



Universidad Austral de Chile

Escuela de Ingeniería en Alimentos

Formulación de un Biocontrolador de *Erwinia Carotovora* en Polvo, a Partir de una Cepa de *Bacillus Subtilis* Utilizando Secado Spray

Tesis presentada como parte
de los requisitos para optar
al grado de Licenciado en
Ciencia de los Alimentos

Carolina Viviana Ojeda Hitschfeld

Valdivia – Chile
2007

PROFESOR PATROCINANTE:

Sra. Marcia Costa Lobo
Ingeniero Civil Bioquímico
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESOR PATROCINANTE:

Sr. Luigi Ciampi Panno
Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Ph. D.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESOR PATROCINATE

Sr. Kong Shun Ah-Hen
Ingeniero en Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Esta tesis fue financiada y forma parte del proyecto **FONDEF D03I 1140** titulado
**“Formulaciones y estrategias para mejorar el biocontrol de enfermedades
en cultivos de elevada importancia socioeconómica en Chile. Modelos:
Rhizoctonia solani en papas y *Erwinia carotovora* en calas”**.

**Con cariño a todas las personas
que me han acompañado durante
mi vida, en especial a mi familia.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a dios, quien ha sido mi luz durante este camino.

Le agradezco a mi familia, Papis Sergio y Vivi, Hermanos Susan, Alonso y Seba, abuelos, tíos y primos, quienes en la distancia me apoyaron siempre, dándome fuerza y amor en los momentos difíciles, y por darme la posibilidad de crecer tanto espiritual como profesionalmente.

A mis profesores y secretarias sin excepción ya que cada uno contribuyo con un granito a mi formación, pero en especial a la Profe Marcia por confiar en mi, y el profe luigi por su ayuda y apoyo.

Agradezco también a todos los tesistas, profesionales, y auxiliares tanto del Centro Tecnológico de la Leche, como de los institutos de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile, por que contribuyeron desinteresadamente a la realización de esta tesis.

A Roberto quien, si bien llego a mitad de este camino, me entrego la paciencia, cariño, apoyo y paz que necesitaba, y a sus padres Luigi y Renate, por sus consejos y calida acogida.

Finalmente, pero no menos importante a mis amigas de siempre Ely, Yasna, Zelaya, Karen, Ale, Dani, Ellen, Vale, Caro, Clau y compañeros de carrera y de "U", con los que compartí esta bella etapa.

A todos gracias.

"Pide y recibirás.

Busca y encontrarás.

Llama y la puerta se abrirá.

Porque quien pide recibe; quien busca encuentra; y a quien llama se le abre la puerta". (Jesús de nazaret, Mateo 7, 7-8)

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Bioconservación	3
2.1.1	Definición de bioconservación	3
2.1.2	Aplicación de bioconservación	4
2.1.3	Importancia de la utilización de control biológico en la agricultura e industria alimentaria	5
2.2	Técnicas asociadas a la producción de bioconservadores	7
2.2.1	Secado Spray	9
2.2.2	Agente encapsulante	12
2.2.2.1	Maltodextrina	14
2.2.2.2	Carragenina	14
2.2.2.3	Goma Guar	15
2.2.3	Caracterización reológica del formulado (Viscosidad)	15
2.3	Pudrición blanda cremosa, enfermedad de la cala y su control	18
2.3.1	<i>Erwinia carotovora</i>	18
2.3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	18
3.	MATERIAL Y MÉTODO	20
3.1.	Material biológico	20
3.1.1.	Cepa patógena	20
3.1.2.	Cepa antagonista	20
3.2.	Medios cultivo	20
3.3	ingredientes para las formulaciones	21
3.4	Equipos	21
3.5	Ensayos preliminares	21
3.5.1	Comportamiento de <i>Bacillus subtilis</i> sometido a deshidratación por Secado Spray	22
3.5.2	Prueba de antagonismo	22
3.6	Preparación y secado Spray de <i>Bacillus subtilis</i>	22
3.6.1	Recuperación de la cepa iniciadora del cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	22
3.6.2	Preparación del inóculo	22
3.6.3	Producción de <i>Bacillus subtilis</i> en fermentador	22
3.6.4	Formulaciones para secado	24
3.6.5	Secado Spray de <i>Bacillus subtilis</i>	25
3.6.6	Evaluación de las fórmulas de biopesticidas deshidratadas	26
3.7	Análisis estadístico	26
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	27
4.1	Ensayos preliminares.	27

4.2	Ensayos definitivos.	28
4.2.1	Producción de <i>Bacillus subtilis</i> en fermentador.	28
4.2.1.1	Recuento.	28
4.2.1.2	Densidad óptica.	30
4.2.2	Secado.	32
4.2.2.1	Selección de agente encapsulante “carrier”.	32
4.2.2.2	Temperatura durante el proceso.	34
4.2.3	Viabilidad y capacidad antagonista remanente de los productos deshidratados.	37
4.2.3.1	Viabilidad remanente de cada producto deshidratado durante 60 días.	37
4.2.3.2	Persistencia de la capacidad antagonista de cada producto deshidratado durante 60 días.	41
5	CONCLUSIONES.	45
6	RESUMEN	46
7	BIBLIOGRAFIA	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resumen de las ventajas y desventajas de microencapsulación por medio del proceso de secado <i>Spray</i> .	12
2	Fórmulas base de biopesticidas en polvo a partir de un cultivo de 10^8 ufc/mL de <i>Bacillus subtilis</i> .	24
3	Recuento promedio de unidades formadoras de colonias a muestras tomadas cada 24 h durante la fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> .	29
4	Densidad óptica (DO_{600nm}) a muestras tomadas cada 24hr durante la fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> .	30
5	Viscosidades (Pa s) de cada formulación a diferentes revoluciones por minuto medidas en el equipo automático Visco Star-R.	32
6	Pendientes e interceptos de la viabilidad de cada una de las muestras, de correlación exponencial.	39
7	Pendientes e interceptos de la actividad antagonista de cada una de las muestras, de correlación lineal.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de un sistema de secado <i>Spray</i> .	10
2	Esquema del flujo de aire y de alimentación, durante el proceso de deshidratación en la cámara de secado.	10
3	Formación de microgota o neblina en un atomizador rotatorio impulsado por aire comprimido.	11
4	Curvas de fluidez, esfuerzo de corte versus velocidad de deformación.	17
5	Línea de flujo elaboración controlador biológico deshidratado a partir de una cepa de <i>Bacillos subtilis</i> .	23
6	Fermentador artesanal capacidad 9L, propiedad de levaduras Collico prestado para realizar la fermentación	25
7	Secador Spray Niro Atomizer propiedad del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile.	26
8	Recuento promedio de células totales del cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> cada 24 horas durante la fermentación.	29
9	Curva densidad óptica del cultivo de <i>B. subtilis</i> en fermentador cada 24 horas (Do_{600nm}).	31
10	Comparación de viscosidad de distintas formulaciones, medida a diferentes revoluciones por minuto.	33
11	Temperatura de salida promedio de las tres repeticiones, de cada mezcla a la temperatura de entrada de 160°C.	36
12	Temperatura de salida promedio de las tres repeticiones, de cada mezcla a la temperatura de entrada de 170°C.	36
13	Temperatura de salida promedio de las tres repeticiones, de cada mezcla a la temperatura de entrada de 180°C.	37
14	Viabilidad del <i>Bacillus subtilis</i> antes y después del proceso de secado spray.	38
15	Efecto del secado <i>Spray</i> a tres diferentes temperaturas de proceso de las tres fórmulas durante el almacenamiento a temperatura ambiente.	39
16	Viabilidad remanente de cada prototipo, a partir del primer día después de secado y durante el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente.	40
17	Diámetro del halo de inhibición a tiempo cero y 7 días después del proceso de secado spray.	41
18	Halos de inhibición de cada una de los prototipos durante un periodo de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente.	43
19	Esquema de antagonismo	51

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Técnica de la gota sobre césped utilizada durante esta investigación.	51
2	Temperaturas promedio de entrada y salida durante el proceso de secado para cada muestra en °C.	52
3	Recuento de unidades formadoras de colonias promedio de cada muestra para los días 1, 7, 14, 21, 28 y 60.	53
4	Efecto de cada diferente mezcla a igual temperatura de entrada	54
5	Halos de inhibición promedio (mm) de cada muestra para los días 1, 7, 14, 21, 28 y 60.	55

1. INTRODUCCIÓN

El biocontrol de agentes causantes de enfermedades en las plantas ha surgido como una alternativa eficaz para controlar patógenos en cultivos agrícolas de importancia comercial. Entre los microorganismos con capacidad antagonista se destacan especies del género *Bacillus*, que generalmente ejercen su biocontrol produciendo metabolitos con actividad antibiótica.

Por otra parte, el desarrollo de nuevas tecnologías y procesos para la conservación de microorganismos, que aseguren su calidad y estabilidad en el tiempo, resulta ser una alternativa interesante para la formulación de preparados y creación de nuevos tipos de bioinsumos agrícolas y/o alimentarios.

La conservación de cultivos microbianos y su actividad, es esencial para facilitar la investigación e industrialización. Por ello, las cepas valiosas deben ser mantenidas por prolongados periodos de tiempo sin que sufran alteraciones en su estructura y funcionalidad. La elección de un método adecuado de conservación y las óptimas técnicas de proceso, resultan determinantes para mantener intactas sus características.

