

# Encapsulación del agente nematocida *Tsukamurella paurometabola* C-924, mediante secado por atomización

✉ Armando Hernández, Jesús Zamora, Nemecio González, Dayrilis Guerra del Risco, Roger Ríos, María del C Sánchez, Eladio Salazar

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Circunvalación Norte y Ave. Finlay, AP 387, CP 70100, Camagüey, Cuba  
E-mail: armando.hernandez@cigb.edu.cu

## RESUMEN

*Tsukamurella paurometabola* C-924 es un microorganismo cuya actividad nematocida ha sido demostrada. A partir de este agente nematocida, se han obtenido formulaciones líquidas y en polvo para su aplicación en casas de cultivo protegidas. La formulación en polvo, pese a ser estable a 4 °C, requiere un aumento de estabilidad a temperatura ambiente, lo cual podría lograrse mediante la adición de un agente encapsulante de alta temperatura de transición vítrea (Tg). Dentro de los agentes encapsulantes más utilizados, el almidón posee un alto valor de Tg (entre 50 y 60 °C, y para valores de humedad residual de hasta un 15%). En este artículo, se informa por vez primera la encapsulación de *T. paurometabola* C-924 en almidón, mediante la tecnología de secado por atomización, así como el estudio de estabilidad de dicho formulado, mediante el método de estabilidad acelerada (MEA). Como resultado, se obtuvieron células desecadas de C-924 con una alta tasa de supervivencia (mayor del 60%). El incremento en la concentración de almidón de hasta 10% (peso/peso), no influyó significativamente en la supervivencia durante el proceso de secado. En cambio, al evaluar la estabilidad de los formulados obtenidos, el almidón proporcionó un aumento significativo en los tiempos de vida útil de las células encapsuladas, las cuales resultaron 1.56 veces más estables a 26 °C que sus homólogas no encapsuladas.

**Palabras clave:** encapsulación, nematocida, secado por atomización, células anhidrobióticas

*Biotecnología Aplicada* 2007;24:224-229

## ABSTRACT

**Spray-drying encapsulation of the nematocidal agent *Tsukamurella paurometabola* C-924.** *Tsukamurella paurometabola* C-924 is a microorganism with proven nematocidal activity which has been used for the successful development of liquid and powdered formulations to be employed under greenhouse conditions. However, the current powdered formulation, although stable at 4 °C, needs to be improved in order to extend its shelf life at room temperature. This can be attained by methodologies such as the encapsulation of the microorganism into agents with high glass transition temperatures (e.g. starch, with a Tg of 50-60 °C at residual humidity values up to 15%). In this work we report for the first time the encapsulation of *T. paurometabola* C-924 into starch by spray-drying, as well as the results of accelerated stability studies on the resulting formulation. The procedure described here yielded desiccated C-924 cells with a high survival rate (over 60%). Although increasing the concentration of starch up to 10% (w/w) did not significantly influence the survival rate during the procedure, the evaluation of the stability of the resulting formulations at 26 °C revealed a 1.56-fold enhancement as compared to unencapsulated controls.

**Keywords:** encapsulation, nematocide, spray-drying, anhydrobiotic cells

## Introducción

Una de las principales causas que conducen a pérdidas en las cosechas, y por consiguiente a una disminución en los rendimientos, son las plagas. La realidad actual demuestra una tendencia decreciente en el uso de plaguicidas químicos, debido esencialmente al impacto negativo que han generado durante décadas en los ecosistemas, además de los riesgos que, desde el punto de vista toxicológico, implican el consumir alimentos relacionados directa o indirectamente con el uso de tales productos [1]. Una alternativa muy eficaz al uso de químicos, es la utilización de productos biológicos, también llamados bioproductos. Tales bioproductos se basan en que el ingrediente activo es un control biológico de la plaga, o algún metabolito o molécula que proviene del agente biocontrol [1]. Este enfoque de naturaleza biológica hace que las producciones agrícolas adquieran un carácter más natural, con implicaciones mínimas en la toxicidad medioambiental, y por consiguiente, sean más sanas.

Dentro de las principales plagas causantes de pérdidas en las cosechas, se encuentran los nemátodos. El microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, cepa C-924, es una bacteria que ha mostrado ser un control eficaz de nemátodos [2, 3]. A partir de este biocontrol, investigadores del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Ciudad de La Habana) han obtenido un producto en polvo para uso agrícola, que cuenta con una estabilidad a 4 °C de 105 días de vida útil y 330 de vida media [4]; sin embargo, no es lo suficientemente estable a temperatura ambiente (26 °C) (5 días de vida útil), lo cual le resta efectividad. Esta problemática pudiera ser resuelta a partir del uso de agentes encapsulantes [5, 6], que presentan altos valores de temperatura de transición vítrea (Tg) y que, por tanto, permiten disminuir las velocidades de las reacciones de degradación y oxidación que ocurren en las células en estado anhidrobiótico [7].

