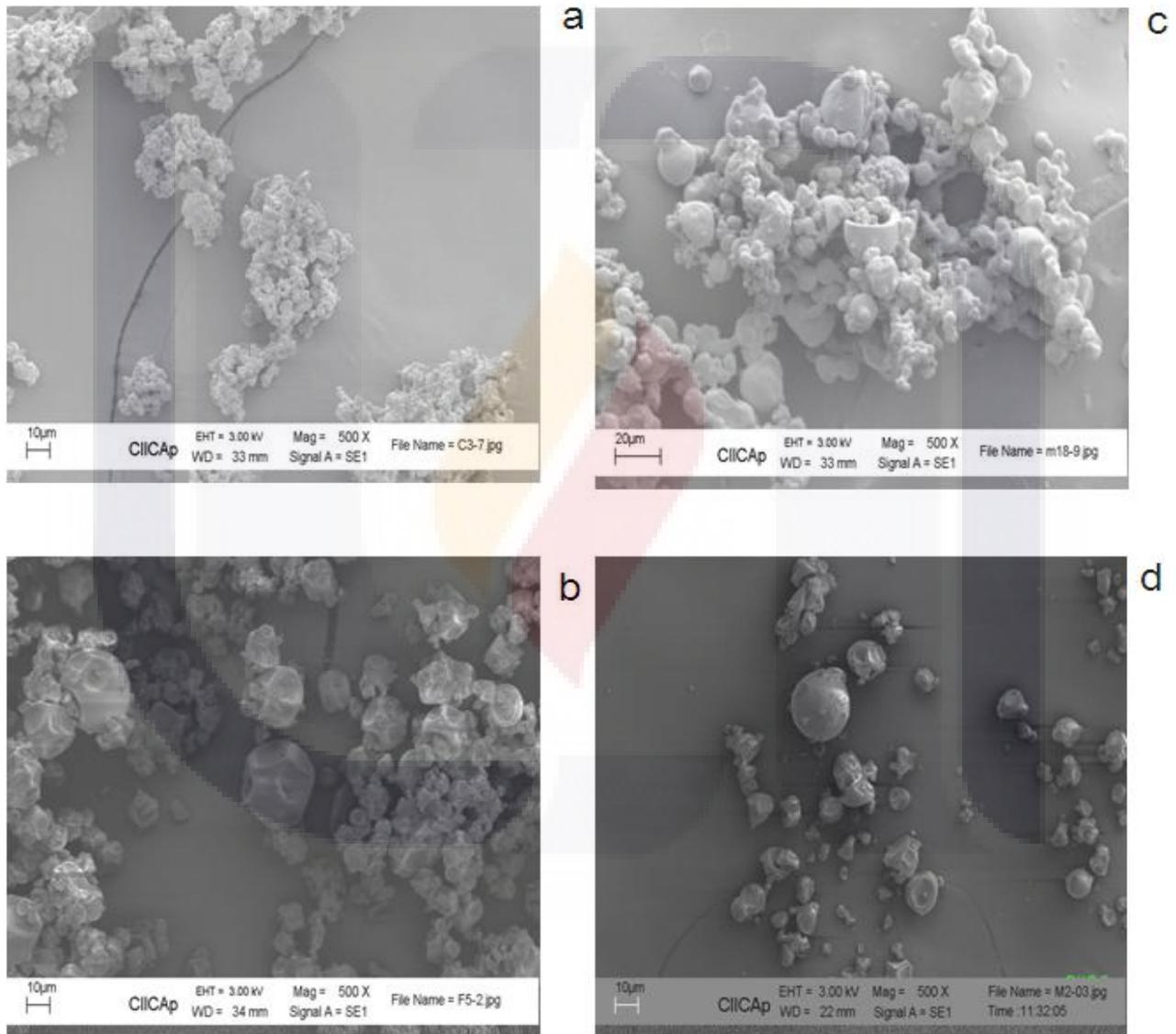


Figura 6.7. Morfología de las partículas de esporas de *T. harzianum* obtenidas mediante secado por aspersión con o sin matriz encapsulante a TE = 150°C y TS = 90°C. a) Esporas libres, b) Microcápsulas con GA, c) Microcápsulas con MD10 y d) Microcápsulas con MD10-GA. El aumento es 500x

6.3 Evaluación del efecto de la energía de activación y las temperaturas de almacenamiento en la sobrevivencia de esporas de *T. harzianum*.

Los valores de actividad de agua de los diferentes formulados después del secado estuvieron en el rango de 0.30 a 0.40, que se encuentran en el intervalo que es el adecuado para incrementar la vida de anaquel de las esporas deshidratadas de *T. harzianum*, como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación (Fernández-Sandoval et al., 2012)

La SA de las esporas de *T. harzianum* no encapsuladas disminuye significativamente después de 4 semanas de almacenamiento tanto a 4°C como a 29°C, como puede observarse en la **figura 6.8 y 6.9**; no obstante, cuando se usa un material encapsulante la SA disminuye hasta después de las 8 semanas de almacenamiento. Se observa una relación directa entre SA y la Ea de la matriz encapsulante a ambas temperaturas de almacenamiento y los formulados con la matriz de MD10-GA mostraron la SA más alta. En cuanto al efecto de la temperatura se observa que las muestras almacenadas a 4°C mantuvieron una viabilidad mayor que aquellas almacenadas a 29°C en el mismo intervalo de tiempo.

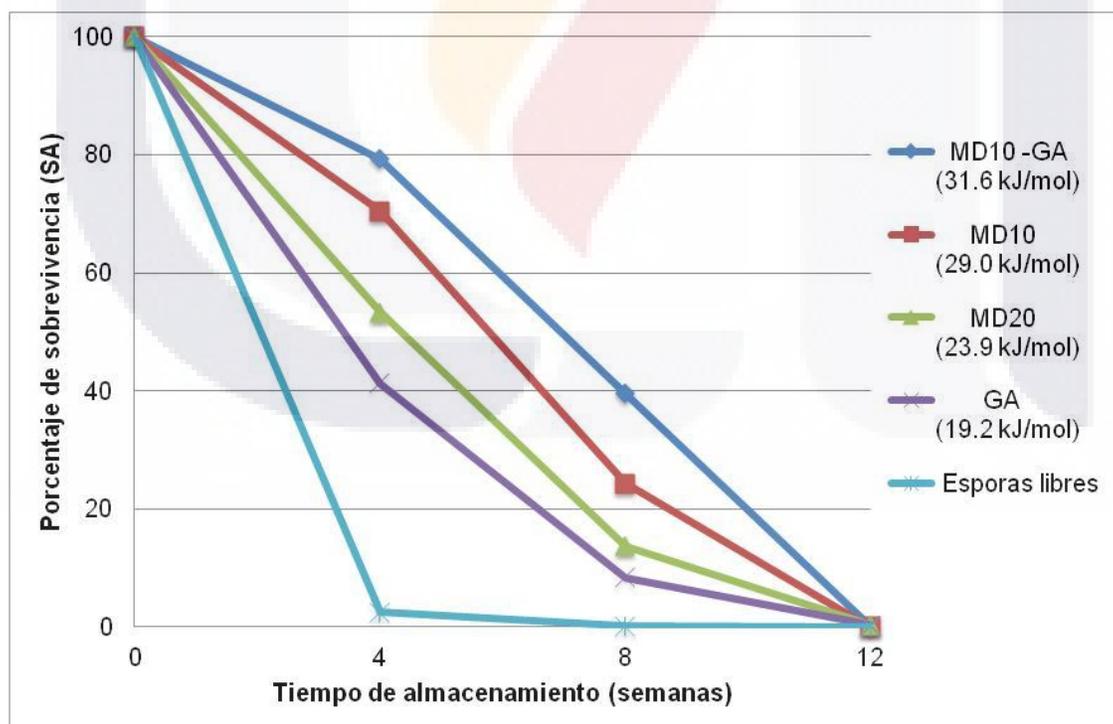


Figura 6.8. Efecto de la energía de activación en el porcentaje de sobrevivencia (SA) de esporas de *T. harzianum* almacenadas a 4°C.

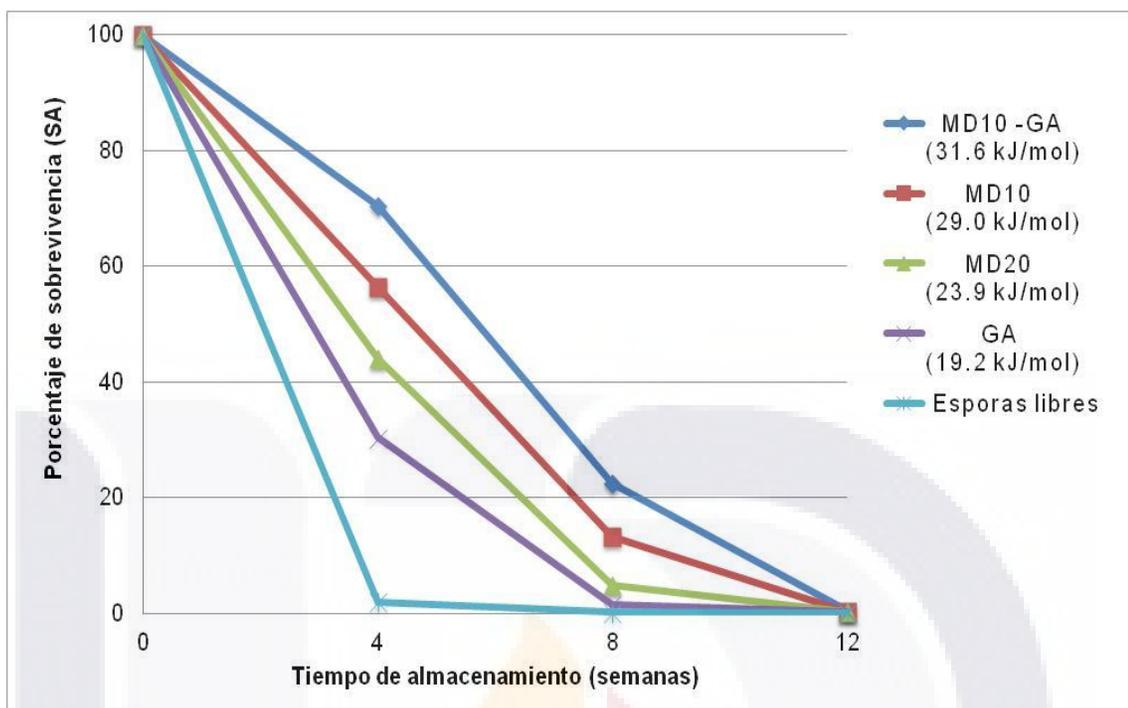


Figura 6.9. Efecto de la energía de activación en el porcentaje de sobrevivencia (SA) de esporas de *T. harzianum* almacenadas a 29°C

El uso de la mezcla MD10-GA permitió alcanzar una SA de 40% en las esporas después de ocho semanas almacenadas a 4°C, lo que significa un incremento en la SA de 330 veces con respecto a las esporas no encapsuladas. Por otro lado, al almacenar el mismo formulado a 29°C solo se alcanzó una SA de 23%, que representa un incremento de 150 veces con respecto a las esporas no encapsuladas y almacenadas a la misma temperatura.