En el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, se ha aislado una cepa de *Bacillus subtilis* (BC10) que genera reacción antagonista produciendo metabolitos con actividad antibiótica sobre *Erwinia carotovora*, patógeno vegetal responsable de enfermedades en calas y papas.

La hipótesis de este trabajo plantea que: “si se aplica un proceso de deshidratación mediante secado *Spray*¹, bajo condiciones de proceso controladas, a suspensiones concentradas de *Bacillus subtilis* (BC10), se obtiene un concentrado celular en polvo, viable y con capacidad antagonista frente al *Erwinia carotovora*”.

Objetivo General

Formular un prototipo de un biopesticida deshidratado en base a células de *Bacillus subtilis* con actividad antagonista contra *Erwinia carotovora*

Objetivos específicos

- Definir un medio de suspensión adecuado para el proceso de secado, que permita obtener una buena recuperación de células viables de *Bacillus subtilis* con capacidad antagonista contra *Erwinia carotovora*

¹ Conocido también como secado por atomización o secado por aspersión.

- Determinar las temperaturas de proceso adecuadas para el secado *Spray* de *Bacillus subtilis* en el equipo Niro Minor.
- Determinar la viabilidad de cultivo deshidratado de *Bacillus subtilis* y su actividad antagonista.
- Evaluar la estabilidad al almacenamiento del cultivo deshidratado por secado *Spray* durante un periodo de 60 días a temperatura ambiente.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Bioconservación

La bioconservación está considerada por diversos autores como una alternativa factible dentro de las nuevas tendencias en conservación de alimentos. En este sentido, el consumidor demanda productos menos industrializados, sin aditivos químicos, más saludables, que no dejen residuos tóxicos para los consumidores, ni alteren las características organolépticas del producto, sin embargo, que inhiban con eficacia el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes (ZAMORA, 2005).

Por otra parte, el uso de biocontroladores en el suelo ha comenzado a utilizarse desde hace unas décadas. Su propósito ha sido, disminuir el uso de agroquímicos en la producción agrícola, productos altamente contaminantes y que, además de su elevado costo, traen como consecuencia el desarrollo de resistencia en la población de patógenos, así mismo, éstos están asociados a problemas de contaminación y toxicidad (RODRÍGUEZ, 2002).

Según BETTIOL (1991), citado por GIACAMAN (2006), las presiones económicas y ecológicas, han llevado a las instituciones ejecutoras y financieras a generar alternativas al control químico exclusivo para la protección de las plantas. Dentro de estas alternativas, el control biológico es un método relativamente moderno, cuyo objetivo principal es el mantener, a través de ciertas prácticas y de la introducción de una biomasa antagonista, todos los componentes del agrosistema en perfecto equilibrio.

2.1.1 Definición de bioconservación. No existe aún consenso entre los distintos autores sobre la definición de un cultivo bioprotector. BAKER y COOK (1974), citado por RODRÍGUEZ (2002) y por GIACAMAN (2006), definen el control biológico como “la reducción de la densidad del inóculo o actividad productora de la enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por la acción de uno o más organismos antagónicos en forma natural o por manipulación del ambiente, hospedero o de los propios microorganismos”.

La bioconservación se define como la extensión de la vida útil o incremento de la seguridad del alimento utilizando, su microbiota natural o sus metabolitos para inhibir o frenar el crecimiento y actividad de microorganismos deteriorantes o patógenos. Normalmente el término “bioprotección” se relaciona con la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, y “bioconservación” se relaciona con la inhibición de microorganismos deteriorantes (ZAMORA, 2005).

Un cultivo bioprotector se define como aquel capaz de aumentar la seguridad microbiológica de un alimento, sin alterar sus cualidades sensoriales (ZAMORA, 2005). Además, al ser incorporados en los alimentos no deben generar malos sabores o

texturas incorrectas y ser viables, pero no crecientes (HASSAN, 2003). La aceptación de la bioconservación depende de la correcta selección y aplicación de los cultivos bioprotectores adecuados y de, probablemente, determinadas enzimas para sistemas alimentarios particulares (ZAMORA, 2005).

BATCH (1964) citado por GIACAMAN (2006), lo define como “la acción de depredadores, parásitos, o patógenos en el mantenimiento de la densidad poblacional de otro organismo en un promedio inferior del que ocurriría en su ausencia”.

El control biológico, es la práctica o el proceso por el cual, los efectos indeseables de un organismo se reducen por la acción de otro organismo que no es la planta hospedera, ni el parásito o patógeno, ni el ser humano. En otras palabras biocontrol está mediado por un tercero; en el caso del biocontrol microbiano este es un microorganismo (GIACAMAN, 2006).

Para BETTIOL (1991) citado por GIACAMAN (2006), una manera tradicional y simple de definir control biológico de enfermedades de plantas es considerarlo como: “el control de un microorganismo a través de otro microorganismo”.

2.1.2 Aplicación de la bioconservación. La bioconservación no es nueva para el sector agrícola y alimentario, puesto que, los seres humanos han estado explotando las bacterias para la producción y preservación de alimentos durante siglos. Los microorganismos incluyendo bacterias, levaduras, y mohos se han utilizado desde el principio de la historia, para la producción de leche fermentada, carne, y productos vegetales, como también para la fermentación de bebidas tales como vino y cerveza. Muchos ingredientes utilizados en la industria alimentaria, como las vitaminas, estabilizantes, saborizantes, colorantes, y preservantes son producidos por microorganismos. El metabolismo microbiano es el responsable de la producción de agentes preservantes tales como ácidos, dióxido de carbono y alcohol, así como también de generar cambios que alteran el sabor, la textura, vida útil, seguridad, digestibilidad, y calidad alimenticia de alimentos fermentados (HASSAN, 2003).

De acuerdo a ZAMORA (2005), para que un cultivo bioprotector pueda ser considerado como tal debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. No debe presentar riesgo para la salud; no producir toxinas, u otros metabolitos que puedan influir negativamente en la salud del consumidor y no debe ser patógeno.
2. Debe tener efectos beneficiosos en el producto:
 - i. Debe integrarse en el producto y aportar efectos beneficiosos para el mismo.
 - ii. Debe adaptarse con facilidad al producto.
 - iii. Su actividad protectora debe ser estable.
 - iv. Su comportamiento ante una serie de parámetros ambientales debe ser predecible.
 - v. Debe ser competitivo ante la microbiota endógena.
 - vi. Debe poseer actividades enzimáticas deseables (gas, limo, etc.).
3. No debe producir efectos sensoriales negativos en un producto fabricado bajo buenas prácticas de manufactura.

4. Debe ser capaz de funcionar como indicador de contaminación microbiana ante condiciones de abuso de temperatura.

Los agentes de biocontrol logran una mejor reducción de la enfermedad vía un antagonismo microbiano, que implica una interacción directa con el agente causal de la enfermedad y/o una acción indirecta que implica al hospedero. El efecto directo, es generalmente un resultado de un antagonismo entre el agente del biocontrol y el patógeno debido a una acción antibiótica o a competencia y/o al parasitismo del alimento. Por otro lado, la interacción indirecta resulta del realce de los mecanismos de la defensa de la planta contra el patógeno invasor. La asociación de ambos efectos puede ser sensible con algunos agentes del biocontrol (EL HASSNI *et al.*, 2007).

2.1.3 Importancia de la utilización de control biológico en la agricultura y la industria alimentaria. Una clara utilización de biocultivos, bioprotectores o bioconservadores son los alimentos fermentados. Se definen como aquellos que han sido sujeto de la acción de microorganismos o de enzimas para producir cambios bioquímicos deseables. Los microorganismos pueden ser la microflora presente en los productos vegetales o animales, o se pueden adicionar, al igual que los sustratos. La fermentación es un proceso relativamente simple, natural, eficiente, barato, y de baja energía, usado para la preservación de alimentos y que reduce la necesidad de la refrigeración. Los productos finales de la fermentación influyen en las características del producto final y dependen de los microorganismos particulares implicados en la fermentación (HASSAN, 2003).

El control biológico junto con otras medidas ofrece una solución al problema de la pudrición blanda en calas provocada por *Erwinia carotovora*. En este ámbito, se han descrito algunos microorganismos que tienen efectos inhibitorios sobre *Erwinia* en tubérculos de papa (EMMERT y HANDELSMAN, 1999). Entre ellos se puede mencionar a los géneros *Pseudomonas* spp. (XU y GROSS, 1986 ab) y *Bacillus* spp. (VISSER *et al.*, 1986), citados por GIACAMAN, (2006).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son ideales como cultivos bioprotectores. Forman parte de la microflora inicial de muchos alimentos, no existe ninguna indicación de que representen riesgo para la salud del consumidor y son consideradas como GRAS (reconocidas generalmente como seguras) por la *Food and Drug Administration* de EEUU. Además, se sabe que pueden tener un efecto positivo para la salud, relacionándose con acciones anticancerígenas y de regulación del tránsito intestinal (ZAMORA, 2005).