Entre los agentes encapsulantes más utilizados, el almidón posee un alto valor de Tg (entre 50 y 60 °C,

1. Walsh F, Morrissey J, O'gara F. Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* (2001); 12:289-95.

2. Mena J, Pimentel E, Hernández A, Veloz L, Yáñez R, León L *et al.* Mechanism of action of *Tsukamurella paurometabola* C-924 on nematodes. *Nematol* (2002); 4(2):287.

3. Mena J, Pimentel E, Veloz L, Hernández A, León L, Ramírez Y *et al.* Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. *Biotecnol Apl* (2003); 20(4):248-52.

y valores de humedad residual de hasta un 15%). A partir de estos elementos, este estudio tuvo como objetivo obtener células anhidrobióticas de C-924 más estables a temperatura ambiente, encapsulándolas en almidón mediante secado por atomización.

## Materiales y métodos

### Propagación hasta 500 mL

Se partió de la cepa C-924 de *T. paurometabola*, conservada en glicerol al 20% y a -70 °C. Se estrió en placas con medio LB-agar y se incubó durante 72 h a 37 °C. Una vez crecidas las colonias, se extrajo una colonia aislada para propagar el cultivo celular.

El medio de propagación SD se preparó según Betancourt [8], a partir de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaCl, KCl,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  y extracto de levadura. El medio de cultivo preparado se dispensó en erlenmeyers de 50 y 500 mL, respectivamente, y se esterilizó.

Se seleccionaron colonias aisladas y se inocularon en seis erlenmeyers de 50 mL previamente preparados (con medio SD), los cuales se incubaron durante 20 h a 37 °C y 250 rpm en zaranda termostataada (New Brunswick Scientific Edison, Nueva Jersey, EE.UU.). Estos precultivos se inocularon, respectivamente, en seis erlenmeyers de 500 mL previamente preparados, y se incubaron durante 10 h a 37 °C.

### Fermentación en 24 L

La fermentación se realizó en un medio SD según Betancourt [8] a pH 6.6 controlado. Se inoculó el fermentador de 35 L (24 L de volumen efectivo) (B.E. Marubishi, Tokyo, Japón) mediante un sifón de 5 L. Los parámetros operacionales fueron 37 °C y 950 rpm, con un flujo volumétrico de aire de 36 L/min (1.5 vvm). El tiempo de fermentación fue de 24 h.

### Determinación del porcentaje de peso seco (materia seca) de la biomasa cosechada

La biomasa obtenida se centrifugó, y se determinó el contenido de materia seca pesando por triplicado 1 g de biomasa húmedo y secando hasta alcanzar un peso constante en balanza de peso seco (se distribuyó la biomasa uniformemente sobre el platillo hasta alcanzar una monocapa).

### Determinación de la concentración de sólidos suspendidos en el sobrenadante de cultivo

La concentración de sólidos suspendidos en el sobrenadante de cultivo se determinó pesando por triplicado 1 mL de sobrenadante y secándolo hasta lograr peso constante en balanza de peso seco.

### Estimación del volumen de sobrenadante empleado en la preparación de las cremas que se debían secar

El volumen del sobrenadante a utilizar para resuspender la biomasa sedimentada hasta un nivel de sólidos totales suspendidos del 20%, se estimó de acuerdo con la ecuación previamente determinada [4]:

$$V = \frac{M_p}{(200 - C_s)} - \frac{3M_p}{1.07}$$

Donde:

V: Volumen de sobrenadante que se debe utilizar para resuspender la biomasa que se desea formular (L).

$M_p$ : Masa total de la biomasa seca (g) (se determinó al multiplicar el porcentaje de peso seco por el peso de la biomasa húmeda).

$C_s$ : Concentración de sólidos totales en el sobrenadante de cultivo (g/L).

### Experimentos de la biomasa utilizada en el secado por atomización

Se realizó un diseño factorial  $2^2$ , donde las variables independientes fueron la concentración de almidón y la temperatura de salida, y se evaluó el efecto de ambas en la de respuesta de supervivencia.

La biomasa colectada se resuspendió para obtener las variantes de crema de la siguiente forma:

**Crema control:** Se resuspendió la biomasa en sobrenadante de cultivo previamente diluido 1/10 partes, hasta alcanzar 20% de materia seca, agitando con un agitador de paletas hasta lograr una mezcla homogénea. A la biomasa bacteriana homogénea se le añadió sacarosa hasta el 20% (peso/peso de biomasa seca).

**Crema con almidón:** Se procedió de manera análoga a la preparación de la crema control, pero a diferencia de esta, se añadió almidón soluble previamente esterilizado, hasta el 10% (peso/peso de biomasa seca).

### Secado de la biomasa utilizada en la formulación de Hebernem-S

La crema formulada se secó en un secador atomizador Mobile Minor™ (Niro Atomizer Denmark). Se empleó un sistema de secado de corrientes paralelas a una velocidad de rotación de la turbina de 30 000 rpm.