Después de 8 semanas de almacenamiento la SA de todos los formulados disminuyó siguiendo un patrón similar al que mostraron las esporas no encapsuladas después de las 4 semanas de almacenamiento; estos resultados parecen indicar que las matrices encapsulantes retrasan la difusión de oxígeno al interior de las microcápsulas, al menos por 8 semanas, lo que disminuye la concentración de oxígeno disponible para participar en la oxidación de macromoléculas y causar el estrés oxidativo.

La viabilidad de las esporas fue mayor en las muestras almacenadas a 4°C que en aquellas almacenadas a 29°C, esto puede deberse a que a esta última temperatura se tenga una mayor reactividad y difusividad de las ERO intracelulares. A 4°C la pérdida en la viabilidad después de las 8 semanas de almacenamiento, pudo deberse a un incremento en la actividad

metabólica, ya que la A_w incrementó hasta valores de 0.8 – 0.9. El incremento en la actividad metabólica puede ser acompañado por limitación de nutrientes y/o oxidación de macromoléculas. Por lo anterior se podría evaluar el control de la actividad de agua en el almacenamiento a bajas temperaturas, para alcanzar valores más altos de sobrevivencia.

6.3.1 Sobrevivencia de esporas de *T. harzianum* en función de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares

En la **tabla 6.2** y la **figura 6.10** se muestra la relación entre la sobrevivencia al almacenamiento (29°C por 12 semanas) y la concentración intracelular de ERO. Se muestran los valores de ERO y SA para las esporas microencapsuladas en MD10-GA y para las no encapsuladas. Como era de esperarse la concentración inicial de ERO fue similar para ambas muestras. Sin embargo, la concentración de ERO incrementa mucho más rápido en las esporas sin encapsular que en aquellas encapsuladas en la matriz de MD10-GA. Después de 8 semanas de almacenamiento se alcanza una concentración de ERO crítica (>6 nM ERO/ 10^6 células) y la SA de las esporas decrece significativamente.

Tabla 6.2. Sobrevivencia y concentración de ERO de esporas de *T. harzianum* encapsuladas (MD10-GA) y no encapsuladas durante el almacenamiento a 29°C

t (semanas)	SA	\log_{10} (UFC/gr)	nm ROS/ 10^6 células
MD10 – GA			
0	100.0	8.67 ± 0.04	5.07 ± 0.28
4	69.8 ± 2.0	8.50 ± 0.08	7.09 ± 0.30
8	22.5 ± 0.2	7.05 ± 0.07	21.01 ± 0.64
12	1.32 ± 0.3	4.96 ± 0.09	33.94 ± 0.53
No encapsuladas			
0	100	8.93 ± 0.14	4.78 ± 1.21
4	6.07 ± 0.23	6.07 ± 0.23	10.27 ± 0.76
8	3.77 ± 0.38	3.77 ± 0.38	24.78 ± 0.69
12	1.79 ± 0.13	1.79 ± 0.13	35.12 ± 6.89

Se puede observar en la **figura 6.10** que cuando la concentración de ERO excede 7nM ERO/ 10^6 esporas la sobrevivencia en todos los tratamientos se reduce severamente. Estos resultados sugieren que la microencapsulación funciona como una barrera de protección contra

la difusión de oxígeno al interior de las esporas, lo que reduce el estrés oxidativo e incrementa la vida de anaquel de las esporas de *T. harzianum*

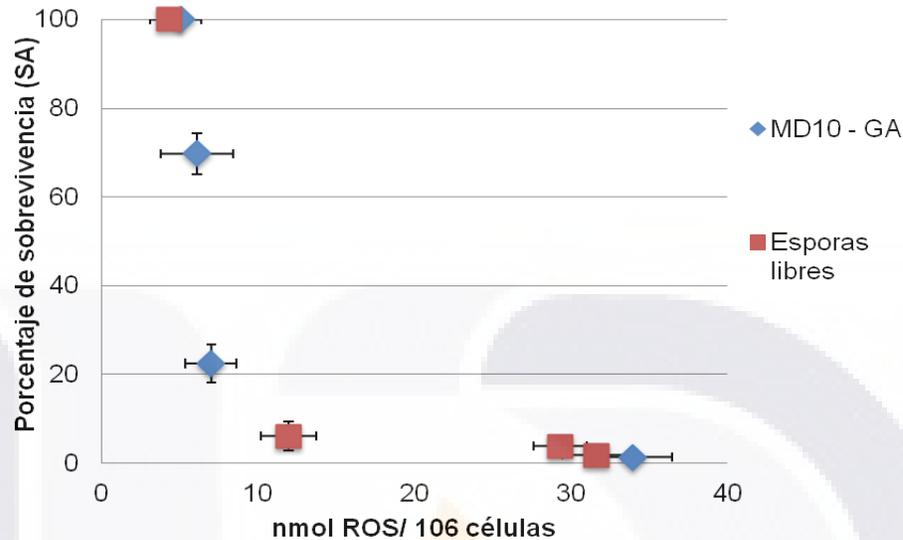


Figura 6.10 Sobrevivencia de esporas de *T. harzianum*, almacenadas a 29°C, como función de la concentración intracelular de ERO. (♦) Conidia microencapsuladas en MD10 – GA (■) Esporas no encapsuladas.

El comportamiento de la sobrevivencia de las esporas y de la concentración intracelular de ERO, parece soportar la hipótesis de que el estrés oxidativo es la principal causa de muerte en el almacenamiento.

6.4 Evaluación de la adición de un antioxidante en la formulación de esporas de *T. harzianum* microencapsuladas mediante secado por aspersión en la sobrevivencia durante el almacenamiento.

Con el fin de disminuir la pérdida de la viabilidad en el almacenamiento se evaluó la adición de ácido ascórbico como antioxidante, se mantuvieron en contacto las esporas con la solución de ácido ascórbico por dos horas y posteriormente se realizó la formulación con la mezcla MD10-GA y se secó a una TE=150°C y TS = 90°C.

En la **figura 6.11** se observa el comportamiento de la viabilidad (a), expresada como UFC/ gr, y de la concentración intracelular de ERO (b), es evidente que la adición de ácido ascórbico a esta concentración no tiene un efecto significativo en la disminución de las ERO y

por ende tampoco sobre la viabilidad. Aún más, los valores obtenidos de sobrevivencia y de ERO intracelulares en la formulación con ácido ascórbico, no tienen una diferencia significativa con los valores que se obtienen en las esporas formuladas sin el antioxidante, De lo anterior se puede observar que es probable que el proceso de microencapsulación si contenga la difusión. Sin embargo, los experimentos realizados no permiten elucidar si efectivamente la oxidación se debe a la difusión de oxígeno al interior de la célula o a las ERO que se generan de manera natural en la célula y que ya están presentes antes del secado.

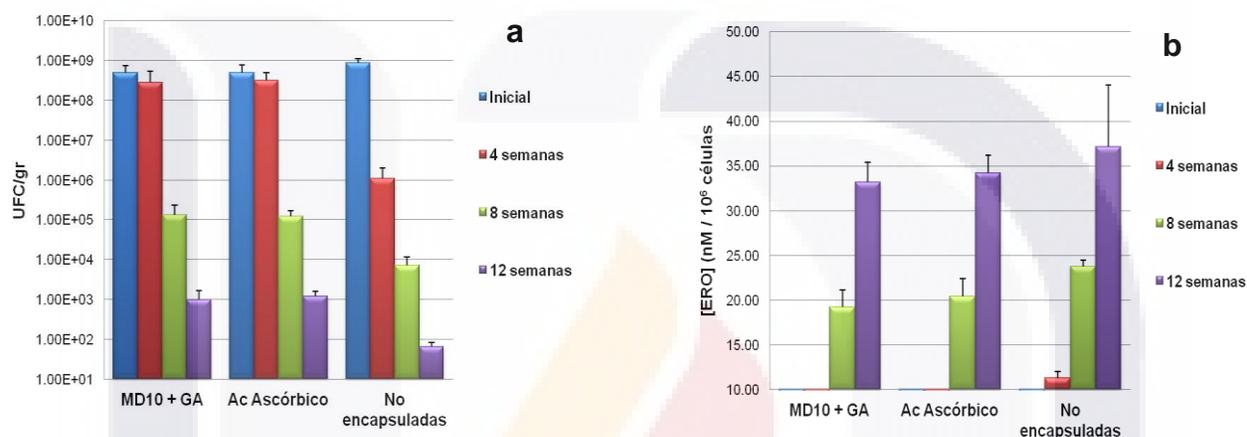


Figura 6.11 (a) Sobrevivencia de esporas de *T. harzianum*, microencapsuladas en una matriz MD10-GA con o sin la adición de antioxidante en la formulación y almacenadas a 29°C, (b) Evolución de la concentración de ERO en esporas de *T. harzianum*, microencapsuladas en una matriz MD10-GA con o sin la adición de antioxidante en la formulación y almacenadas a 29°C

En la bibliografía hay pocos reportes sobre el uso de antioxidantes en formulaciones de microorganismos, Ying y colaboradores (2011) reportan el uso de ascorbato de sodio y tocoferol para aumentar la sobrevivencia de *L. rhamnosus* GG, estos autores reportan que mientras el tocoferol aumenta considerablemente la vida de anaquel de los lactobacilos, el ascorbato presenta un efecto negativo sobre la misma, lo que podría deberse a que las bacterias degradan el ascorbato en derivados del ácido acético que funcionan como agentes oxidantes. En 2003, Soares, et. al., reportan el efecto protector de seis diferentes antioxidantes sobre células de *S. cerevisiae*, sometidas a estrés oxidativo, generado por diferentes compuestos oxidantes, estos autores reportan que los seis compuestos presentan un efecto protector contra la oxidación, estos estudios están elaborados en sistemas modelo con fuertes oxidantes, por lo que sería conveniente evaluar el uso de estos compuestos en las formulaciones.