Las bacterias más usadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y *Leuconostoc*. Se utilizan para la producción de la leche fermentada, carne, y productos vegetales, y producen el ácido láctico como el producto final primario de la fermentación. Levaduras del género *Saccharomyces*, usadas para la producción del vino, cerveza, y pan, liberan etanol y dióxido de carbono como productos finales primarios del metabolismo. Los hongos filamentosos tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, y *Rhizopus* proveen las enzimas que facilitan la degradación de sustratos para la fermentación (HASSAN, 2003).

Se han descrito diversos sistemas de inhibición microbiana desarrollados por bacterias ácido lácticas, como la producción de ácidos orgánicos, formación de metabolitos de

oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas. Estos mecanismos les permiten inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes, patógenos y/o deteriorantes como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Samonella*, *Clostridium*, *Staphilococcus* y *Listeria*, y también hongos y levaduras (ZAMORA, 2005).

Varios antagonistas microbianos, algunos de cuales están disponibles en formulaciones comerciales, han demostrado poseer potencial para el control del *Rhizoctonia solani* en papa u otros cultivos del medio ambiente bajo condiciones estudiadas. Sin embargo, muchos de estos microorganismos no se han estudiado para la supresión de la enfermedad de *R. solani* de la papa en su propio ecosistema de desarrollo. Aunque la eficacia de muchos agentes del biocontrol se ha demostrado bajo ciertas condiciones, el control de la enfermedad no es siempre constante. Una forma para mejorar el biocontrol es utilizar múltiples combinaciones de antagonistas eficaces. Las ventajas de este acercamiento incluyen diferentes mecanismos de acción, efectos sinérgicos, y mayor gamas de actividad ecológica. El biocontrol puede ser un medio eficaz de combate en muchos casos donde el control químico no está disponible o es difícil de practicar (TALBOT, 2005).

Los microorganismos son fáciles de crecer en grandes cantidades y en diversos sustratos, siendo ideales para la producción de metabolitos primarios y secundarios. Los tipos de productos químicos producidos por la fermentación microbiana incluyen acidulantes, aminoácidos, vitaminas, saborizantes, pigmentos, estabilizadores, espesantes, surfactantes, dulcificantes, polímeros, antioxidantes y agentes antimicrobianos (HASSAN, 2003).

Se ha estudiado la capacidad inhibitoria de las bacterias lácticas en carne envasada refrigerada, productos cárnicos y vegetales fermentados, conservas de verduras y frutas, carne separada mecánicamente, pescado y productos lácteos. En todos los casos, se describen efectos positivos o al menos prometedores, con muy pocos problemas secundarios asociados (ZAMORA, 2005).

Para la mayoría de las enfermedades causadas por los patógenos, las estrategias de control son muy limitadas o casi-inexistentes. Entre estas, el despliegue de cultivos resistentes aparece ser el acercamiento más conveniente y más económico, sin embargo, los genotipos con resistencia natural son escasos. Otras estrategias se basan, según lo demostrado, en el uso de microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos que tengan un potencial significativo para inhibir agentes causales de enfermedad o capacidad de realzar mecanismos de defensa. En el caso del biocontrol de la *fusariosis*, (enfermedad que ataca la palma datilera) la mayoría de los estudios han divulgado el uso de cepas no patógenas de *Fusarium* solamente o conjuntamente con bacterias tales como *Pseudomonas fluorescens* (EL HASSNI *et al.*, 2007).

Existen muchos microorganismos en los suelos de campos de cultivo que ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos agentes fitopatógenos, a pesar de las actividades humanas. Sin embargo, el hombre ha hecho intentos por aumentar la efectividad de los microorganismos antagónicos, ya sea introduciendo poblaciones nuevas y más prolíficas de antagonistas, al mismo tiempo que se agregan a los suelos nutrientes o estimulantes del crecimiento de los organismos antagónicos, incrementándose así la actividad antagónica sobre el patógeno (RODRÍGUEZ, 2002).

2.2 Técnicas asociadas a la producción de bioconservadores

El método de conservación ayuda en la disgregación de las células bacterianas en un ambiente adverso (por ejemplo, del producto del aparato gastrointestinal) reduciendo así, potencialmente pérdidas y/o viabilidad de las células. A este proceso de conservación, (secado y medio de suspensión), se le denomina en conjunto encapsulación o microencapsulación. El proceso de conservación y el medio de suspensión influyen directamente en la viabilidad de las bacterias, bajo condiciones adversas con respecto a cuando las bacterias estaban en el estado no encapsulado (HASSAN, 2003).

La encapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en miniatura. Esto implica el recubrimiento de un ingrediente sensible, ya sea puro o una mezcla, dentro de un material, para otorgar protección contra la humedad, calor u otras condiciones extremas, de modo de mejorar su estabilidad y aumentar su vida útil. En el encapsulado, la porción activa es designada como núcleo, fase interna o relleno, y el material encapsulante es llamado cáscara, recubrimiento o material de pared y puede variar tanto en espesor como en el número de capas. La forma de las cápsulas es generalmente esférica, pero se ven fuertemente influenciadas por la estructura del material original no encapsulado (ESCALONA, 2004).

Según PEDROZA (2002), en un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas. Dentro del término de microencapsulación, se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación. Por ejemplo, la farmacéutica hace una distinción entre microcápsulas y microesferas dependiendo de cómo se encuentre distribuido el material encapsulado dentro de la partícula.

YOUNG *et al.* (1993), definen la microencapsulación como una técnica "de embalaje" en la cual gotas líquidas o partículas sólidas son "embaladas" entre las películas delgadas (finas) de los agentes que microencapsulan. A la estructura formada por el agente encapsulador se le llama pared, y el material microencapsulado que se encuentra en el interior se le llama corazón. La pared protege el corazón contra el deterioro, limita la evaporación (o pérdidas) de materiales volátiles principales, y libera el corazón cuando las condiciones son las deseadas.

Las demandas tecnológicas, ya sea en procesos de fabricación como en formulación, que pueden requerir las bacterias seleccionadas, sobre todo para mantener sus características funcionales, son numerosas. El proceso de conservación seleccionado debe asegurar la supervivencia y funcionalidad de las bacterias, dentro de los cuales se distinguen: ultracongelación, liofilización o secado y también en los productos alimenticios en los cuales finalmente se formulan (HASSAN, 2003).

El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación o industriales basadas en la acción de estos microorganismos. Tomando como ejemplo los procesos de elaboración de alimentos fermentados, donde participan cultivos microbianos, se encuentra que el éxito de la producción depende

principalmente y directamente de las técnicas de proceso utilizadas, sin embargo lo que permite estandarizar y mantener la calidad uniforme del producto final es la correcta selección, mantención, manipulación, siembra y propagación de la cepas utilizadas, por lo cual la elección del método de conservación utilizado debe permitir mantener las características del microorganismo por las cuales fue seleccionado (ZAMORA, 2005).

Un cultivo de aplicación industrial tiene que reunir determinadas características: contener el máximo número de células viables, estar libre de contaminantes y ser activo en las condiciones de procesamiento. Esta claro que no existe un método único para conservar cultivos de microorganismos, luego la selección de este tiene que basarse en la naturaleza del cultivo y considerar ventajas e inconvenientes del método escogido (ZAMORA, 2005). Las condiciones bajo las cuales se almacenan y conservan las bacterias son también importantes para la calidad de productos en los cuales serán utilizadas. Los métodos de la encapsulación se han aplicado para aumentar la supervivencia y la distribución de cultivos bacterianos (HASSAN, 2003).

Los cultivos se siembran en medios estériles en poca cantidad y se mantienen activos mediante refrigeración, pero sólo para periodos de almacenaje cortos. Sin embargo, los métodos más utilizados para la conservación masiva de cultivos microbianos son congelación y deshidratación, que permiten mantener cultivos por prolongados periodos de tiempo conservando la viabilidad de los microorganismos (ZAMORA, 2005).

La viabilidad de los cultivos depende principalmente de: el medio de cultivo base, el medio de conservación, la rápida eliminación de los metabolitos, la naturaleza del medio de suspensión y las condiciones de deshidratación o congelación (HASSAN, 2003)

Para preparar las microcápsulas se dispone de numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes. No obstante, algunos autores clasifican a los métodos de encapsulación en: químicos y físicos o mecánicos.

- Como métodos químicos pueden citarse: coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y atrapamiento geles o en liposomas.
- Entre los métodos físicos se encuentran: secado por aspersión y la encapsulación por lecho fluidizado como los más comunes

La selección del método está en función del presupuesto, los costos, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación. Existen varios métodos para lograr la encapsulación de ingredientes entre los que se encuentran: secado *Spray*, recubrimiento en suspensión de aire, extrusión, *Spray cooling* y *Spray chilling*, coacervación, complejos de inclusión y polimerización interfacial. (PEDROZA, 2002).

El método de secado *Spray* es el método más utilizado en la industria de alimentos, debido a que es un proceso económico, flexible y produce partículas de buena calidad.

2.2.1 Secado *Spray*. (Secado por atomización) El método de secado por atomización es uno de los más importantes métodos para secar determinados productos líquidos como leche concentrada, extractos concentrados de café, huevos, extractos de levadura, caseína, zumos de frutas, té, sangre y otros concentrados proteicos. Para ello se atomiza (es decir, se transforma en aerosol o niebla) una solución o suspensión más o menos viscosa del producto, las pequeñas gotas líquidas así formadas se arrastran y deshidratan en una corriente de aire dando un polvo seco antes de caer sobre las paredes interiores de la torre de secado, las partículas de polvo al final del proceso tienen una forma esférica vacía en su interior que permite una fácil rehidratación (ZAMORA, 2005).