Se fijó una temperatura de entrada 130 °C, y como temperatura de salida se establecieron los valores: 55 y 65 °C con flujos de alimentación de 1.9 y 1.7 L/h, respectivamente.

La crema formulada se subdividió en lotes de 1 L. Se realizaron paradas de atomización en cada lote, y se colectó el polvo remanente en las paredes del cono del secador.

El producto se homogenizó manualmente y se dispensó en bolsas de 3 capas, constituidas por láminas de poliéster-aluminio-polietileno (espesor de 0.013 cm, permeabilidad al oxígeno de  $0.001 \text{ cm}^3 / 645 \text{ cm}^2 / 24 \text{ h}$  y permeabilidad al vapor de  $0.0010 \text{ g} / 645 \text{ cm}^2 / 24 \text{ h}$ ). Las bolsas se sellaron al vacío en una selladora de vacío (TECNOVAC, Italia).

### Determinación de la humedad residual de los polvos obtenidos

Se pesó por triplicado 1 g de polvo y se determinó la humedad residual al secarlo hasta un peso constante en una balanza de peso seco (el polvo se distribuyó uniformemente sobre el platillo).

### Prueba de estabilidad acelerada de los polvos formulados

Para estimar la estabilidad de los polvos formulados, se procedió a realizar un *test* o prueba de estabilidad acelerada. Para ello se tomaron bolsas, en las cuales se dispensaron 5 g de polvo (5 réplicas) y se incubaron a

4. Hernández A, Betancourt N, Zamora J, González N, Sánchez M, Salazar E et al. Drying of the biocontrol agent *Tsukamurella paurometabola* C-924 and accelerated stability test of formulated powders. Electron J Environ Agric Food Chem (2006); 5(4): 1479-86. [En línea.] Disponible en: <http://ejefacche.uvigo.es/>

5. Lian W, Hsiao H, Chou C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. Int J Food Microbiol (2002); 74:79-86.

6. Ananta E, Volkert M, Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. Int Dairy J (2005); 15:399-409.

7. Potts M. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. Microbiol Rev (1994); 58(4): 755-805.

8. Betancourt E. Diseño de un nuevo proceso de fermentación del bionemática HeberNem (disertación). Universidad de Camagüey; 2006.

diferentes temperaturas (26, 37 y 50 °C). Las muestras se prepararon por el método de cuarteo [4]; se tomaron 10 g sobre una placa Petri y se subdividieron en 4 partes, los extremos opuestos se mezclaron y homogeneizaron para lograr una buena representación de los polvos obtenidos.

Se realizaron muestreos aleatorios a intervalos de tiempo variables, con el fin de determinar la viabilidad a diferentes tiempos de incubación y estimar las constantes de velocidad de muerte celular ( $k$ ) para cada temperatura.

Se tomaron 0.1 g de cada muestra (por triplicado) y se resuspendieron hasta obtener homogeneidad en 10 mL de NaCl (9 g/L), a partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas hasta un factor de dilución de  $10^8$ .

En placas de LB Agar, previamente preparadas, se sembraron 100 mL por triplicado en las diluciones correspondientes, las cuales se diseminaron con una espátula de Drigalsky hasta que se secaron, y posteriormente se incubaron a 28 °C durante 72 h. Al finalizar el período de incubación, se contaron las colonias para evaluar la viabilidad de los polvos.

El número de células viables cultivables se definió como la media de las unidades formadoras de colonias (ufc), contadas en cada placa multiplicada por la dilución y se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitros. El número de células viables se expresó como unidades formadoras de colonias por gramos, para lo cual se multiplicó por un factor de 100 [multiplicación por 10 teniendo en cuenta el volumen de suspensión, y división entre 0.1, teniendo en cuenta la masa de la muestra (0.1 g)].

#### Prueba de suspendibilidad de los polvos (con encapsulante y sin encapsulante)

Se tomaron 1.5 g de polvo (por triplicado) y se resuspendieron en 50 mL de agua destilada hasta lograr la homogeneidad. Se tomó 1 mL de la parte superior para determinar el peso en la balanza de peso seco, a una temperatura de 105 °C. La suspensión formada se dejó reposar durante 1 h, y el muestreo y el análisis se repitieron de idéntica forma. La suspendibilidad se definió como:

$$\% \text{ suspendibilidad} = \frac{PS_{t_h}}{PS_{t_0}} \times 100$$

Donde:

$PS_{t_0}$ : peso seco a tiempo cero de suspensión.

$PS_{t_h}$ : peso seco al cabo de una hora de suspensión del polvo.

#### Tratamiento estadístico de los datos obtenidos experimentalmente

Para el análisis del diseño se utilizó el programa *Design-Expert*, versión 6.0.1. Los datos se procesaron y se obtuvo la superficie de respuesta y la ecuación del modelo. El análisis de adecuación de los datos al modelo, se realizó mediante la prueba F de Fisher (5% de significación). La significación de cada variable se analizó mediante un ANOVA bifactorial (5% de significación).