7. CONCLUSIONES

- La E_a de activación y las temperaturas de proceso son los principales factores que incrementan la viabilidad de las esporas de *T. harzianum* durante el secado.
- La combinación del uso de la mezcla de MD10-GA, el polímero con mayor E_a y altas temperaturas de proceso ofrece la mejor protección a las esporas de *T. harzianum* durante el secado, lo que lleva a incrementar de 11 veces la sobrevivencia de éstas con respecto a las esporas no encapsuladas
- El principal daño en las esporas durante el proceso de secado es el daño en la membrana celular, sin embargo, existe una pequeña proporción de esporas que aun cuando conservan la integridad de membrana aparentemente pierden la actividad metabólica.
- A las 8 semanas de almacenamiento se logra incrementar hasta 330 veces la sobrevivencia de las esporas si se combina el uso de baja temperatura de almacenamiento y la microencapsulación con la mezcla MD10-GA, que es la matriz con mayor E_a .
- La pérdida de viabilidad en el almacenamiento a 29°C se debe aparentemente a la oxidación de las macromoléculas; mientras que a 4°C se debe a una combinación de la oxidación y del incremento en la actividad metabólica de las esporas
- Concentraciones intracelulares de ERO por arriba de $6 \mu\text{M}/10^6$ células en los formulados desencadenan las reacciones de oxidación lo que ocasiona la pérdida de viabilidad en las esporas de *T. harzianum* durante el almacenamiento a 29°C.

8. PERSPECTIVAS

- Hacer uso de atmósferas libres de oxígeno para poder determinar si los fenómenos oxidativos que se presentan en el almacenamiento a 29°C después de 8 semanas se deben a la difusión de oxígeno al interior de la célula o si las ERO intracelulares son las que los desencadenan.
- Evaluar el uso de antioxidantes como el resveratrol y el tocoferol para prevenir el desencadenamiento de las reacciones de oxidación en el almacenamiento.
- Determinar el efecto de combinar el almacenamiento a bajas temperaturas con el control de A_w durante el mismo, para aumentar la sobrevivencia en el almacenamiento.

9. GLOSARIO

Manejo integrado de Plagas: Estrategias alternativas para combatir a las plagas buscando disminuir al mínimo los efectos negativos al ecosistema, considerando los aspectos toxicológicos, ecológicos y económicos que influyen en el control de plagas.

Control biológico: Uso de microorganismos y/o sus metabolitos para el control de plagas y/o enfermedades

Agente de control biológico: Microorganismos utilizados con rendimientos elevados en el control de plagas en la agricultura.

Esporas: Estructuras de resistencia generadas por algunos microorganismos la ser sometidas a algún tipo de estrés.

Deshidratación: Eliminación de agua de un material por diferentes mecanismos.

Actividad de agua: Relación entre la presión de vapor de agua en un material y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura

Secado por aspersión: Operación unitaria en la que se transforma un producto desde un estado líquido hasta un estado pulverizado.

Especies reactivas de oxígeno: Especies químicas formadas por la reducción incompleta del oxígeno.

Microencapsulación: Proceso mediante el cual partículas (núcleo) son rodeadas por una cubierta (pared), homogénea o heterogénea, para producir microcápsulas con diferentes propiedades funcionales.

Energía de activación: Medida de la energía que se requiere para eliminar cierta masa de agua del material a secar.

Esporas viables: Son aquellas que son capaces de generar estructuras vegetativas (micelio) después de ser sometidas a algún tipo de estrés.

Antioxidante: Sustancias que pueden proteger a las macromoléculas de los efectos de los radicales libres

10. BIBLIOGRAFIA

- Abadías, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., and Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol agent *Candida sake*. **Journal of Applied Microbiology**, 89: 1009-1017.
- Agosin, E. and Aguilera, J.M. (1998). Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. **En: Trichoderma & Gliocladium. Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications.** G.E. Harman and C.P. Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd, Bristol, USA. pp. 205-228.
- Aguilera, J.M. and Karel, M. (1997). Preservation of biological materials under desiccation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 37(3): 287-309.
- Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, 15: 399-409.
- Assaraf, M.P., Ginzburg, C. and Katan, J. (2002). Weakening and delayed mortality of *Fusarium oxysporum* by heat treatment: Flow cytometry and growth studies. **Mycology**, 92: 956-963
- Batta, Y.A. (2004). Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* rifai formulated in invert emulsión on postharvest decay of apple blue mold. **International Journal of Food Microbiology**, 96: 281-288.
- Bayrock, D. and Ingledew, W. M. (1997). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. **Food Research International**, 30: 417-425.
- Billi, D. and Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. **Research in Microbiology**, 153: 7-12.
- Blaszyck, M., Blank, G., Holley, R., and Chong, J. (1998). Reduced water activity during sporogenesis in selected penicillia: impact on spore quality. **Food Research International**, 6:503-509.
- Boza, Y., Barbin, D., Scamparini, R. D. (2004). Survival of *Beijerinckia* sp. Microencapsulated in carbohydrates by spray drying. **Journal of Microencapsulation**. 21:15-24.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y. (1991). The freeze drying of lactic bacteria. A review. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, 24:118-128.
- Charnley, A.K. (1991). Microbial pathogens and insect pest control. **Letters in Applied Microbiology**, 12:149-157.
- Chen, T., Fowler, A. and Toner, M. (2000). Supplemented phase diagram of the trehalose-water

- binary mixture. **Cryobiology**, 40:277-282.
- Chet, I., Ibar, J. and Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. **En: Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. Wicklow DT and Soderstrom B, (eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton. C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, 96: 1024-1039.
- Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1982). Induction of anhydrobiosis: membrane changes during drying. **Cryobiology**, 19: 317-328.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, 54: 579-599.
- Crowe, L.M., Reid, D.S. and Crowe, J.H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials?. **Biophysical Journal**, 71: 2087-2093.
- Crowe, L.M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 131: 505-513.
- Desai, K.G.H. and Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, 23: 1361-1394.
- Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, 93: 1003-1011.
- Elzein, A., Kroschel, J. and Müller-Stöver, D. (2004). Optimization of storage conditions for adequate shelf –life of Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* Foxy 2, a potencial mycoherbicide for striga: effects of temperature, granule size and water activity. **Biocontrol Science and Technology**, 14: 545-559.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, 186: 407-421.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, 11: 81-128.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M.E. and Candela, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). **Anales de Biología**, 26: 35-45.
- Fávaro-Trindade, C.S. and Grosso, C.R.F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05)

- and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in the bile. **Journal of Microencapsulation**, 19: 485-494.
- Fennema, O.R. (1996). Water and ice. **En: Food Chemistry**. Owen R. Fennema (eds.), 3era.edición. Marcel Dekker Inc. pp. 30-56.
- Fernández-, M.T. (2006). Estudio de los factores de daño celular presentes durante el secado y almacenamiento de esporas de *Trichoderma harzianum*. **Tesis de maestría**. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Fernández-Sandoval, M. T., Ortiz-García, M., Galindo, E., and Serrano-Carreón, L. (2012). Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. **Process Biochemistry**. 47:186–194.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 43: 337-359.
- Grant, W.D. (2004). Life at low water activity. **Philosophical Transactions. The Royal Society of London**, 359: 1249-1267.
- Gharsallaoui, A., Roudant, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray – drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research Internacional**
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, 15: 330-347.
- Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P., and De Cal, A. (2006). Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia spp.* **Biocontrol Science and Technology**. 16: 257–269.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Microbiology**, 2: 43-56.
- Herrera-López, J. Pérez-Jiménez, M., Llobel, A., Monte-Vázquez, E., and Zea-Bonilla, T. (1999). Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, 5:261-265.
- Hjeljord, L.G. and Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. **En: Trichoderma and Gliocladium**, Vol 2, Harman, G.E., and Kubicek, (eds)., Taylor and Francis, London, pp. 131-151.
- Hokkanen, H.M.T. (2007). Ten years of Biocontrol. **Biocontrol**, 52: 1-7.
- Horaczek, A and Viernstein H. (2004a). *Beauveria brongniartii* subjected to spray drying in a composite carrier matrix system. **Journal of Microencapsulation**. 21:317-330.

- Horaczek A. and Viernstein H. (2004b). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, 31:65-71.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Diseases**, 87: 4–10.
- Hutter, W., Werner, L., Peter, I. and Hempel, W. (1995). Spray drying of the dehalogenating bacterium *Rhodococcus sp.* **Bioprocess Engineering**, 13:19-21.
- Jenkins, N.E. and Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance. **Biocontrol Science and Technology**, 10: 753-777.
- Jin, X., & Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. **Biological Control**, 56: 202–208.
- Jin, X., Harman, G.E. and Taylor, A.G. (1991). Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. **Biological Control**, 1:237-243.
- Jin, X., Taylor, G. and Harman, G.E. (1996). Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, 7: 267-274.
- Judie D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, 136-144.
- King A.H. (1995). Encapsulation of food ingredients: A review of available technology focusing on hydrocolloids. **En: Encapsulation and Controlled Release for Food Ingredients**. Isch S.J. y Reineccius G.A. (eds). Chap. 3 ACS Symp. Ser.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, 30(6): 620-650.
- Larena, I., De Cal, A., Liñán, M., and Melgarejo, P. (2003). Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, 94: 508–514.
- Larena, I., Melgarejo, P., and De Cal, A. (2003). Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, 151: 600–606.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., and Bondys, S.C. (1992). Evaluation of the Probe 2-,7_-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research Toxicology**, 5: 227–231.

- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 3592-3597.
- Lian, W.C., Hisao, H.C. and Chou, C.C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solutions. **International Journal of Microbiology**, 86: 293-301.
- Lievense, L.C., and van't Riet, K. (1993). Convective drying of bacteria I. The drying process. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 50:45-63.
- Liu, C. P., & Liu, S. D. (2009). Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA12. **Journal of Microencapsulation**, 26: 377–384.
- Maltini, E., Torreggiani, D., Venir, E. and Bertolo, G. (2003). Water activity and the preservation of plant foods. **Food Chemistry**, 82: 79-86.
- Matsuno, R. and Adachi, S. (1993). Lipid encapsulation technology – Techniques and applications to food. **Trends in Food Science & Technology**, 4: 256-261.
- Marr, K., Koudadoust, M., Black, M. and Arunmpzhi-Balajee, S. (2001). Early events in macrophage Killing of *Aspergillus fumigates* conidia: New flow cytometric viability assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 8: 1240-1247.
- McHugh, I. O. L. and Tucker A. L. (2007). Flow cytometry for the rapid detection of bacteria in cell culture production medium. **Cytometry Part A**. 71: 1019-1026.
- Millard, P. J., Roth B. L., Truong-Thi H-P., Yue S-T., and Haugland, R. P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**. 63: 2897–2905.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. and Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, 66: 183-193.
- Muñoz, G.A., Agosin, E., Cotoras, M., San Martín, R. and Volpe, D. (1995). Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, 125: 63-70.
- O’Riordan, K., Andrews, D., Bucle, K. and Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of Applied Microbiology**, 91: 1059-1066.
- Papavizas, G.C., Lewis, J.A. and Add-Elmoity T.H. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, 72: 126-132.