La calidad del producto tratado no se altera debido a que la intensa evaporación protege al producto del efecto de la elevada temperatura del aire caliente (el proceso de evaporación absorbe buena parte del calor aportado). En realidad, la energía aportada en forma de calor cede al producto el calor latente de vaporización haciendo que el incremento de temperatura de las partículas (debido al calor sensible) sea muy bajo. Por otra parte, la tasa de reacciones degradativas disminuye a bajos contenidos de humedad, y eso favorece que el corto tiempo de exposición de la partícula seca a temperaturas elevadas no comporte un deterioro importante al producto (ZAMORA, 2005).

Este proceso consiste en atomizar el material que se encuentra en estado líquido, ya sea como solución o como dispersión, en forma de finas gotas sobre una corriente de gas calentado. Cuando las pequeñas gotas del líquido toman contacto con el gas a mayor temperatura se produce una rápida evaporación del solvente, formándose una fina película del material de recubrimiento que se encuentra disuelto en él. Las microcápsulas usualmente caen en el rango de varios micrones hasta aproximadamente 200 μm . En este proceso, se pueden identificar tres pasos básicos:

- Preparación de la dispersión o emulsión a ser procesada.
- Homogeneización de la dispersión.
- Atomización de la masa dentro de la cámara de secado.

Este proceso se realiza en un secador *Spray* que se compone básicamente de un sistema de alimentación del líquido, un dispositivo de atomización (disco que gira a alta velocidad), una cámara de atomización y un sistema colector del producto seco (ESCALONA, 2004).

La rápida evaporación del agua del recubrimiento durante su solidificación mantiene el material núcleo por debajo de los 100°C, a pesar de las altas temperaturas utilizadas en el proceso. Esto, junto a que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 20 s) hace a este proceso apropiado para materiales sensibles al calor (PEDROZA, 2002).

Este método es el más ampliamente usado para encapsular ingredientes alimenticios y es el más económico. También se ha utilizado para la elaboración de dietas microencapsuladas para acuicultura, aunque no de manera intensiva. Este proceso es en sí uno de deshidratación, pero se considera también de encapsulación ya que puede producir partículas que atrapan el material a cubrir (PEDROZA, 2002).

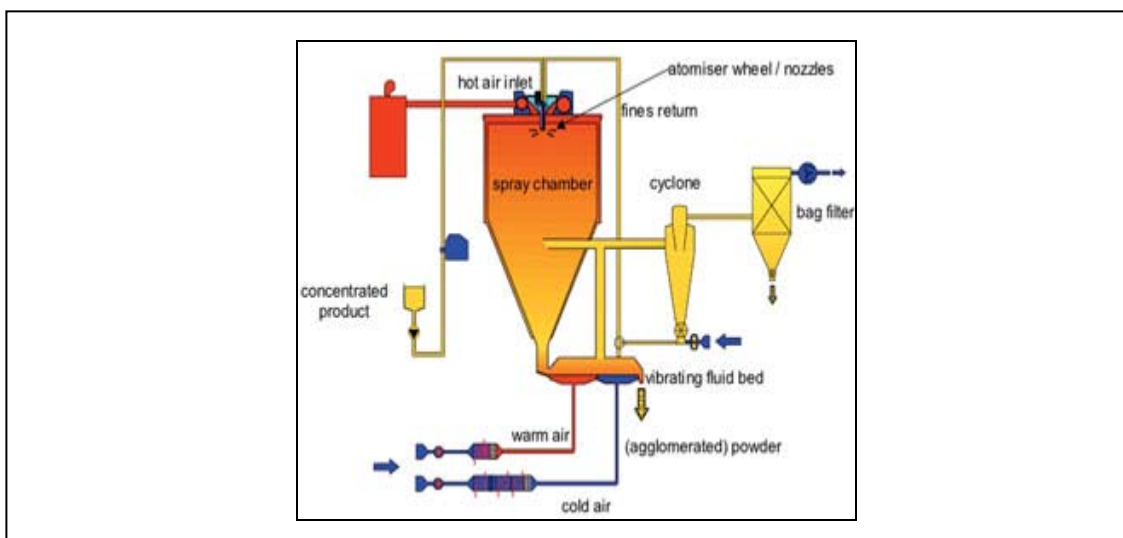


FIGURA 1 Esquema de un sistema de secado *Spray*²

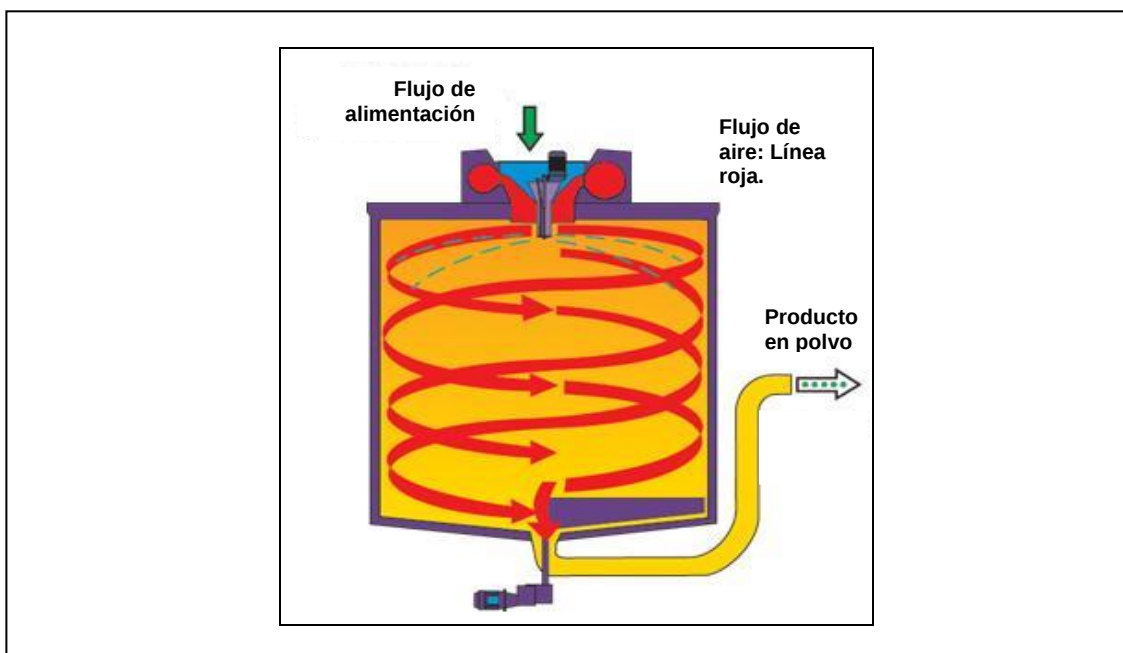


FIGURA 2 Esquema del flujo de aire y de alimentación, durante el proceso de deshidratación en la cámara de secado.³

El “Secado *Spray*” corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente (PEDROZA, 2002).

² http://www.kr.cd-pco.com/press_events/Dynamics/22/inzo.html

³ <http://br.geocities.com/abgalimtec/desidratacao.html>



FIGURA 3 Formación de microgota o neblina en un atomizador rotatorio impulsado por aire comprimido.⁴

La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es en general menor a 100 μm , aunque hay que destacar que ello depende de las condiciones del proceso. El proceso consiste de la preparación de la emulsión o suspensión del material a encapsular en una solución de encapsulante, la atomización y la deshidratación de las partículas atomizadas. La adecuada selección del atomizador y el agente encapsulante, son factores críticos. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (PEDROZA, 2002)

Las ventajas del secado por atomización según MASTERS (1991), citado por ZAMORA (2005), son las siguientes:

- Las especificaciones de los polvos permanecen constantes a lo largo del secado cuando las condiciones de secado son constantes.
- Una operación de secado continua y fácil se puede adaptar a un control automático completo.
- Existe un amplio intervalo de diseño de secadores, adaptables y que se pueden aplicar a materiales sensibles al calor, corrosivos y abrasivos.

Las desventajas más grandes de este proceso son los costos de instalación, eficacia térmica, calor residual, y manejo del aire agotado en condiciones de saturación.

Los encapsulantes o materiales formadores de pared más utilizados para este método han sido: Carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa y derivados); gomas (arábica, mezquite, alginato de sodio); lípidos (ceras, parafinas, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche). Desde luego que el tipo de material encapsulante tendrá

⁴ <http://www.niroinc.com/html/drying/fdspraychem.html>

influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, en el tamaño de partícula, en las propiedades de flujo, en las mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (PEDROZA, 2002).

La encapsulación por medio del secado *Spray* es el método más usado por la industria alimentaria por ser de bajo costo, económico y flexible, existe una gran variedad de equipos en el mercado que producen partículas de alta calidad. Las ventajas y desventajas del secado *Spray* se resumen en el CUADRO 1 cuando el secado *Spray* con pequeñas cantidades de agente ligante como proteínas o polisacáridos solubles en agua se obtiene partículas pequeñas y es posible controlar la estructura porosa de los gránulos (HASSAN, 2003).