Se procesan los datos del estudio de estabilidad acelerada, mediante *GraphPad Prism* 4.0. Para ello,

se calculó la tasa de supervivencia en cada punto según, donde  $X_{v_0}$  es la concentración de viables al inicio del ensayo, y  $X_v$  es la concentración de células viables al tiempo  $t$ , ambas expresadas en unidades formadoras de colonias por gramos. La tasa de supervivencia se transformó a logaritmo natural  $[\ln(S)]$ , y se determinó el valor medio en cada punto de la curva de estabilidad, así como el error estándar. En todos los casos se utilizaron al menos 3 réplicas para obtener los valores promedios de las variables analizadas. Los valores medios de  $\ln(S)$  se ubicaron en una gráfica por el tiempo de incubación, para la determinación de la constante de muerte. Los valores de las constantes de muerte se compararon estadísticamente mediante una prueba de *Student* (5% de significación).

En el estudio de estabilidad acelerada de los polvos, los datos se ajustaron al modelo de *Arrhenius* para la muerte celular bacteriana, al graficar el logaritmo natural de la constante de muerte celular  $[\ln(k)]$  frente al inverso de la temperatura absoluta ( $1/T$ ). A partir de la extrapolación a 277 Kelvin (4 °C), se estimó la constante de muerte celular a esa temperatura ( $k$ ); y, asumiendo un modelo de muerte celular de primer orden, se calculó el tiempo de vida útil del producto mediante la siguiente ecuación:

$$T_{7/10} = -\frac{\ln 0.7}{k}$$

Los valores de suspendibilidad del control y la muestra encapsulada con almidón al 10%, se compararon mediante una prueba  $t$  de *Student* (5% de significación). Para ello, se transformaron los datos de suspendibilidad mediante la ecuación, y se determinó que procedían de una distribución normal, mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov (5% de significación) (*Statgraphics Plus* 5.0).

$$y = \arcsen \sqrt{\frac{\% \text{ suspendibilidad}}{100}}$$

## Resultados y discusión

### Efecto del encapsulante y la temperatura de salida en la supervivencia de *T. paurometabola* C-924

No existen informes en la literatura internacional acerca del encapsulado de cepas de *T. paurometabola*, razón por la cual los resultados de este estudio, adquieren novedad científica.

Para evaluar el efecto del agente encapsulante y la temperatura de salida en la supervivencia de *T. paurometabola* C-924 secada por atomización, se realizó un diseño factorial  $2^2$ . En la figura 1 se muestra la superficie de respuesta obtenida al realizar un total de 12 corridas experimentales (4 puntos experimentales repetidos por triplicado). Existe una tendencia a disminuir la supervivencia con el aumento de la temperatura de salida. Al realizar el análisis estadístico, se obtuvo el siguiente modelo matemático de tendencia:

$$S = 186.16333 + 4.11200 * C (\text{almidón}) - 1.66733 * T_s - 0.076933 * C (\text{almidón}) * T_s$$

Donde:

S: Supervivencia (%).

C (almidón): Concentración de almidón (%) (peso/peso de la biomasa)

Ts: Temperatura de salida del secador.

De este modo se comprobó que la temperatura de salida ejerce un efecto significativo en la supervivencia celular de C-924 ( $P = 0.0013$ ). Por otro lado, pese a que el coeficiente para la concentración de almidón fue positivo, no resultó significativo en la variable respuesta ( $P = 0.2719$ ) y la interacción de ambos factores tampoco mostró significación en la variable dependiente ( $P = 0.3941$ ).

La disminución en la tasa de supervivencia con el aumento de la temperatura, es un resultado que ha sido previamente informado para otras cepas bacterianas [6, 8, 9], y generalmente está relacionado con la desnaturalización de proteínas y otras biomoléculas importantes para el mantenimiento de las funciones vitales en una célula bacteriana [10]. Sin embargo, una concentración de almidón al 10% (peso/peso seco de biomasa) no influyó significativamente en la supervivencia durante el secado, en comparación con las células no encapsuladas; lo cual no coincide con lo informado por To y cols. [9], quienes demostraron que un aumento en la concentración de sólidos totales tiende a lograr un aumento en la supervivencia de *Brevibacterium linens*, microorganismo filogenéticamente cercano a *T. paurometabola*. En cambio, Lian y cols. [5] obtuvieron un decremento en la tasa de supervivencia al encapsular por atomización dos cepas de *Bifidobacterium*, cuando incrementaron la concentración de almidón soluble entre 10 y 30% (peso/peso de biomasa seca).