- Papavizas, G. C., Dunn, M.T., Lewis, J.A. and Beagle-Ristaino.(1984). Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology**, 74 (10):1171-1175.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 80:627-630.
- Pedreschi, F., and Aguilera, J.M. (1997). Viability of *Trichoderma harzianum* spores under storage. **Bioprocess Engineering**, 17: 177-183.
- Pedreschi, F., Aguilera, J.M., Agosin, E. and San Martín R. (1997). Induction of trehalose in spores of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Bioprocess Engineering**, 17: 317-322.
- Pérez-Alonso, C., Baez-González, J.G., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J., Vizcarra-Mendoza, M.G. 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall materials for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, 53: 197-203.
- Perry, R.H., and Green, D.W. (1997). Perry's Chemical Engineers' Handbook (7th edition). McGraw Hill. 24: 13-15.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of procaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 58: 755-805.
- Reineccius, G.A. (1988). Spray-drying of food flavors. En: G.A. Reineccius & S.J. Risch (Eds.), *Flavor encapsulation*, American Chemical Society, Washington, D.C., U.S.A. pp. 55-66.
- Ré, M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology** 16: 1195-1236.
- Risch S.J. (1995). Encapsulation: overview of uses and techniques. **En: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. Risch, S.J. y Reineccius, G.A. (eds). Cap. 1. ACS Symp. Ser 590.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L.A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J. and Vernon-Carter, E.J. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, 40: 1299-1306.
- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, 98: 1410-1417.
- Shahidi F. and Han X. (1993). Encapsulation of Food ingredients. **Critical Reviews in Food Science Nutrition** 33 (6):501-547.

- Sid Ahmed, A., Pérez Sánchez, C. and Candela, M.E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 817-824.
- Soares, D.G., Andreatza, A.C. and Salvador, M. (2003). Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 1077-1080.
- Talwakar, A., Millar, C.W., Kailasapathy, K. And Nguyen, M.H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria. **International Journal of Food Science Technology**, 39: 605-611.
- Teixeira, P.C., Castro, H., Malcata, F.X. and Kirby, R. (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus* following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, 78: 1025- 031.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. and Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma sp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antoine van Leeuwenhoek**, 81:549-556.
- Wang, H., Chang, K.F., Hwang, S.F., Turnbull, G.D., Howard, R.J., Blade, S.F. and Callan N.W. (2005). *Fusarium* root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides. **Biocontrol**, 50:317-329.
- Weinbreck, F., Bodnár, I., and Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, 136: 364–367.
- Yedida, I., Benhamou, N. and Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 1061-1070.
- Ying, D.Y., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Singh, T.K., Freimüller-Leischfeld, S., Gantenbein-Demarchi, C. and Augustin, M.A. (2011). Tocopherol and ascorbate have contrasting effects on the viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59: 10556–10563.
- Zhonghu ,B., Harvey, L.M. and McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of fungi. **Critical Reviews in Biotechnoogy**, 23: 267-302.

11. ANEXOS

11.1 Metodología para la determinación de la energía de activación de los materiales encapsulantes

Para obtener los valores de energía de activación (E_a) de los diferentes agentes encapsulantes y de las mezclas de los mismos, se utilizó la metodología reportada por Pérez Alonso, et al., (2003).

11.1.1 Secado isotérmico de los agentes encapsulantes y mezclas

Los datos experimentales de secado isotérmico fueron obtenidos con el equipo de análisis termogravimétrico, TGA 2950 de TA-Instrument (New Castle, DE, EUA) y permitió alcanzar las condiciones experimentales en la cámara de secado. Se colocó una muestra de 15 a 20 mg de cada solución de agente encapsulante en el horno del equipo y las soluciones fueron secadas a 50, 60, 70 y 80 °C, durante 90 min se utilizó nitrógeno como gas de purga con un flujo de 100 cm³/min. Los datos que se obtuvieron fueron la pérdida de peso con respecto al tiempo y la temperatura, así como la derivada de la pérdida de peso con respecto al tiempo.

11.1.2 Encogimiento volumétrico

Se determinó el encogimiento volumétrico, durante el secado isotérmico, de una gota de biopolímero como función del contenido de humedad. Se utilizó un sistema de análisis de imagen, que contiene el software Image-Pro plus (Media Cybernetics) versión 4.5, acoplado a un microscopio óptico Olympus (modelo BX45) y una cámara digital Olympus C-3030.

El encogimiento volumétrico de una gota de soluciones acuosas al 60% (p/p) de agente encapsulante para MD-10 y MD 20 así como las mezclas MD10-GA y MD20-GA y del 40% (p/p) para GA, como función del contenido de humedad (X) fue determinado utilizando el siguiente procedimiento: (1) una gota de una solución acuosa de cada agente encapsulante se colocó en un portaobjetos modificado, (2) se tomaron fotografías de los planos X-Y, X-Z y Y-Z de la gota (que exhibieron una forma elipsoidal), para obtener el área (S_i) para cada plano considerando el área de una semielipse (área medida = área elipse/2) para los planos X-Z (área, S_2) y Y-Z (área, S_3); para el plano X-Y (área, S_1) el área medida es igual al área de una elipse; con estas áreas se calcula el volumen de un elipsoide ; (3) el área de cada plano fue calculada con un software de un analizador de Imágenes Image-Pro plus (Media Cybernetics)

versión 4.5, acoplado a un microscopio óptico Olympus (modelo BX45) y una cámara digital; (4) con estas áreas, se calculó el volumen de un elipsoide y se igualó al de una esfera; (5) los pasos 1 a 4 se repitieron durante el secado isotérmico de la gota a intervalos de aproximadamente 10% en la disminución del contenido de humedad (determinado por la pérdida de masa de la gota), el secado se llevó a cabo en una estufa a 60 °C con convección forzada; (6) el encogimiento volumétrico promedio (V) [m^3] fue obtenido de la gráfica de V (relación V , el volumen de la gota a un contenido de humedad dado y V_0 , volumen inicial de la gota) contra el contenido de humedad. Los puntos experimentales se ajustaron a una función polinomial.

11.1.3 Determinación del coeficiente de difusión efectivo

Se determina mediante el método propuesto por Raghavan, Tulasidas y Ramaswamy (1995), el cual aplica una solución analítica para la segunda ley de Fick para una geometría esférica isotrópica y considerando una concentración constante de humedad en la superficie y que hace uso de la ecuación:

$$M = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left[-n^2 \pi^2 D_{\text{eff}} \frac{t}{[R(X)]^2}\right]$$

Donde M es el radio de humedad, X es el contenido de humedad a un tiempo t [$\text{kg H}_2\text{O}/\text{kg ss}$], X_0 y X_e son el contenido de humedad inicial y en el equilibrio [$\text{kg H}_2\text{O}/\text{kg ss}$] y $R(X)$ es el radio de la gota de solución de agente encapsulante expresado en función del contenido de humedad.

11.1.4 Determinación de la Energía de activación

La E_a se determinó calculando la D_{ef} para cada agente encapsulante, la cual presenta una dependencia de la temperatura, que puede ser descrita por la ecuación de Arrhenius.

$$D_{\text{ef}} = D_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

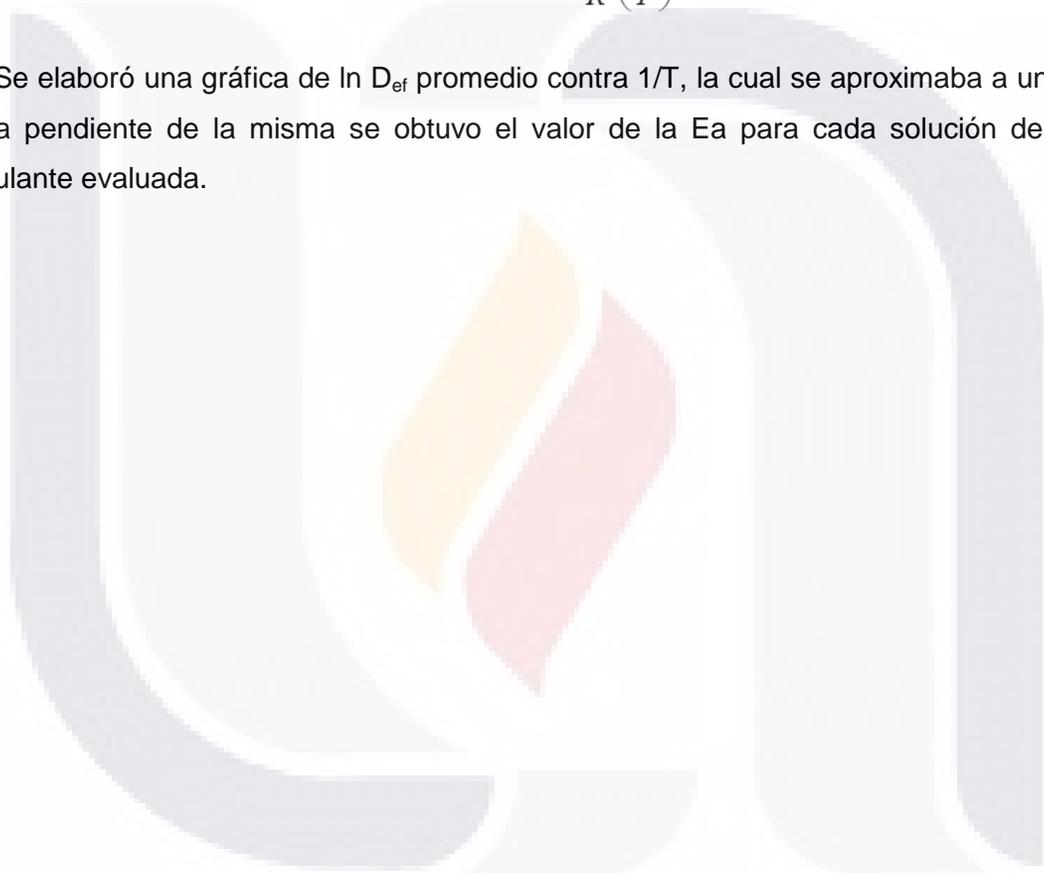
Para utilizar esta ecuación fue necesario calcular una difusividad promedio a partir de las gráficas de X vs D_{ef} , obtenidas para cada material y cada temperatura. Para calcular la D_{ef} promedio se utilizó la siguiente ecuación:

$$\overline{D_{ef}} = \frac{\int_{X_{inicial}}^{X_{final}} D_{ef}(X) dX}{\int_{X_{inicial}}^{X_{final}} dX}$$

Con éste procedimiento se calculó D_{ef} promedio para todas las muestras a temperatura de 50, 60, 70 y 80 °C. Para encontrar la energía de activación se linealizó la ecuación (1) y se obtuvo la ecuación de una línea recta:

$$\ln \overline{D_{ef}} = \ln D_o - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Se elaboró una gráfica de $\ln D_{ef}$ promedio contra $1/T$, la cual se aproximaba a una recta, y con la pendiente de la misma se obtuvo el valor de la E_a para cada solución de agente encapsulante evaluada.