CUADRO 1 Resumen de las ventajas y desventajas de microencapsulación por medio del proceso de secado *Spray*.

Ventajas	Desventajas
Tecnología conocida	Materiales encapsulados son solubles solo en agua con una baja a moderada viscosidad.
Producción de gran cantidad de capsulas	Solo el 20-30% de la partícula es corazón.
Muchos materiales encapsulados están aprobados para empleo de alimentos.	Al encapsular compuestos con alto contenido lipídico estos se oxidan.
Variedad de tamaños de partículas	Perdida de compuestos de bajo punto de ebullición.
Útiles para ingredientes sensibles al calor. Excelente dispersión de las microcápsulas en medios acuosos.	Es necesario utilizar un agente antiaglomerante.

FUENTE. HASSAN, 2003.

2.2.2 Agente encapsulante. Independientemente del método para preparar las microcápsulas, el primer paso para encapsular un ingrediente es la selección de una matriz de encapsulación adecuada o *carrier* (PEDROZA, 2002).

Existe una amplia variedad de materiales de recubrimiento; sin embargo, es importante considerar las características de éste en cuanto a flexibilidad, fuerza o resistencia, permeabilidad, facilidad de aplicación, naturaleza hidrofóbica o hidrofílica, ya que todas ellas influirán en las características del producto final (ARANCIBIA, 1981 y ESCALONA, 2002). A estas características se le debe adicionar una condición expresada por HASSAN (2003), quien dice que el agente encapsulante ideal debe cumplir con buenas características reológicas y facilidad de manipulación al momento de la encapsulación.

En vista de la utilidad del microencapsulación hay algunas publicaciones que se ocupan del efecto de diversos polisacáridos y de los materiales de la cápsula especialmente (HASSAN, 2003).

La encapsulación de ingredientes en la industria de alimentos permite: (DZIEZAK, 1988)

- Estabilizar el material núcleo.
- Controlar la liberación del material núcleo (velocidad y comienzo de la liberación).
- Separar reactivos o componentes incompatibles en una formulación.
- Protección de componentes sensibles del alimento (luz, humedad, calor).
- Aseguramiento contra pérdidas nutricionales.
- Utilización alternativa de ingredientes sensibles.
- Incorporación de mecanismos de liberación inusuales de tiempo dentro de la formulación.
- Enmascarar o preservar sabores y aromas.
- Transformar ingredientes líquidos en sólidos fácilmente manejables.

Entre los materiales de recubrimiento utilizados están los polisacáridos (almidón, maltodextrinas, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, gomas arábica, mezquite, alginato de sodio), lípidos (ceras, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soja, caseínatos, suero de leche, zeína) (PEDROZA, 2002).

Cuando se usan polisacáridos como agentes encapsulantes, como en el secado por aspersión, también deben revisarse detalladamente sus propiedades funcionales. Por ejemplo, las maltodextrinas se usan en combinación con goma arábica para contribuir en la continuidad estructural durante la formación de la película encapsulante, al combinar dos compuestos de muy diferente peso molecular (aproximadamente 1.8 kDa y 1.700 kDa respectivamente) mejorando con ello la eficiencia de encapsulación de aceites, aún de bajo peso molecular. Sin embargo, el grado de hidrólisis de las maltodextrinas también es un factor a considerar, ya que muy bajos equivalentes de dextrosa no tienen el efecto positivo mencionado (PEDROZA, 2002).

Otro tipo de agente ampliamente utilizado en la formación de paredes de las microcápsulas cuando se encapsula por secado por aspersión, son proteínas como los aislados del suero de leche, que resultan adecuados para este proceso donde una de las restricciones es usar sólo materiales que aún en alta concentración sean de baja viscosidad, condición que cumplen. Pueden utilizarse solas o combinadas con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas. El uso de proteínas de suero de leche tiene efecto sobre la morfología de las microcápsulas haciéndolas más esféricas y de superficie tersa en comparación con las de polisacáridos (PEDROZA, 2002).

La microencapsulación en la industria de alimentos generalmente se aplica a sustancias volátiles, condimentos, vitaminas, aceites esenciales y oleorresinas, bacterias, enzimas, y minerales. Aunque muchas técnicas de microencapsulación han sido desarrolladas, el secado *Spray* o por aspersión es el más usado comúnmente para microencapsular ingredientes de alimentos (GOUNG *et al*, 1993).

El material de la pared para microencapsulación por secado *Spray* debe poseer alta solubilidad y capacidad de emulsificación para la formación de la película, y además buenas propiedades al momento de secar; además, sus soluciones concentradas deben tener viscosidad baja. Aunque muchos “*carrier*” estén disponibles para usos no alimenticios, la variedad de materiales aprobados para usos de alimentos es limitada e

incluye gomas naturales, hidratos de carbono, ceras, y algunas proteínas (GOUNG *et al*, 1993).

En la actualidad existen numerosos ingredientes encapsulados: agentes saborizantes, ácidos, bases, endulzantes artificiales, colorantes, preservantes, agentes leudantes, aromas y nutrientes (DZIEZAK, 1988).

La encapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en miniatura. Esto implica el recubrimiento de un ingrediente sensible, ya sea puro o una mezcla, dentro de un material para otorgar protección contra la humedad, calor u otras condiciones extremas, de modo de mejorar su estabilidad y aumentar su vida útil. En el encapsulado, la porción activa es llamada núcleo, fase interna o relleno, y el material encapsulante es llamado cáscara, recubrimiento o material de pared y puede variar tanto en espesor como en el número de capas. La forma de las cápsulas es generalmente esférica, pero se ven fuertemente influenciadas por la estructura del material original no encapsulado (DZIEZAK, 1988).

2.2.2.1 Maltodextrina. La FDA define las maltodextrinas como un polímero sacárido nutritivo no dulce que consiste en unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces α (1-4) y que tienen un equivalente de dextrosa (ED) menor que 20. Es preparado como un polvo blanco o en solución concentrada por hidrólisis parcial del almidón de maíz o de papa con ácidos permitidos o enzimas. Las maltodextrinas son clasificadas por su ED. El ED se relaciona con el grado de polimerización (GP) de la molécula de almidón, de acuerdo a $ED = 100/GP$. El grado de polimerización corresponde al número de unidades monoméricas o monosacáridas. A más alto ED mayor es el número de unidades monosacáridas y los polímeros son de cadena más corta. La glucosa (dextrosa) posee un $ED = 100$ y el almidón es aproximadamente cero. Debido a que las maltodextrinas consisten en una mezcla de polímeros de varios largos (glucosa, maltosa, oligosacáridos y polisacáridos) el ED es un valor promedio. Las maltodextrinas presentan baja higroscopicidad, buena solubilidad y bajo poder edulcorante. Son utilizadas en la industria de alimentos en caramelos (30%), pastelería (20%), sopas y caldos (20%), productos lácteos (10%), bebidas cítricas (10%), alimentos para bebés (10%), entre otros (ESCALONA, 2002).

2.2.2.2 Carragenina. Es un polisacárido que naturalmente llena los vacíos en la estructura celular de algas rojas. Polisacárido de alto peso molecular con unidades de galactosa y 3,6-anhidrogallactosa (3,6-AG), tanto sulfatado como no sulfatado, unido por enlaces 1,3 y 1,4 a acoplamiento glicosídicos. Varias las disposiciones que ocurren naturalmente de componentes crean tres tipos básicos de carragenina, comúnmente mencionaba kappa, beta, y lambda. Las variaciones de estos componentes influyen en la fuerza de gel, textura, solubilidad, sinergismos, y la temperatura a la que solubiliza. Todas las carrageninas son solubles en el agua caliente, desarrollando muy baja viscosidad en fluidos durante este proceso (HASSAN, 2003).

Los geles formados pueden ser licuados nuevamente calentándolos a aproximadamente 5-10 grados sobre la temperatura de gelificación (40-70°C). La carragenina pertenece a una familia de hidrocoloides que poseen diferentes propiedades y, por lo tanto, poseen una amplia variedad de usos. Los empleos más importantes están en el agua y mezclas a base de leche, que se utilizan como

cobertura de tortas o en bebidas de chocolate (usos de hinchamiento en alimentos calientes-procesados, y usos de hinchamiento en alimentos procesados por frío) (HASSAN, 2003).

La carragenina ha tenido mucha utilidad en la industria alimentaria como mezcla o componente exclusivo en gran variedad de productos como agente encapsulados de microorganismos y reductor de la pérdida de humedad, la oxidación, o la desintegración. Los geles de carragenina son termo reversible. A causa de su reactividad con ciertas proteínas, la goma ha encontrado el empleo en concentraciones bajas (típicamente 0,01 al 0,03 %) en un número de productos de alimentación (HASSAN, 2003).

La “Carragenina Lambda (λ)” es la única fracción de carrageninas que no requiere de calor para su solubilización, es soluble en agua y leche fría, impartiendo alta viscosidad en estos sistemas haciéndola altamente recomendable para preparaciones en polvo instantáneas, poseen un contenido aproximado de 35% de éster sulfato y 0% de 3,6 AG lo que le confiere su alta capacidad de agente espesante y estabilizante (GELYMAR, 2007)

2.2.2.3 Goma Guar. La goma Guar es un polisacárido de alto peso molecular que se obtiene del endosperma de la semilla del *Syamopsis tetragonolobus*, planta que pertenece a la familia de la leguminosas, su aspecto corresponde a un polvo blanco o ligero amarillo de sabor neutro o insípido, químicamente la goma Guar es un galactomanano formado por monómeros de manosa y galactosa en una relación de 2:1, tiene un bajo contenido de proteínas (4,5%). La molécula de Guar es un polímero lineal de peso molecular aproximado de 220 kDa (GELYMAR, 2007).