En este estudio, tanto para las células sin encapsular (control), como para las encapsuladas, utilizamos sacarosa como agente vitrificante [7, 11]; y estas evidencias experimentales sugieren que en *T. paurometabola* C-924 es más importante la protección de la sacarosa contra el efecto letal de la rehidratación, que la protección que pudiese causar el almidón contra el efecto letal de la temperatura en el momento de la desecación. Es decir, que la cepa presenta igual resistencia a la desecación en presencia o no de almidón, al menos entre 0 y 10% (peso/peso de biomasa seca) específicamente durante el proceso de desecación por atomización.

Además, es importante resaltar que, las tasas de supervivencia de *T. paurometabola* C-924 fueron mayores que el 60% [4], lo cual denota la elevada tolerancia de la cepa C-924 ante el proceso de secado. A su vez, estas tasas de supervivencia son superiores a las informadas para otros géneros bacterianos [5, 6, 12].

### Propiedades físicas de los polvos obtenidos

En la figura 2 se muestran los datos correspondientes a las variables humedad residual y suspendibilidad. Tanto para el control como para el encapsulado, los valores de humedad residual fueron relativamente altos (menores del 18%) en comparación con los valores previamente informados para esta cepa [4]; no obstante, en todos los casos se obtuvo un polvo fluido, con altos valores de suspendibilidad (menores del 93%), que los informados para cepas de *Bacillus subtilis* [12].

Haber obtenido células anhidrobióticas con valores de humedad residual mayores del 10% [13], incide

DESIGN-EXPERT Plot

Supervivencia

X=A: Almidón

Y=B: Temperatura

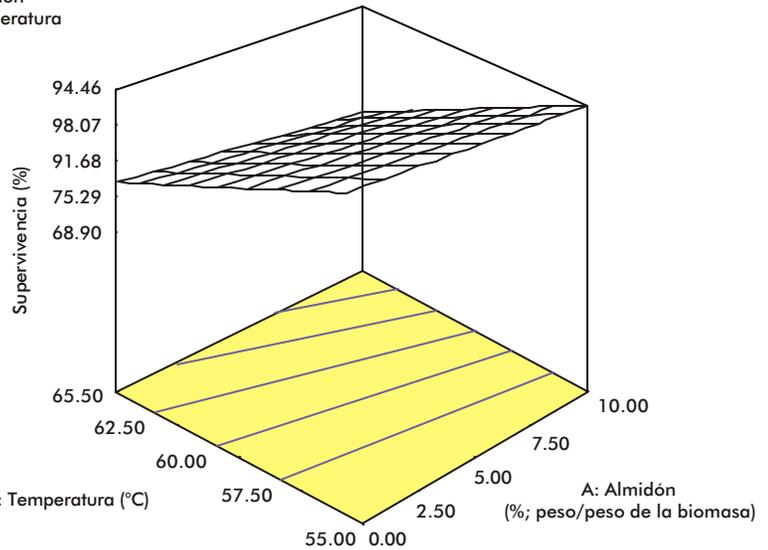


Figura 1. Superficie de la respuesta obtenida al evaluar el efecto del almidón y la temperatura de salida, en la supervivencia de *Tsukamurella paurometabola* C-924 secada por atomización.

negativamente en la estabilidad de la formulación. En el cambio, obtener polvos que al suspenderlos en agua mantienen más del 93% de su contenido sin sedimentar durante una hora, es muy favorable desde el punto de vista de la aplicabilidad en campo, pues se logra homogeneidad en la suspensión durante el proceso de aplicación en el suelo.

9. Fu WY, Etzel MR. Spray Drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and cellular injury. *J Food Sci* (1995); 60(1):195-200.

10. To BC, Etzel MR. Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after Spray Drying, Freeze Drying, or Freezing. *J Food Sci* (1997); 62(1):167-89.