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices

Ana Laura Muñoz-Celaya^{a,b}, Myriam Ortiz-García^a, Eduardo Jaime Vernon-Carter^c, Juan Jauregui-Rincón^b, Enrique Galindo^a, Leobardo Serrano-Carreón^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México

^b Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes, 20100, México

^c Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco #186, Col. Vicentina, México, D.F., 09340, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2011
Received in revised form 6 December 2011
Accepted 15 December 2011
Available online 24 December 2011

Keywords:

Microencapsulation
Biopolymers
Biological control
Trichoderma harzianum
Conidia
Activation energy

ABSTRACT

Microencapsulation of biological control agents in biopolymer matrices by spray-drying is a valuable alternative to produce formulations with extended shelf-life. In this work, *Trichoderma harzianum* conidia were microencapsulated in: maltodextrin DE10 (MD10), maltodextrin DE20 (MD20), gum Arabic (GA), and a 1:1 weight blend of MD10–GA. The effect of spray-drying inlet and outlet air temperatures, and the activation energy (E_a) of the biopolymers on the survival of *T. harzianum* conidia was evaluated. The highest conidia survival after spray-drying (86%) and after 8 weeks of storage at 4 °C (40%), were obtained with the MD10–GA biopolymer matrix (with the highest $E_a = 31.6 \text{ kJ mol}^{-1}$). Such survivals were 11 and 330-fold times higher than those of non-encapsulated conidia, respectively. The evolution of reactive oxygen species (ROS), as a measure of oxidative stress, during storage at 29 °C was assessed. An inverse relationship was found between the conidia survival and ROS concentration during storage.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Different authors have shown that *Trichoderma harzianum* can be used to attack pathogenic plant fungi, such as *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* (Batta, 2004; Fravel, 2005; Wang et al., 2005). The mechanisms involved in *Trichoderma* spp. control of fungal pathogens are mycoparasitism, nutrient competition, rhizosphere competence, cell-wall degrading enzymes production, as well as induced defense responses in plants (Howell, 2003). A biological control product, able to compete commercially with chemical products, must have a minimum shelf life of 1–2 years at room temperature (Abadias, Teixidó, Usal, Viñas, & Magan, 2000; Pedreschi & Aguilera, 1997). Thus, dehydrated fungal formulations are attractive because of their long stability, easy handling and storage at room temperature (Pedreschi & Aguilera, 1997).

T. harzianum produces three kinds of propagules that can be used in formulations: hyphae, chlamydospores and conidia (Howell, 2003). The use of hyphae is not an option due to its lack of resistance to dehydration. Conidia and chlamydospores withstand adverse

environmental conditions, which made them the natural choice as propagules in formulations (Jin, Harman, & Taylor, 1991; Papavizas, 1985). There are several products in the market using *T. harzianum* conidia as active ingredient, obtained either by two-phase solid fermentation or liquid fermentation. However, in both cases the biomass must be dried to obtain a stable product with prolonged shelf-life (Jin, Hayes, & Harman, 1992). Among the different drying techniques for large scale production of microorganisms containing dried powders, spray-drying is preferred due to his low cost (Morgan, Herman, White, & Vesey, 2006). The use of spray-drying can produce cellular damage as result from the elevated temperature, dehydration and oxidation of macromolecules during storage (Ananta, Volkert, & Knorr, 2005; França, Panek, & Eleutherio, 2007; Horaczek & Viernstein, 2004a, 2004b; Molina & Anchoadoquy, 2008; Teixeira, Castro, & Kirby, 1996). Previous studies in our lab have shown that *T. harzianum* conidia had a low thermal inactivation energy ($39.15 \text{ kcal mol}^{-1}$) making them susceptible to heat damage of the cellular membrane when spray-dried (Fernández-Sandoval, Ortiz-García, Galindo, & Serrano-Carreón, 2012). Also the stored dried conidia showed an inverse relationship between conidia survival and oxidative stress, evaluated as the intracellular malondialdehyde concentration.

Microencapsulation is defined as a process in which tiny particles or droplets are surrounded by a coating, or embedded in

* Corresponding author. Tel.: +52 777 3 29 16 30; fax: +52 777 3 17 23 88.
E-mail address: leobardo@ibt.unam.mx (L. Serrano-Carreón).

a homogeneous or heterogeneous matrix, to give small capsules with many useful properties (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007) and is used by several researchers to provide living cells with a physical barrier against the external environment (Riordan, Andrews, Buckle, & Conway, 2001; Ross, Desmond, Fitzgerald, & Stanton, 2005). The microcapsule may consist of a core surrounded by a wall or barrier of uniform or non-uniform thickness, which can be formed by one or more polymers (Krishnan, Kshirsagar, & Singhal, 2005). The use of microencapsulation for probiotics such as *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp. has been reported (Ananta et al., 2005; Corcoran, Ross, Fitzgerald, & Stanton, 2004; O’Riordan et al., 2001; Rodríguez-Huezo et al., 2007; Ross et al., 2005). For biological control agents, microencapsulation has been tested in *Beauveria brongniartii*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia which are used as bioinsecticides (Horaczek & Viernstein, 2004a, 2004b; Liu & Liu, 2009a, 2009b). Recently, Jin and Custis (2011) reported that drying *T. harzianum* conidia in presence of 2% of sucrose at inlet/outlet temperature of 61/31 °C, increased their survival by a factor of three compared with non-encapsulated conidia. However, in practically all of these reports, the encapsulation matrix and drying temperatures selection were done by trial and error procedures, in which the wall materials were selected arbitrarily (Pérez-Alonso, Báez-González, Beristain, Vernon-Carter, & Vizcarra-Mendoza, 2003). This procedure is time-consuming and expensive. Although the choice of encapsulation matrix for spray-dried microorganisms has led to effective results, a systematic approach has not been taken. Matsuno and Adachi (1993) reported that materials that exhibited drying curves characterized by an early decreasing drying rate, where water evaporation was controlled by diffusion mechanisms, provided best protection oxidation. However, it is difficult to discriminate between materials showing similar drying curves. Pérez-Alonso et al. (2003), proposed a method for estimating the activation energy (E_a) of biopolymers from a quantitative analysis of the drying curves, and established that those requiring higher E_a during their drying process provided greater protection to the core material (in this case microorganism) from heat damage and offer greater resistance to oxygen diffusion through their drying matrices.

The objective of this work was to microencapsulate *T. harzianum* conidia in biopolymer matrices with different activation energies and to evaluate the effect of the spray-drying inlet and outlet air temperatures on: (a) conidia survival immediately after spray-drying; and (b) conidia survival and the evolution of reactive oxygen species (ROS) after storage at two different temperatures.

2. Materials and methods

2.1. Strain, culture medium and inoculum development

T. harzianum strain used in this study was obtained from the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (Culiacán Campus, State of Sinaloa, Mexico) and preserved in potato dextrose agar (PDA) medium at 4 °C. The liquid medium used for *T. harzianum* conidia production contained: 30 g L⁻¹ of glucose, 5.6 g L⁻¹ of (NH₄)₂SO₄, 7 g L⁻¹ of KH₂PO₄, 2 g L⁻¹ of Na₂HPO₄, 1.5 g L⁻¹ of MgSO₄·7H₂O, 0.0671 g L⁻¹ of CaCl₂·2H₂O, 0.008 g L⁻¹ of FeCl₃·6H₂O, 0.0001 g L⁻¹ of ZnSO₄·7H₂O and 0.5 g L⁻¹ of yeast extract. The inoculum was obtained by plating the *T. harzianum* strain on PDA at 29 °C and cultured 6 days with 20 min of light exposition to induce conidiation. The conidia were re-suspended in a saline solution (0.05% Tween 40, 9 g L⁻¹ NaCl). This suspension was used to inoculate a fermenter to a final concentration of 10⁵ conidia mL⁻¹.

2.2. Culture conditions and spore recovery

The conidia were cultured aerobically in a bioreactor with a capacity of 500 L and a working volume of 270 L. The culture was kept at a constant temperature of 29 °C, the pH was controlled at 5.6 by the addition of sodium hydroxide (50%, w/v). The bioreactor was stirred at 360 rpm with 2 Rushton turbines with a turbine diameter/tank diameter ratio of 0.5 and an aeration rate of 0.5 vvm. After 60 h of culture a wet paste of conidia was recovered by passing the culture broth through a 0.2 mm sieve (in order to separate mycelia from conidia) and centrifuged at 12,000 × g.