Se dispersa y solubiliza en agua fría y caliente, y es insoluble en solventes orgánicos. Se hidrata fácilmente y aporta alta viscosidad a bajas concentraciones, la viscosidad depende de la concentración, temperatura, tiempo de agitación, tamaño de partícula, actúa sinérgicamente con la goma xantán produciendo notable aumento de viscosidad, es de naturaleza no iónica y es compatible con prácticamente todos los hidrocolides de origen vegetal, incluyendo almidones y CMC. El rango de pH óptimo de trabajo es de 3 a 11. (GELYMAR, 2007).

Tiene diversos usos en alimentos, productos farmacéuticos y aplicaciones industriales. Se puede usar como ingrediente por si solo o en combinación con otros hidrocolides como goma xantán. Su característica como fijador de agua lo hace ideal como agente de hidratación rápida en la formulación de soluciones coloidales viscosas (GELYMAR, 2007).

2.2.3 Caracterización reológica del formulado (Viscosidad). Además de cumplir la función de *carrier*, el agente encapsulante le da al fluido las características reológicas apropiadas para que, a su paso por el atomizador, genere las microgotas del tamaño y consistencia adecuados, para el secado en la cámara.

El conocimiento de las características reológicas es de gran importancia práctica en la optimización de operaciones industriales, como el bombeado, mezclado, calentamiento, enfriamiento, secado por aspersión (*Spray*) y otros que involucran transferencia de masa y calor (PERRY, 1997).

Un fluido es una sustancia que sufre continuas deformaciones cuando se le somete a un esfuerzo de corte o cizalla y la resistencia que ofrece el fluido a estas deformaciones se denomina consistencia. La viscosidad (μ) es para líquidos simples o newtonianos una medida de su consistencia (PERRY, 1997).

La fuerza por unidad de área que se requiere para el movimiento de un fluido se define como F/A y se denota como " σ " (tensión o esfuerzo de corte o cizalla). Según Newton la tensión de cizalla o esfuerzo cortante es proporcional al gradiente de velocidad (dV/dy). En los fluidos llamado newtonianos la proporcionalidad es lineal y constante. Si se duplica la fuerza, se duplica el gradiente de velocidad, ello lo indica la Ley de Newton, expresada por:

$$\tau = \mu \left(\frac{dV}{dy} \right), \text{ donde } \mu \text{ es la viscosidad.}$$

La viscosidad se define como la relación del esfuerzo cortante en un punto (τ) y el gradiente de velocidad; es una medida de la fricción interna del fluido, que tiende a oponerse a cualquier cambio dinámico del movimiento (REID y SHERWOOD, 1968).

El estudio de la respuesta de los materiales a esfuerzos se conoce como reología. En este concepto el fluido newtoniano es viscoso. Los fluidos no newtonianos también son materiales viscosos en los cuales el esfuerzo cortante esta relacionado con la tasa de corte dV/dy . Un fluido no newtoniano cuyo comportamiento se describe mediante la

ecuación: $\tau = k \left(\frac{dV}{dy} \right)^n$, donde τ es el esfuerzo cortante, k y n son constantes. Con

$n < 1$ se conoce como pseudoplástico; este nombre se origina porque con el incremento de la tasa de corte, existe una curiosa disminución de la viscosidad efectiva. Es decir, con un incremento en el gradiente de velocidad el líquido se adelgaza, es decir la curva pseudoplástica cae por debajo de la línea del fluido newtoniano. En la FIGURA 4 se muestra la curva esfuerzo de corte-gradiente de velocidad. Muchos fluidos no newtonianos son pseudoplásticos. Por otra parte, si $n > 1$, el fluido se conoce como dilatante; aquí el fluido se engruesa con un aumento del esfuerzo de corte (SHAMES, 1999).

A modo de resumen. Los fluidos **newtonianos** muestran una relación lineal entre τ y dV/dy . En este caso $\tau = \mu(dV/dy)$, donde μ es la "viscosidad verdadera" (FRYER, 1997). Los fluidos **pseudoplásticos y dilatantes** muestran una relación no lineal entre τ y dV/dy que en ambos casos se representa por la "Ley de la Potencia"

$$\tau = k \left(\frac{dV}{dy} \right)^n; \text{ } k \text{ y } n \text{ son parámetros del modelo de flujo.}$$

k se denomina "índice de consistencia" mientras que n es el "índice de comportamiento". Para los fluidos pseudoplásticos se cumple que $n < 1$ mientras que $n > 1$ ocurre para los dilatantes. La Ley de la Potencia representa al fluido newtoniano cuando $n=1$ (FRYER, 1997).

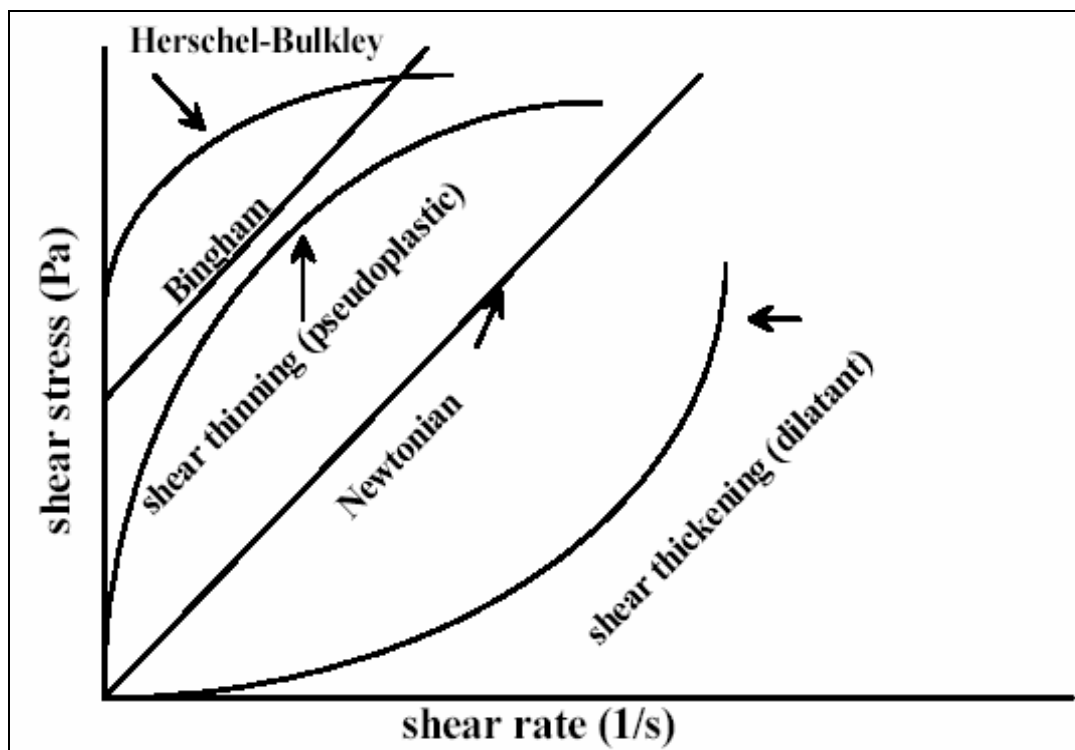


FIGURA 4. Curvas de fluidez, esfuerzo de corte versus velocidad de deformación.

FUENTE: FRYER (1997).

Las medidas de viscosidad se realizan con aparatos denominados **viscosímetros** o **reómetros**. Este último término se reserva para aparatos más complejos que son capaces de explorar un amplio intervalo de esfuerzos cortantes y velocidades de corte así como de registrar variaciones de los parámetros reológicos con el tiempo (FRYER, 1997).

Los diferentes reómetros son clasificados por el fundamento en el que basan la medida que puede ser, el originar un flujo mediante una presión conocida (viscosímetros de flujo) u originando un movimiento circular en el interior de un receptáculo (viscosímetros rotacionales) (FRYER, 1997).

Los **rotacionales** son equipos muy versátiles que pueden estudiar el comportamiento reológico en cualquier rango incluso en fluidos con partículas en suspensión. Son de gran precisión. Pueden estudiar incluso **viscoelástica**. Se basan en un elemento rotacional que impone una determinada velocidad de rotación para la que se calcula la velocidad de corte correspondiente y el esfuerzo cortante que requiere del elemento motor. No pueden ser usados en línea (FRYER, 1997).

Los de **cilindros concéntricos** y **platos** tienen un rango de aplicación muy grande. Por su geometría τ y dV/dy pueden ser deducidos muy fácilmente. Son aparatos de precisión, normalmente automatizados y por ello son caros. No son adecuados para medir fluidos con partículas en suspensión (FRYER, 1997).

2.3 Pudrición blanda cremosa, enfermedad de la cala y su control

La enfermedad conocida como pudrición blanda cremosa o pudrición húmeda, es provocada por *Erwinia carotovora* y cepas de *Bacillus subtilis* pueden ejercer su control.