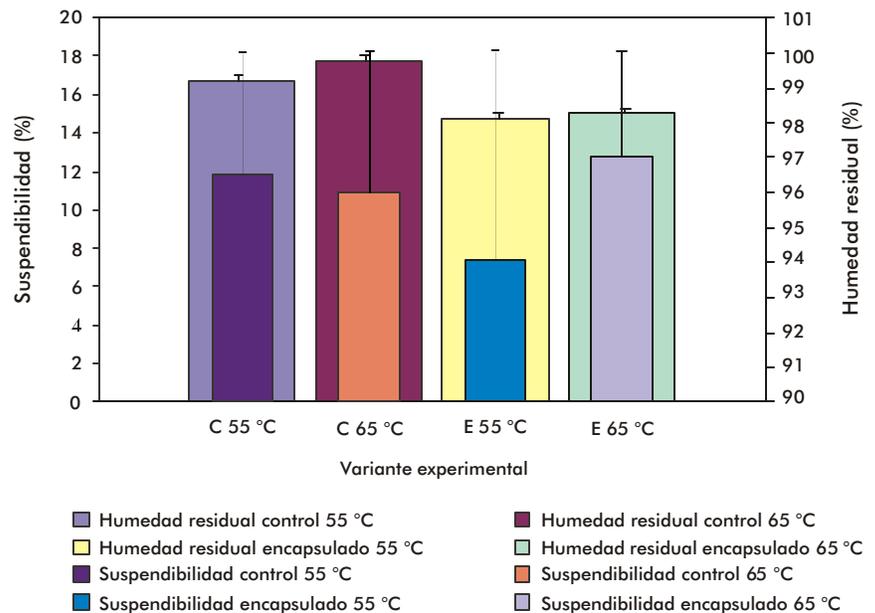


Figura 2. Valores de humedad residual y suspendibilidad de los polvos obtenidos al atomizar las suspensiones de *Tsukamurella paurometabola* C-924 con almidón y sin almidón. El almidón soluble se utilizó como agente encapsulante. Las variantes experimentales representadas en la simbología: C 55 °C (biomasa control atomizada a temperatura de salida 55 °C), C 65 °C (biomasa control atomizada a temperatura de salida 65 °C), E 55 °C (biomasa encapsulada atomizada a temperatura de salida 55 °C), y E 65 °C (biomasa encapsulada atomizada a temperatura de salida 65 °C).

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en las suspendibilidades de los polvos con y sin almidón ( $P > 0.05$ ). Esto implica que, desde el punto de vista aplicativo, un polvo formulado con almidón al 10% (peso/peso de biomasa seca) no introduce cambios tecnológicos a la hora de resuspender y aplicar el producto.

### Estabilidad acelerada de los polvos obtenidos

Una vez determinada la supervivencia celular en el formulado obtenido, los polvos se sometieron a una prueba de estabilidad acelerada. Se trabajó con polvos almacenados al vacío en bolsas de tres capas, para evitar la entrada de aire y de vapor de agua. En general, este estudio resulta muy útil desde el punto de vista de la Microbiología Predictiva [14, 15], pues permite predecir el comportamiento cinético de un sistema en cuanto a la muerte bacteriana, a una temperatura dada [16].

En la figura 3 se muestran las curvas de muerte térmica de la cepa C-924 secada por atomización. En todos los casos la cinética de muerte celular se ajustó a un modelo de primer orden, y se obtuvieron las constantes de muerte térmica para cada temperatura (Tabla 1). La presencia del almidón en la formulación produjo una disminución significativa en las pendientes de las curvas representadas ( $P < 0.05$ ), lo cual indica una menor velocidad en las reacciones de degradación en comparación con el control. Esta evidencia pudiera sugerir una aparente contradicción entre los resultados durante el secado y los que se obtuvieron al evaluar la estabilidad; sin embargo, son dos fenómenos diferentes. Todo parece indicar que la presencia de un polímero como el almidón, no compete con la capacidad vitrificante de la sacarosa durante la desecación rápida. Sin embargo, los datos demuestran que a largo plazo, el almidón ejerce un efecto protector en las células desecadas. Según algunos autores, es muy probable que la estructura polimérica del almidón provoque una disminución en las velocidades de reacción que atentan contra la estabilidad de las células anhidrobióticas [6]. Esta pudiera ser la explicación al comportamiento experimental obtenido en este estudio.

Este comportamiento cinético es análogo al obtenido por Lian y cols. [5], quienes lograron una mayor protección de las bacterias encapsuladas en comparación con las no encapsuladas, al incubar en jugos gástricos simulados, células de *Bifidobacterium* encapsuladas en almidón soluble.

En la figura 4 se representa el diagrama de Arrhenius para las constantes de muerte estimadas experimentalmente. Tanto para el control como para el encapsulado, los valores transformados de las constantes [ $\ln(k)$ ], graficados contra el inverso de la temperatura absoluta, se ajustaron a líneas rectas con altos coeficientes de determinación. Este hallazgo experimental conduce a pensar que, en el intervalo de temperaturas analizado, las reacciones de degradación son solo dependientes de la temperatura [7]. En cambio, un comportamiento no lineal se esperaría si las reacciones que provocan daño celular estuviesen controladas por la difusión molecular, y de esta forma se obtendría una cinética tipo William-Landen-Ferry [7].

Tanto para el control como para el encapsulado, se calcularon las respectivas energías de activación involucradas en el proceso de muerte térmica. Para el