2.3. Spray-drying of *Trichoderma harzianum* formulations

Aqueous solutions (20%, w/v) of MD10, MD20; GA, and MD10–GA biopolymers and 1% (w/v) suspension of conidia, both in phosphate buffer 50 mM (pH 5.6), were mixed (500 mL) and spray-dried in a Bowen Engineering BE-1448 spray-dryer (Indianapolis, IN, USA) with an atomizer diameter of 0.19 mm operated with an air flow of 8.82 m³ min⁻¹ and a pressure differential of 58.9 kPa was used. Each suspension (500 mL) was fed to the dryer adjusting the inlet air temperature (T_i) to 120 °C, 135 °C or 150 °C, and the outlet air temperature (T_o) to 70 °C, 80 °C or 90 °C. The number of colony forming units (CFU) before and after spray drying was determinate by flow cytometry (Section 2.8). The percent survival of spray-dried (PS_{sd}) microencapsulated conidia, in the different biopolymer matrices, was obtained as:

$$PS_{sd} = \left(\frac{\text{CFU after spray-drying}}{\text{CFU before spray-drying}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Also, the survival increase (SI) of each of the conidia microencapsulated in the different biopolymer matrices with respect to a non-encapsulated control treatment was obtained as follows:

$$SI = \frac{PS_{sd} \text{ microencapsulated}}{PS_{sd} \text{ non-encapsulated control}} \quad (2)$$

2.4. Determination of activation energy (E_a) of encapsulation matrix

The activation energy (E_a) of maltodextrin 10 DE (MD10), maltodextrin 20 DE (MD20), gum Arabic (GA) and a 1:1 (w:w) blend of MD10–GA was determined following the procedure of Pérez-Alonso et al. (2003). MD10 and MD20 were purchased from CP Ingredientes, SA de CV (Tlalnepantla, State of México, México) and GA from Química France, SA de CV (Morelia, State of Michoacán, México). The E_a values obtained were of 29.0 kJ mol⁻¹ for MD10, 24.0 kJ mol⁻¹ for MD20, 19.0 kJ mol⁻¹ for GA, and 31.6 kJ mol⁻¹ for MD10–GA.

2.5. Effect of activation energy and process temperatures on conidia survival after spray drying

A factorial design 3³ was used to evaluate the effect of the encapsulation matrices E_a and process temperatures on the SI (Table 1). ANOVA analysis was made using a DESIGN-EXPERT software version 5.0.7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN). The main effects for each of the factors evaluated on the response were determined using the following equation:

$$\beta_i = (\gamma_i^+) - (\gamma_i^-) \quad (3)$$

where β_i is the effect of the i th factor on the response, and γ_i^+ and γ_i^- are the mean responses for the upper (+) and the lower (-) levels

Table 1
Experimental 3³ factorial design used to evaluate the effect of activation energy (E_a), inlet (T_i) and outlet temperature (T_o) on the survival of *T. harzianum* conidia after spray drying.

Run	Coded variables			Process variables			Responses		
	E_a	T_i	T_o	E_a (kJ mol ⁻¹)	T_i (°C)	T_o (°C)	PS _{sd} (%)	SI ^a	SI ^b
1	1	1	-1	29	150	70	62.6	4.0	4.5
2	1	1	0	29	150	80	71.4	7.9	7.7
3	1	1	1	29	150	90	84.0	10.1	10.9
4	1	0	-1	29	135	70	55.3	3.6	2.7
5	1	0	0	29	135	80	62.0	4.2	4.6
6	1	0	1	29	135	90	75.4	5.4	6.5
7	1	-1	-1	29	120	70	52.6	2.0	2.1
8	1	-1	0	29	120	80	62.6	2.6	2.7
9	1	-1	1	29	120	90	69.4	4.2	3.4
10	0	1	-1	24	150	70	56.6	4.2	4.4
11	0	1	0	24	150	80	64.0	6.2	7.1
12	0	1	1	24	150	90	75.4	9.4	9.8
13	0	0	-1	24	135	70	48.6	3.2	2.9
14	0	0	0	24	135	80	53.3	4.3	4.3
15	0	0	1	24	135	90	62.7	5.3	5.8
16	0	-1	-1	24	120	70	44.6	1.7	2.6
17	0	-1	0	24	120	80	42.0	2.9	2.7
18	0	-1	1	24	120	90	46.2	2.0	2.9
19	-1	1	-1	19	150	70	50.6	3.2	3.2
20	-1	1	0	19	150	80	53.2	5.1	5.5
21	-1	1	1	19	150	90	59.9	7.8	7.7
22	-1	0	-1	19	135	70	43.2	2.9	2.0
23	-1	0	0	19	135	80	43.9	2.6	3.0
24	-1	0	1	19	135	90	45.2	2.9	4.0
25	-1	-1	-1	19	120	70	35.9	1.4	2.0
26	-1	-1	0	19	120	80	35.2	2.2	1.8
27	-1	-1	1	19	120	90	39.2	2.3	1.5
28	0	0	0	24	135	80	59.8	4.8	4.3
29	0	0	0	24	135	80	60.0	4.6	4.3
30	0	0	0	24	135	80	56.3	4.3	4.3
31	0	0	0	24	135	80	52.6	4.9	4.3
32	0	0	0	24	135	80	51.9	4.0	4.3

^a Experimental data.

^b Predicted data.

of the i th factor. Interactions of two factors were also calculated by this equation. The general equation is a second degree polynomial:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_{ij} + \varepsilon \quad (4)$$

where Y is the estimated response, β_0 is the general mean, $\sum \beta_i X_i$ is the sum of main effects of the factors, $\sum \beta_{ij} X_{ij}$ is the sum of two-factor interaction effects, $\sum \beta_{ij} X_i^2$ is the sum of quadratic effect of the factors and ε is the lack of fit of the model (error).

2.6. Effect of storage temperature on conidia survival

The microcapsules showing best PS_{sd} immediately after spray-drying for each of the different biopolymers matrices were stored at 4 °C and 29 °C. Percent survival of the microencapsulated conidia and of the non-encapsulated control (PS_s) was calculated as follows:

$$PS_s = \left(\frac{\text{CFU at storage time } t = t_i}{\text{CFU at storage time } t = 0} \right) \times 100 \quad (5)$$

The water activity (a_w) of the microcapsules stored at 4 °C and 29 °C was also determined at the same storage times as PS_s. A Sprint TH-500 Novasina a_w meter (Pfäffikon, Switzerland) was used for this purpose (calibration range $a_w = 0.11$ – 0.97).

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Dried powders were attached to SEM stubs using a two-sided adhesive carbon tape and then were coated with gold-palladium

using a Polaron SC7620 Sputter Coater (Sussex, UK). Microcapsules were observed with a high vacuum scanning electron microscope LEO Model 1450 (Helsingborg, Sweden) at 3 kV.

2.8. Quantification of CFU and total conidia

Quantification of total conidia was done by using a Neubauer chamber. The number of CFUs was determined by Flow Cytometry. Dried powders were rehydrated in glucose solution 20% (w/v) and centrifuged at 6000 × g for 5 min. The pellet was washed and re-suspended in phosphate buffer 50 mM (pH 5.6) and propidium iodide (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added at a final concentration of 30 μ M. After 10 min of staining, red fluorescence was measured in a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer (NJ, USA). The survival percentage was obtained by an inverse correlation, previously obtained in our lab (unpublished data), between PI red fluorescence (damaged cell wall) and conidia viability determined by colonies count in PDA plates.

2.9. Quantification of reactive oxygen species (ROS)

The method reported by LeBel, Ischiropoulos, and Bondys (1992) was used to quantify the specific reactive oxygen species (ROS) concentration. This method uses 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), a non fluorescent molecule that in presence of ROS is oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCFH), which is monitored spectrofluorometrically. DCFH was prepared by mixing 0.5 mL of 1.0 mM DCFH-DA (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO, USA) in methanol with 2.0 mL of 0.01 N NaOH. The deesterification of

DCFH-DA proceeded at room temperature for 30 min, and the mixture was then neutralized with 10 mL of 25 mM NaH₂PO₄, pH 7.4. This solution was kept on ice in the dark until use. A standard curve was generated with hydrogen peroxide (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) in a range of 10–100 μM. Green fluorescence was monitored using a Perkin Elmer spectrofluorometer Model LS-55 (MA, USA), with an excitation wavelength of 504 nm (bandwidth 2.5 nm) and emission wavelength of 520 nm (bandwidth 3.7 nm).

Quantification of the specific ROS concentration for the microencapsulated conidia and non-microencapsulated control stored at 29 °C was performed with 5 × 10⁸ cells suspended in 50 mM Tris buffer, pH 5.6. DCFH was added at a final concentration of 10 μM. Samples were incubated for 15 min at room temperature. The cells were disrupted with glass pearls, and the supernatant was used to monitor green fluorescence in order to quantify the specific ROS concentration.

3. Results and discussion

3.1. Effect of activation energy of the encapsulating matrices and of process temperatures on conidia survival immediately after spray-drying

This work evaluated the effect E_a of encapsulating matrix and spray-drying temperatures (inlet and outlet) upon the survival of *T. harzianum* conidia, a competent biological control agent, using a 3³ experimental factorial design. Three biopolymers were chosen: maltodextrins (Dextrose Equivalents 10 and 20) and gum Arabic. These biopolymers were chosen as they are commonly used for microorganism encapsulation and because their values of E_a were suitable to perform the experimental factorial design as a quantitative variable.

After validation of the empiric second-order model, we can say that, the process temperatures and E_a had a positive significant effect on SI (F test, $p < 0.001$) as can be observed in Eq. (6) ($R^2 = 0.92$):

$$SI = 4.31 + 2.18T_i + 1.44T_o + 0.80E_a + 0.58(T_i)^2 + 0.51(E_a)^2 + 1.26T_iT_o + 0.32T_iE_a + 0.47T_oE_a \quad (6)$$

Pérez-Alonso et al. (2003) proposed that the E_a of carbohydrate polymers can be used as the selection criteria for their use as encapsulating agents. Activation energy (E_a) of the encapsulating matrix wall material provides a measure of the energy required for evaporating certain mass of water from the material to be dried. These authors suggested that materials with high E_a formed a dense and structured matrix around the core (bioactive ingredient or microorganism) that works as a barrier for thermal stress as well as limiting oxygen diffusion. However, under our experimental conditions, inlet and outlet temperature individual effects and their interaction had a higher influence than E_a (as shown by the empirical Eq. (6)) upon SI. The high positive effect of T_i and T_o on SI could be explained by the fact that at the highest process temperatures the dryer's feed flow increased (data not shown), which decreased the time that the conidia are exposed to heat, and reducing thermal stress. Nevertheless, the effect of E_a is statistically significant, which is reflected in the higher survival values obtained by using the polymer with higher E_a .