2.3.1 *Erwinia carotovora*. Según KUNSTMANN (2002), la patología más importante que afecta a cala, provocando importantes pérdidas económicas, es la incidencia de la pudrición blanda en tejidos de túberos, causada por *Erwinia carotovora subsp. carotovora*.

Los miembros del género *Erwinia*, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos rectos 0,7-1,5 μ , Gram negativos, no esporulados, móviles por flagelos peritricos. Son anaerobios facultativos, catalasa negativa y oxidasa positiva, las colonias son usualmente blancas, grises o amarillentas, con temperaturas óptimas de cultivo de 27-30° C (GIACAMAN, 2006).

Dentro del género *Erwinia*, se encuentra un grupo patogénico que se caracteriza por causar la putrefacción blanda en muchas especies de plantas a nivel mundial. Dentro de este grupo se encuentran, *E. carotovora subsp. carotovora* y *E. carotovora subsp. atroseptica*, las que crecen a temperaturas diferenciales, es decir *E. carotovora subsp. carotovora* crece a 27 y 33,5°C, y *atroseptica* crece a 27°C (GIACAMAN, 2006).

Las bacterias del género *Erwinia* que causan pudrición blanda se encuentran sobre la superficie de las plantas o en el suelo. Las vías de penetración son a través de heridas o de aperturas naturales en la superficie de la planta. Una vez dentro, estos residen en el tejido vascular y espacio intracelular del tejido parenquimático. La principal arma que utilizan estas bacterias para causar la enfermedad, es la producción de múltiples exoenzimas, como las pectinasas, celulasas y proteasas, que destruyen la pared celular tanto del túbero como del tallo de la planta. *Erwinia carotovora*, es un miembro de la familia Enterobacteriaceae recientemente llamadas *Pectobacterium carotovorum*. Son Gram negativos, poseen flagelos peritricos, producen enzimas pectinolíticas que causan pudrición blanda y se encuentra a nivel mundial sobre un amplio rango de hospederos (GIACAMAN, 2006).

Las plantas infectadas se tornan amarillas, emitiendo un fuerte olor desagradable, pudiendo ser completamente macerada al cabo de unos días provocando su muerte (GIACAMAN, 2006). BLOM y BRONCEA (1999) citado por GIACAMAN (2006), aclara que la infección no siempre resulta en la putrefacción blanda de los tejidos, sino que, en algunas oportunidades la bacteria puede permanecer en forma latente durante mucho tiempo.

2.3.2 *Bacillus subtilis*. En la búsqueda y selección de microorganismos como agentes de biocontrol, el género *Bacillus spp.* ha resultado de gran eficacia en el control de fitopatógenos (GIACAMAN, 2006).

Las especies incluidas el género *Bacillus spp.* comprenden un gran número de diversas formas bacilares, son Gram positivas, oxidasa y catalasa positivas. Son bacterias móviles por flagelos peritricos y aerobios estrictos en su mayoría. En medios de cultivo líquidos crecen formando un “velo” en la superficie. Los miembros de este género son capaces de producir endosporas, las que resisten altas temperaturas y

factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (GIACAMAN, 2006).

Bacillus como grupo ofrece varias ventajas sobre otras bacterias para la protección contra patógenos de la raíz debido a su capacidad de formar endosporas, y al amplio espectro de actividad de sus antibióticos. El tratamiento de semillas con agentes biocontroladores es apropiado para el biocontrol de los patógenos del suelo y de la propia planta. Hay mucha información de cepas de *Bacillus spp.* que reprimen patógenos del suelo. La colonización de la rizosfera y el control de la enfermedad desde la raíz con especies de bacilos introducidos como inóculos de la semilla, ha sido también divulgado (CAVAGLIERI *et al.*, 2005).

Bacillus subtilis, es la especie tipo del género, se encuentra comúnmente en el suelo y se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, producir una gran variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales contribuyendo al ciclo nutritivo. Respecto a las características de las colonias, éstas se pueden observar redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café (GIACAMAN, 2006).

B. subtilis, es un microorganismo inocuo, no es considerado patógeno o toxigénico de los humanos, animales, o plantas, por lo que el potencial riesgo asociado al uso de este, en instalaciones industriales es bajo. Es usado en la producción comercial ya que posee una reconocida actividad antimicrobiana, lo cual ha permitido emplearlo como un agente de control biológico. *Bacillus subtilis* produce más de dos docenas de antibióticos, donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica (GIACAMAN, 2006).

3. MATERIAL Y METODOS

La presente investigación consistió en diseñar prototipos y posterior evaluación *in vitro* de un biopesticida deshidratado en base a una cepa de *Bacillus subtilis* (BC10). Esta presenta actividad antagonista al agente causal de la pudrición húmeda *Erwinia carotovora*. La evaluación considera viabilidad de la cepa y persistencia de la capacidad antagonista frente al patógeno.

Las experiencias prácticas se realizaron en las Plantas Piloto Productos Lácteos y de Procesamiento de Productos Vegetales, laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICYTAL) y laboratorio de Bioinsumos del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, Xª Región.

3.1 Material biológico utilizado

Para realizar el estudio se usaron dos cepas bacterianas:

3.1.1 Cepa patógena. La cepa patógena utilizada es *Erwinia carotovora* aislada de túberos de calas putrefactas, facilitada por el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. Esta cepa se mantiene en agar inclinado en refrigeración a 5°C y se debe reactivar en caldo soja en horno a 25°C durante 24 horas antes de utilizar.

3.1.2 Cepa antagonista. Corresponde a una cepa de *Bacillus subtilis* (BC10), aislada desde el ambiente natural en el laboratorio de fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. Esta cepa es mantenida en medio melaza a temperatura ambiente.

3.2 Medios de Cultivo

- Agar Papa Dextrosa APD, (Oxoid), para recuento de *Bacillus subtilis* y para efectuar las pruebas de actividad antagonista.
- Caldo cerebro corazón (Difco), para hidratar y reactivar la cepa de *Bacillus subtilis* deshidratado.
- Caldo soja (Difco), para reactivar *Erwinia carotovora*.
- Agua peptonada medio de dilución (peptona al 0,01%) para efectuar recuentos de *Bacillus subtilis*.
- Medio melaza. Medio utilizado para cultivar *Bacillus subtilis*, ha demostrado tener alto rendimiento de biomasa, bajo costo y fácil preparación, además de mantener la capacidad antagonista de la cepa (GIACAMAN, 2006), contiene:
 - Melaza de remolacha, proporcionada por la empresa Levaduras Collico.
 - Azúcar lansa como fuente de sacarosa.

- Extracto de levaduras, Difco.
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Merck.
- K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , J.T.Baker.
- Agua corriente de la llave, como fuente agua y de sales para medio melaza.
- Antiespumante.

3.3 Ingredientes para las formulaciones

- Carragenina Lambda, Gelymar.
- Goma Guar, Gelymar.
- Maltodextrina de 19-20% ED, Prinal.

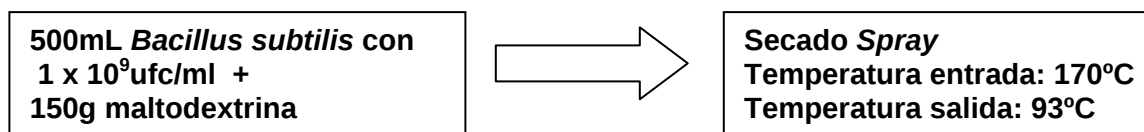
3.4 Equipos

Para llevar a cabo los ensayos fueron necesarios los siguientes equipos:

- Autoclave, All-American modelo x2430(25x).
- Bomba peristáltica, Watson Marlon 3025.
- Balanza analítica, Arquimed.
- Cámara de flujo laminar, Factomed y Eaci Envirco.
- Circulador de agua termorregulado, HAAKE. FK..
- Compresor, Mosay Compressor 3HP Italia.
- Compresor, Hydrovane, 50L-18Bar.(Fluid Force).
- Espectrofotómetro, Spectronic Genesys 5.
- Fermentador artesanal, facilitado por Industria Levaduras Collico S.A..
- Horno 25°C, Imperial II incubator.
- Horno 32°C, Memmert Cientec.
- pHímetro, Mitutoyo CD-6°C (Hanna Instrument).
- Pie de metro, Bench Meters,(Hanna instrument).
- Refrigerador, Bosch.
- Secador, Niro Atomizer serie 1853, Denmark.
- Shaker, Agitador orbital termorregulado, Max Q 4000 (BI Barnstead).
- Viscosímetro, Visco Star –R, Fungilab S.A.
- Materiales de uso habitual de laboratorio, tales como: matraces, probetas, material de vidrio para almacenaje y toma de muestra, cronómetro, cubetas, pipetas, micropipetas, placas de Petri de vidrio y desechables, etc.

3.5 Ensayos preliminares

Se realizaron pruebas preliminares, para comprobar la factibilidad de someter a la cepa BC10 de *Bacillus subtilis*, a un proceso de deshidratación a altas temperaturas como el secado *Spray*.