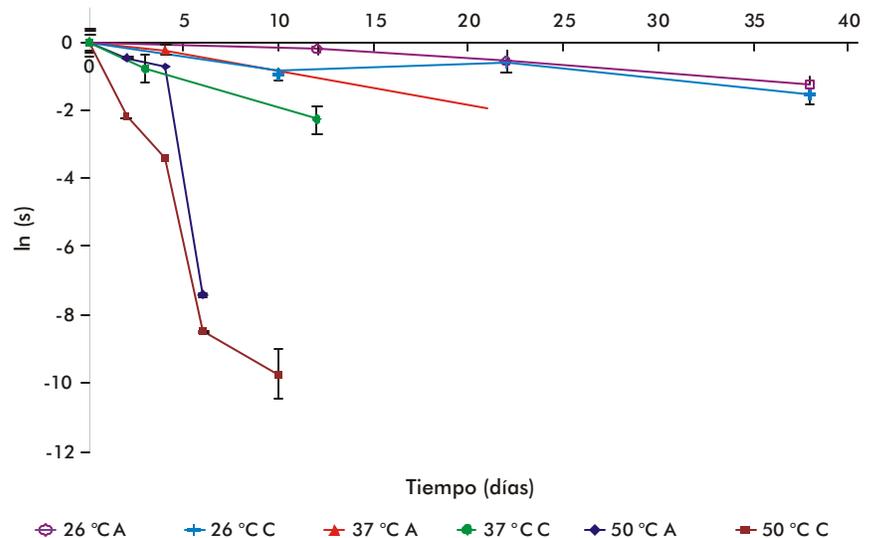


Figura 3. Muerte térmica de *Tsukamurella paurometabola* C-924 secada por atomización. Los datos mostrados corresponden a la variación de la supervivencia en el tiempo a tres temperaturas (26, 37 y 50 °C). Los valores de supervivencia se transformaron a logaritmo natural. Se ajustaron los datos al modelo de primer orden  $\ln(S) = -kt$ . En la simbología: A representa la formulación utilizando almidón como encapsulante y C representa el control sin encapsulante.

control, la energía de activación ( $E_a$ ) estimada fue de 26.4 kcal/mol; mientras que para el encapsulado fue de 27 kcal/mol, lo que indica que en ambas formulaciones los procesos asociados a la muerte térmica son de igual naturaleza [15]. Estos valores de  $E_a$  son similares a los informados por Ziadi y cols. [15] al analizar la estabilidad acelerada de dos cepas de *Lactococcus* secadas por liofilización. Ellos obtuvieron como promedio 20 kcal/mol para ambas cepas.

En la tabla 1 se resumen los parámetros cinéticos del ensayo acelerado. Para nuestro análisis de estabilidad son importantes dos parámetros: el tiempo de vida útil del formulado, el cual indica hasta qué momento, a partir de la fecha de fabricación del formulado, este es funcional o mantiene su actividad biológica; y el tiempo de vida medio, que se define como el tiempo en el cual la actividad biológica disminuye en un 50% ( $T_{1/2}$ ). Basados en la experiencia práctica de la aplicación de las células de C-924 en una suspensión líquida, se definió el tiempo de vida útil como aquel en el cual la actividad biológica de la suspensión celular ( $5 \times 10^{11}$  ufc/mL) se reduce en un 30% ( $T_{7/10}$ ), a partir del momento en que se prepara dicha suspensión.

Tabla 1. Parámetros cinéticos relativos a la muerte térmica de *Tsukamurella paurometabola* C-924 secada por atomización. Ambas formulaciones se prepararon utilizando sacarosa 10% (w/w) como agente vitrificante. Se muestran los tiempos de vida media ( $T_{1/2}$ ) y de vida útil ( $T_{7/10}$ ) respectivamente, así como las constantes de muerte térmica

Temperatura (°C)	Control (formulación sin almidón)			Formulación con almidón como encapsulante		
	$T_{1/2}$ (días)	$T_{7/10}$ (días)	K (días <sup>-1</sup> )	$T_{1/2}$ (días)	$T_{7/10}$ (días)	K (días <sup>-1</sup> )
4	573.9 <sup>a</sup>	295.3 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> 1.21 x 10 <sup>-3*</sup>	986.2 <sup>a</sup>	507.5 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> 7.03 x 10 <sup>-4*</sup>
26	16.8	8.7	<sup>b</sup> 4.12 x 10 <sup>-2</sup>	26.4	13.6	<sup>b</sup> 2.63 x 10 <sup>-2</sup>
37	3.5	1.8	<sup>c</sup> 0.20	5.2	2.7	<sup>c</sup> 0.13
50	0.6	0.3	<sup>d</sup> 1.12	0.9	0.5	<sup>d</sup> 0.77

\*Los datos referidos a 4 °C se estimaron del modelo de Arrhenius planteado a partir de las constantes de muerte térmica.

Las letras diferentes a la izquierda de las constantes de muerte denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

11. Weekers F, Jacques P, Mergeay M, Thonart P. "An Approach to Desiccation-Tolerant Bacteria in Starter Culture Production". In: M Hofman and P Thonart, editors. Engineering and Manufacturing for Biotechnology. Kluwer Academic Publishers (2001):383-98.

12. Crowe J, Carpenter JF, Crowe LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* (1998); 60:73-103.

13. Arunsiri A, Suphantharika M, Ketunuti U. Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *J Econ Entomol* (2003); 96(2):292-99.

14. Jin X, Grigas K, Chen C, Panda A, Matheny ML, inventors. Method and composition for producing stable bacteria and bacterial formulations. US Patent 5,733,774. 1998 March 31.