Fig. 1(a–c) shows the response surface of the SI as a function of E_a , inlet and outlet temperatures. From Fig. 1 and Table 1, it is clear that the encapsulation matrix that allowed the highest SI, as well as the highest PS_{sd} was MD10, which exhibited the highest E_a . MD20, which had the intermediate E_a followed, and GA which showed the lowest E_a , exhibited also the lowest survival increase. From Fig. 1 it is also evident that, regardless of the encapsulation matrix (E_a), the combination of the highest inlet and outlet drying

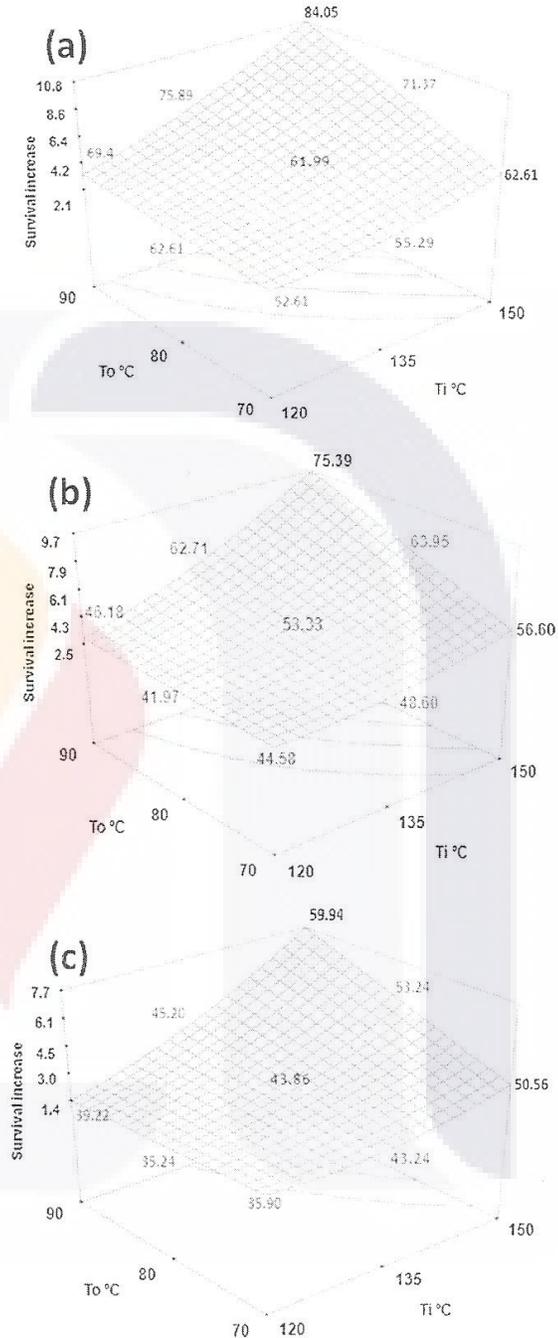


Fig. 1. Response surface graphs representing survival increase (SI) of *T. harzianum* conidia microencapsulated as a function of the inlet and outlet spray-drying temperatures using: (a) MD10 ($E_a = 29.0 \text{ kJ mol}^{-1}$); (b) MD20 ($E_a = 24.0 \text{ kJ mol}^{-1}$); (c) GA ($E_a = 19.0 \text{ kJ mol}^{-1}$) as encapsulating matrices. Experimental SI values are shown for each point in the experimental design.

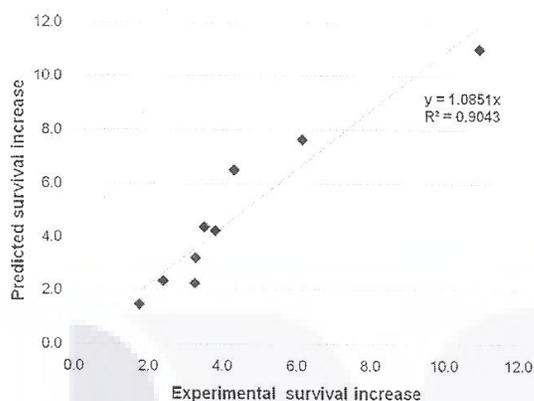


Fig. 2. Model validation through experimental vs. estimated values of the survival increase (SI) of a conidia formulation with 1:1 blend of MD10-GA ($E_a = 31.6 \text{ kJ mol}^{-1}$).

temperatures was the condition leading to maximum *T. harzianum* PS_{sd} . These results suggest that at the lowest inlet drying temperature (120°C), and independently of the E_a of the biopolymer used, the energy applied to the samples was not enough to produce a properly consolidated matrix.

In order to provide an additional validation of the model obtained by the factorial design, we used the experiments of the conidia formulated with the 1:1 (w/w) MD10-GA blend which exhibited the highest E_a (31.6 kJ mol^{-1}). The higher E_a displayed by this biopolymer blend was probably due to a synergistic effect occurring between both biopolymers, giving place to a continuous network structure more tightly interwoven than that resulting from either biopolymer on its own. As a result, water diffusion through the interfacial membrane is hindered to greater extent and a higher E_a is required. Fig. 2 shows the ability of the model to be extrapolated (predicted vs. experimental values) which resulted in a $R^2 = 0.90$ which is high enough to validate the model. Nevertheless, it is clear that under the best process temperature conditions, the use of MD10-GA blend ($E_a = 31.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) yielded a PS_{sd} of 86% (~11-fold survival increase). On the other hand, conidia formulated with GA ($E_a = 19 \text{ kJ mol}^{-1}$) exhibited only a PS_{sd} of 60% (~7.7-fold survival increase).

Previous results of our group (Fernández-Sandoval et al., 2012) have shown that thermal stress (during spray-drying) and oxidative stress (during storage), are the main factors affecting *T. harzianum* conidia survival. Several reports (Guijarro, Larena, Melgarejo, & De Cal, 2006; Horaczek & Viernstein, 2004a, 2004b; Jin & Custis, 2011; Larena, De Cal, Liñán, & Melgarejo, 2003a; Larena, Melgarejo, & De Cal, 2003b) dealing with microencapsulation of fungal conidia show that this technique is very promising for its protection during spray-drying. The goal of encapsulation is to provide a micro-environment to the microorganisms, within a capsule, allowing them to survive during processing and storage (Weinbreck, Bodnár, & Marco, 2010). However, selection of encapsulating biopolymers is frequently based in trial and error experimentation. Our results are in line with those reported by Rodríguez-Huezo et al. (2007), as the biopolymers with the highest E_a provided a higher protection against cellular thermal damage, due to the formation of a dense structured matrix. It appears that higher T_i and T_0 are necessary for a rapid formation of the microcapsules. Horaczek and Viernstein (2004a, 2004b) studied the microencapsulation of *B. brongniartii* and *M. anisopliae* conidia using skim milk and polyvinylpyrrolidone. They reported a 2-fold increase in the survival of spray dried conidia; however, after 6 weeks of storage at 30°C the germination of

the conidia ceased. Liu and Liu (2009a) reported that the encapsulation of *M. anisopliae* in an alginate-clay matrix, with dextrin and hydroxypropyl methyl cellulose as additives, yielded in 80% of germination after six months of storage. Larena, Melgarejo, et al. (2003b) evaluated the effect of spray-drying on conidia viability of *Penicillium oxalicum* when a blend of non-fat skim milk and sucrose were used as protective agents: the survival after drying was only 28%. Microencapsulation by spray drying of *Penicillium frequentans* using non fat skim milk as the encapsulating matrix at $T_i = 150^\circ\text{C}$, resulted in a survival of 28% (Guijarro et al., 2006). The same strategy was used to evaluate microencapsulation of *Epicoccum nigrum*, and the same trend was observed: survival after drying reached only 10% (Larena, De Cal, et al., 2003a). Only Jin and Custis (2011) have reported an experience of spray-drying microencapsulation of *T. harzianum* conidia. These authors reported a 3-fold relative increase of spore survival when compared with untreated samples using sucrose as the encapsulating matrix. We report a 11-fold relative conidia survival increase. The higher PS_{sd} can be explained by the use of biopolymers instead of a disaccharide allowing the formation of a more dense matrix.

Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the microcapsule formation. Fig. 3a shows the morphology of *T. harzianum* conidia dried without protective matrix. The average conidia size was $2\text{--}5 \mu\text{m}$. GA, MD10 and MD10-GA formulations are presented in Fig. 3(b–d), respectively. These micrographs indicate that microcapsules with an average size of $15\text{--}20 \mu\text{m}$ were formed. MD10-GA formulation had a more dense and robust structure than that formed by GA alone which showed an irregular matrix, and probably causing as a result, that the formulations made with this biopolymer to display the lowest survival rates.

SEM micrographs of microencapsulated conidia showed differences in the encapsulating matrix morphology. It is evident that matrices possessing higher E_a formed smoother and bigger microcapsules (Fig. 3).

3.2. Influence of the encapsulating matrix E_a and storage temperatures on conidia survival

The values of a_w obtained for the different formulations after spray-drying ranged from 0.31 to 0.40, which was in the range previously found in our laboratory (Fernández-Sandoval et al., 2012) to be suitable for increasing the shelf life of dehydrated *T. harzianum* conidia.

The PS_s of non-encapsulated *T. harzianum* conidia decreased significantly after 4 weeks of storage (Figs. 4 and 5), regardless of the storage temperature (4°C and 29°C) used. However, when a protective matrix was used the conidia PS_s decreased only after 8 weeks of storage. Also a direct relationship between the PS_s and E_a of the biopolymer matrix was observed at both storage temperatures. The formulations with the MD10-GA matrix showed the highest PS_s . Regarding the effect of temperature, it is clear that samples stored at 4°C retained higher viability than those stored at 29°C for the same length of time. Nevertheless, in samples stored at 4°C , the use of MD10-GA blend ($E_a = 31.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) yielded a PS_s of 40%, achieving ~330-fold on PS_s with respect to non-encapsulated conidia. On the other hand, conidia encapsulated with the same matrix and stored at 29°C exhibited only a PS_s of 23%, increasing ~150-fold on PS_s .

PS_s decreased after 8 weeks for all the microencapsulated conidia, in a similar way to the decrease in PS_s after 4 weeks for the non-encapsulated control. These results seem to indicate that the biopolymer protective matrices retarded the diffusion of oxygen (at least for 8 weeks) into the microcapsules, limiting the amount of available oxygen for participating in the oxidation of macromolecules and causing oxidative stress.