15. Achour M, Mtimet N, Cornelius C, Zgouli S, Mahjoub A, Thonart Ph, Hamdi M. Application of the accelerated shelf life testing method (ASLT) to study the survival rates of freeze-dried *Lactococcus* starter cultures. *J Chem Technol Biotechnol* (2001); 76:624-8.

Al considerar estos conceptos, los tiempos de vida útil y la vida media se calcularon de acuerdo con los modelos de muerte térmica obtenidos para cada una de las temperaturas. (Tabla 1). En comparación con el control  $T_{7/10}$  y  $T_{1/2}$  fueron superiores para el encapsulado. De particular interés son los valores de  $T_{7/10}$  a 26 °C (referencia de temperatura ambiente), de manera que el encapsulado es 1.56 veces más estable que la formulación control. De este modo se cumple la hipótesis de partida.

El análisis de estos resultados indica que se pudiera incrementar la estabilidad a temperatura ambiente utilizando la estrategia de encapsulación, pero en el futuro, el trabajo debe estar dirigido a disminuir la humedad residual del encapsulado, que aún presenta valores muy elevados en comparación con estudios previos [4, 17]. Esto puede lograrse mediante la optimización de la supervivencia en función de la temperatura a la entrada; es decir, debemos esperar que el aumento de la temperatura a la entrada, produzca disminuciones en la humedad residual del polvo; sin embargo, debe tenerse en cuenta hasta qué punto este incremento en la temperatura afecta la supervivencia de las células [12].

Por otra parte, al comparar los valores estimados de  $T_{7/10}$  a 4 °C, tenemos que el encapsulado es 1.7 veces más estable que el control, de este modo sobrepasa un año de almacenamiento a esta temperatura (1.39 años). Ello resulta relevante desde el punto de vista internacional, pues la mayoría de las formulaciones sólidas descritas a partir de bioplaguicidas, no llega a ser estable por más de 6 meses de almacenamiento a 4 °C [18].

Es necesario añadir que en estos experimentos, la estabilidad estimada a 4 °C y a temperatura ambiente (26 °C) para el control, fue mayor que la informada a partir de experimentos previos [4]; lo cual puede estar asociado a cambios en el proceso fermentativo, que

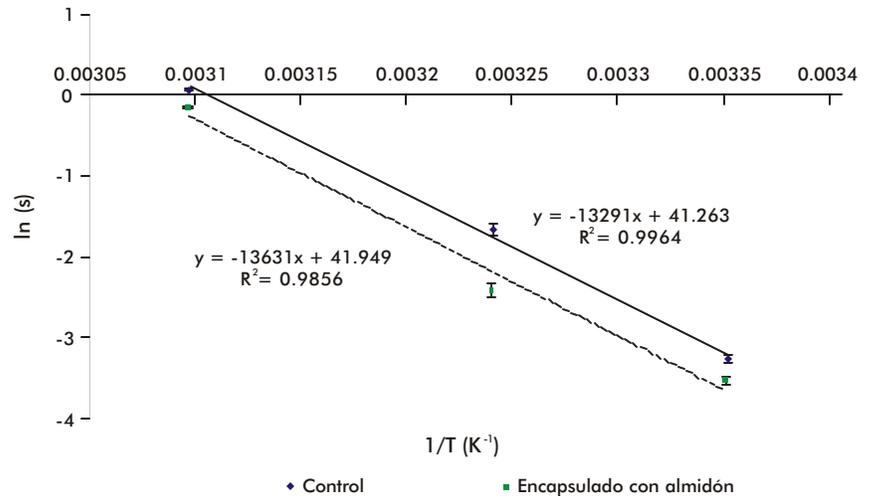


Figura 4. Modelo de Arrhenius para *Tsukamurella paurometabola* C-924 secada por atomización. Los datos mostrados corresponden a la constante de muerte (transformada a logaritmo natural) frente al inverso de la temperatura de incubación del formulado (26, 37 y 50 °C), tanto para el encapsulado como para el control.

aparentemente han incidido en un mejoramiento de la termotolerancia de la cepa C-924.

## Conclusiones

Al obtener células anhidrobióticas de *T. paurometabola* C-924, encapsuladas en almidón mediante secado por atomización, se elevan las tasas de supervivencia (mayores del 60%) y no dependen de la concentración del encapsulante entre 0 y 10%. Sin embargo, durante el almacenamiento a temperatura ambiente, el almidón confiere una mayor estabilidad a las células desecadas de C-924.

16. Ziadi M, Touhami Y, Achour M, Thonart Ph, Hamdi H. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. *Biochem Eng J* (2005); 24:141-5.

17. Hernández A, Weekers F, Mena J, Borroto C, Thonart P. Freeze-drying of the biocontrol agent *Tsukamurella paurometabola* C-924. Predicted stability of formulated powders. *Industrial Biotechnology* (2006); 2(3):209-12.

18. Fravel DR. Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* (2005); 43:337-59.

Recibido en septiembre de 2007. Aprobado en diciembre de 2007.