Conidia viability during storage was higher in samples at 4°C than at 29°C , probably due to the higher reactivity and diffusivity

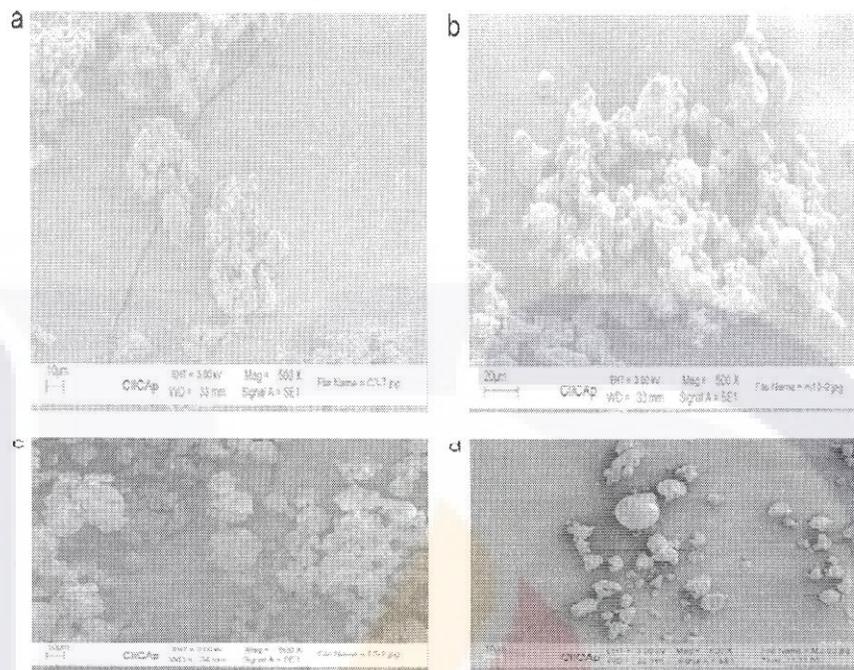


Fig. 3. Morphology of the particles of the *T. harzianum* conidia obtained by spray-drying with or without protective agent at $T_1 = 150^\circ\text{C}$ and $T_2 = 29^\circ\text{C}$. (a) Free conidia, (b) GA microcapsules, (c) MD10 microcapsules and (d) MD10-GA microcapsules.

of intracellular ROS at the latter temperature. At 4°C loss of cell viability after 8 weeks of storage was probably due to an increase in their metabolic activity, as the a_w increased from an initial value of 0.3–0.4 at storage time $t = 0$ to a value of 0.8–0.9 at $t = 8$ weeks. An increase in metabolic activity may be accompanied by nutrient limitation and/or oxidation of macromolecules. These results indicate control of the water activity at low storage temperatures should be considered from achieving higher survival rates.

3.3. Conidia survival as a function of intracellular ROS concentration

Table 2 and Fig. 6 show the relationship between conidia PS_0 , stored for twelve weeks at 29°C , and intracellular ROS concentration. Results are shown for the conidia microencapsulated in the MD10-GA matrix and for the non encapsulated control. As expected, initial intracellular ROS concentration were

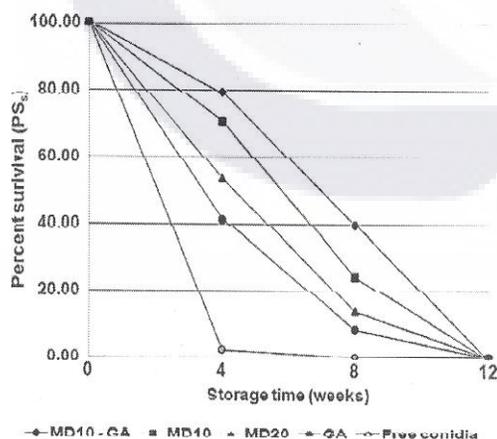


Fig. 4. Effect of activation energy on *T. harzianum* conidia percent survival (PS_0) during storage at 4°C .

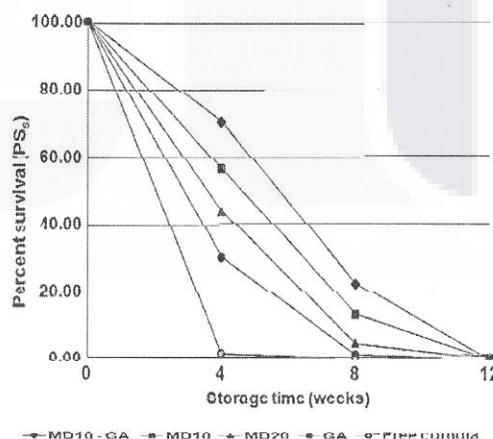


Fig. 5. Effect of activation energy on *T. harzianum* conidia percent survival (PS_0) during storage at 29°C .

Table 2

Survival and ROS concentration of encapsulated (MD10-GA) and non encapsulated *T. harzianum* spores during storage at 29 °C.

t (week)	PS _t	nMROS/10 ⁶ cell
MD10-GA		
0	100	5.07 ± 1.28
4	69.8 ± 4.6	6.09 ± 2.30
8	22.5 ± 4.2	7.01 ± 1.64
12	1.32 ± 0.5	33.94 ± 2.53
Non encapsulated		
0	100	4.31 ± 1.21
4	6.1 ± 3.2	11.95 ± 1.76
8	3.8 ± 1.4	29.32 ± 1.69
12	1.8 ± 0.6	31.64 ± 2.19

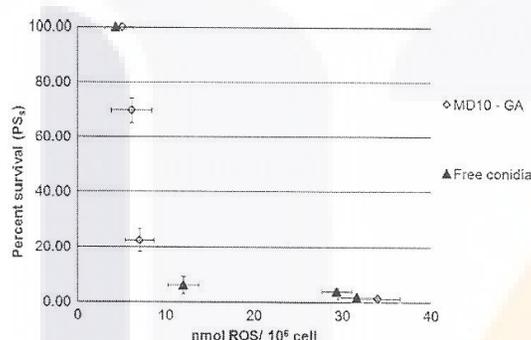


Fig. 6. *T. harzianum* conidia survival, stored at 29 °C, as a function of intracellular ROS concentration. (▲) Conidia microencapsulated on MD10-GA; (○) Non encapsulated conidia.

similar for both samples. However, the ROS increase in non-encapsulated conidia was much faster than in microencapsulated conidia (Table 2). Nevertheless, when ROS concentration exceeded 7 nM ROS/10⁶ cell the survival of all the treatments was severely reduced (Fig. 6). Our results suggest that microencapsulation provides a protective barrier against oxygen diffusion towards the conidia reducing oxidative stress and increasing shelf life of *T. harzianum* conidia.

The evolution of conidia survival and intracellular ROS concentration seems to support the hypothesis that oxidative stress is the main cause of conidia death. Non-encapsulated conidia accumulated ROS at a faster rate than the encapsulated ones (Table 2). However, after 8 weeks, a critical intracellular ROS concentration (>6 nM ROS/10⁶ cell) was arrived and survival of encapsulated conidia decrease significantly.

4. Conclusions

Activation energy of the encapsulating matrix and the drying temperatures are factors that should be taken in to consideration for enhancing the survival of *T. harzianum* conidia in spray-dried powders. In fact, the best survival (86%) was obtained for the 1:1 blend of maltodextrin-gum Arabic, which is a polymeric matrix with the highest E_a among those evaluated. During storage, a high E_a of encapsulating matrix and a low storage temperature yielded high spore survival up to 8 weeks of storage. Loss of viability after this period was probably due to oxidative stress at 29 °C, and to a combination of oxidative stress and increased metabolic activity at 4 °C. We demonstrated that the use of polymer carbohydrates with high E_a as encapsulation matrix prevent thermal stress and reduce oxidative stress during storage.

Acknowledgements

This study was financed by CONACyT (105938). We thank V. Albitar, M. Caro and R. Tinoco for their technical assistance. The authors thank A. Martínez for computer support.

References

- Abadias, M., Teixidó, N., Usal, J., Viñas, I., & Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol agent *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 1009–1017.
- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 399–409.
- Batta, Y. A. (2004). Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International Journal of Microbiology*, 96, 281–288.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024–1039.
- Fernández-Sandoval, M. T., Ortiz-García, M., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2012). Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. *Process Biochemistry*, 47, 186–194.
- França, M. B., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 146, 621–631.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337–359.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2006). Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. *Biocontrol Science and Technology*, 16, 257–269.
- Horaczek, A., & Viernstein, H. (2004a). *Beauveria brongniartii* subjected to spray-drying in a composite carrier matrix system. *Journal of Microencapsulation*, 21, 317–330.
- Horaczek, A., & Viernstein, H. (2004b). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 31, 65–71.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87, 4–10.
- Jin, X., & Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56, 202–208.
- Jin, X., Harman, G. E., & Taylor, A. G. (1991). Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. *Biological Control*, 1, 237–243.
- Jin, X., Hayes, K. C., & Harman, G. E. (1992). Principles in the development of biological control systems employing *Trichoderma* species against soil-borne plant pathogenic fungi. In G. F. Latham (Ed.), *Frontiers in industrial mycology* (pp. 174–195). New York: Chapman & Hall Inc.
- Krishnan, S., Kshirsagar, A. C., & Singhal, R. S. (2005). The use of Arabic gum and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62, 309–315.
- Larena, I., De Cal, A., Liñán, M., & Melgarejo, P. (2003). Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 508–514.
- Larena, I., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2003). Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 151, 600–606.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondys, S. C. (1992). Evaluation of the Probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research Toxicology*, 5, 227–231.
- Liu, C. P., & Liu, S. D. (2009a). Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA12. *Journal of Microencapsulation*, 26, 377–384.
- Liu, C. P., & Liu, S. D. (2009b). Low-temperature spray-drying for the microencapsulation of the fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology*, 27, 747–753.
- Matsuno, R., & Adachi, S. (1993). Lipid encapsulation technology techniques and applications to foods. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 256–261.
- Molina, M. D. C., & Anchordoquy, T. J. (2008). Formulation strategies to minimize oxidative damage in lyophilized lipid/DNA complexes during storage. *Journal of Pharmaceutical Science*, 97, 5089–5105.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193.
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059–1066.

- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 80, 627–630.
- Pedreschi, F., & Aguilera, J. M. (1997). Viability of *Trichoderma harzianum* spores under storage. *Bioprocess Engineering*, 17, 177–183.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González, J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., & Vizcarra-Mendoza, M. G. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 53, 197–203.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L. A., Cruz-Sosa, C., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J., et al. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International*, 40, 1299–1306.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1410–1417.
- Teixeira, P. C., Castro, H., & Kirby, R. (1996). Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters of Applied Microbiology*, 22, 34–38.
- Wang, H., Chang, K. F., Hwang, S. F., Turnbull, G. D., Howard, R. J., Blade, S. F., et al. (2005). Fusarium root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides. *Biocontrol*, 50, 317–329.
- Weinbreck, F., Bodnár, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136, 364–367.