3.5.1 Comportamiento de *Bacillus subtilis* sometido a deshidratación por Secado Spray. Se preparó una fórmula de cultivo de *Bacillus subtilis* de 10^9 ufc/mL en medio melaza (500 mL) y se mezcló con maltodextrina, se dejó reposar por 12 h en refrigeración y se secó por atomización en un equipo Niro Atomizer con temperaturas del aire de entrada y salida 170°C y 93°C, respectivamente.

3.5.2 Prueba de antagonismo. La prueba de antagonismo se realizó a muestras de cultivo celular líquido y en polvo hidratado. Se utilizó la técnica de gota sobre césped (ANEXO 1) en duplicado.

3.6 Preparación y secado Spray de *Bacillus subtilis*

En la FIGURA 5 se muestra un esquema de los pasos a seguir para la preparación y posterior secado de *Bacillus subtilis*.

3.6.1 Recuperación de la cepa iniciadora del cultivo de *Bacillus subtilis*. La cepa iniciadora del cultivo para el presente ensayo, debe tener buena viabilidad y capacidad antagonista frente a *E. carotovora*. Al momento de comenzar el ensayo se contaba con *B. subtilis* (BC10) conservado de tres métodos distintos, entre los cuales se debió escoger la cepa que presente mejor respuesta al momento de realizar pruebas de antagonismo enfrentándolo con dos cepas de *E. carotovora* y que a su vez presente rápida reactivación y morfología característica en su estado no esporulado.

Los cultivos puros de *B. subtilis* (BC10) estaban congelados en leche y glicerol, y deshidratado (muestra de pruebas preliminares). Se procedió a sembrar 0,1 mL, 0,1 mL y 0,1 g respectivamente, en 10 mL Caldo Cerebro Corazón y se incubó a 32°C por 24 horas. Posteriormente, se sembró en estrías por agotamiento en placas con agar APD y se incubó a 32°C. Paralelamente, a cada uno se le realizaron pruebas de antagonismo enfrentándoles a dos cepas de *Erwinia carotovora*. Fue necesario realizar tinción de Gram a una colonia aislada de cada placa para comprobar pureza y morfología.

3.6.2 Preparación del inóculo. A partir de una cepa pura de *Bacillus subtilis* reactivada en caldo cerebro corazón, se inoculó al 1% en medio melaza estéril y se incubó en agitador orbital a 120 rpm a 32°C por 72 h o hasta alcanzar un mínimo de 10^8 ufc/mL. Para obtener de esta manera, 600 mL de inóculo para la fermentación. Se tomó una muestra de 5 mL, para realizar recuento de células viables (ufc/mL), medir densidad óptica del cultivo (DO_{600nm}) y preparar un nuevo inóculo.

3.6.3 Producción de *Bacillus subtilis* en fermentador. Para realizar este ensayo se requería de 15 L de cultivo, con altas concentraciones de biomasa (mínimo 10^8 ufc/mL), los cuales se obtuvieron por medio de un sistema de producción por lotes, en un fermentador con capacidad máxima 9 L, y que, cuenta con los requerimientos mínimos para el desarrollo del *Bacillus subtilis*, es decir, con sistema de aireación y control de temperatura (FIGURA 6).

El sistema de aireación se logró mediante una parrilla perforada ubicada en la base interna del equipo, circuito al cual se conecta un compresor de aire. El aire que ingresa al fermentador es filtrado para mantener la pureza del cultivo y su flujo se controlará manualmente según los requerimientos del cultivo. El equipo no contaba con sistemas de agitación forzada.

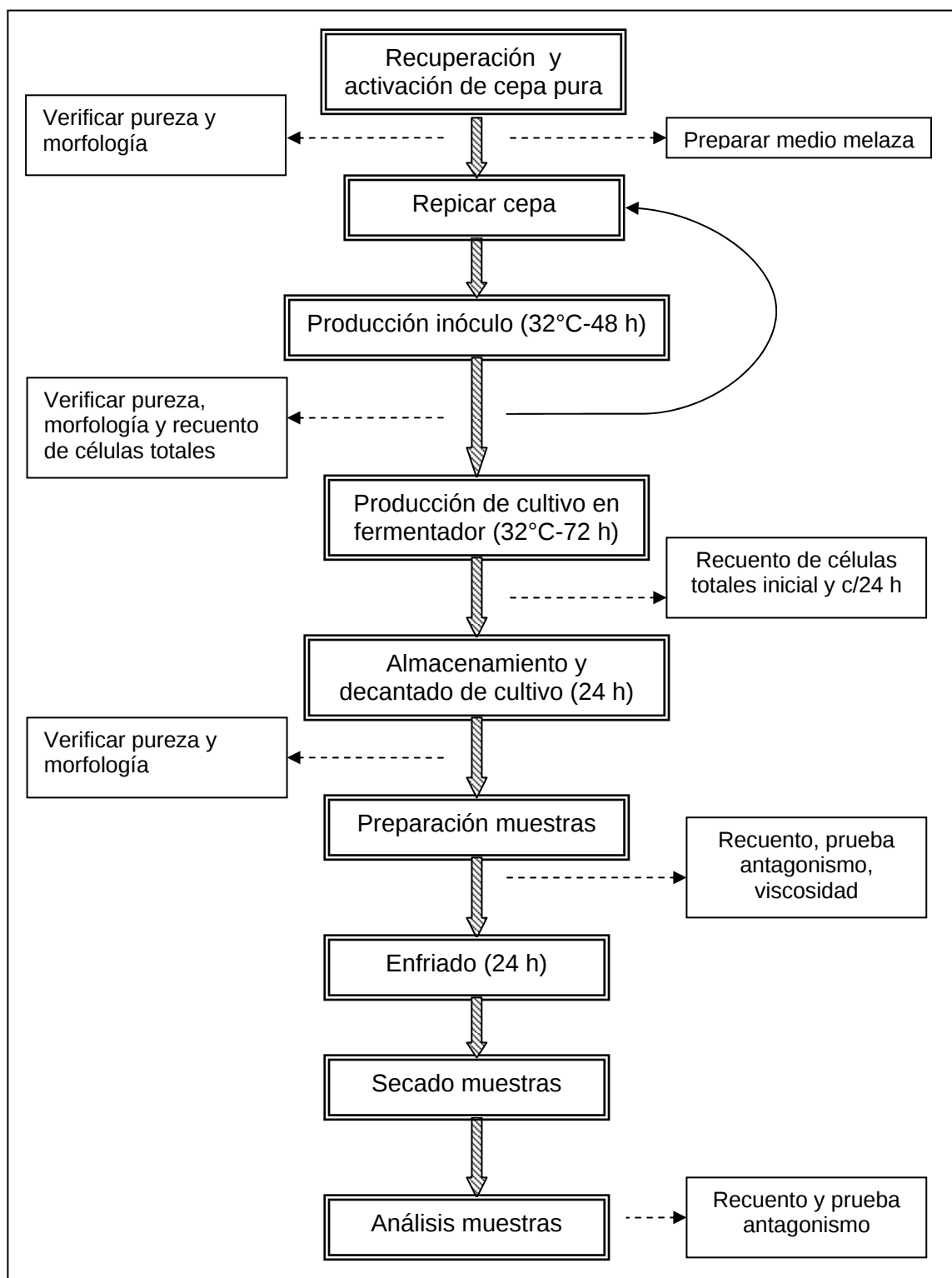


FIGURA 5 Línea de flujo elaboración controlador biológico deshidratado a partir de una cepa de *Bacillus subtilis*

El sistema de calefacción se logró mediante un serpentín interno el cual se conectaba a un circulador de agua termorregulado que mantenía la temperatura del proceso a 32°C. El fermentador no contaba con control de pH, por lo tanto el medio de cultivo melaza, fue preparado con buffer pH 5,5, y agua de la llave para aportar sales. El fermentador con 7,5 L de medio melaza fue esterilizado en autoclave y luego se inoculó con 600 mL de cultivo.

El crecimiento de cultivo fue controlado en base a muestras a tiempo 0, 24, 48 y 72 h determinando cada vez:

- Pureza, mediante tinción de Gram,
- Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (ufc/mL), y
- Densidad óptica (DO_{600nm}).

Una vez terminada la fermentación se usó un recipiente estéril de 15 L, donde se acopiaron los lotes de producción de *Bacillus subtilis*, estos se mantuvieron a temperatura ambiente, estático y sellado, hasta que fueron dosificadas en muestras para deshidratado mediante secado *Spray*.

3.6.4 Formulaciones para secado. El secado *Spray* del *Bacillus subtilis*, fue la etapa más sensible del experimento, debido a las altas temperaturas que implica el proceso. El cultivo celular, que fue seleccionado y preparado, para ser secado, en las etapas anteriores, presentó baja viscosidad y bajo contenido de sólidos, características importantes de un fluido que se desea secar.

Se prepararon tres fórmulas, en base al cultivo de *Bacillus subtilis*, las cuales se diferenciaban entre si, por el tipo y cantidad de agente aglutinante que se le adicionó, lo que aumentará la viscosidad y el contenido sólidos en suspensión. Los agentes aglutinantes que se usaron en las diferentes fórmulas, se muestran en el CUADRO 2.

CUADRO 2 Fórmulas base de biopesticidas en polvo a partir de un cultivo de 10^8 ufc/mL de *Bacillus subtilis*

Fórmula	Agente aglutinante en base de 500 ml de cultivo celular
1	50 g Maltodextrina y 1,5 g Carragenina λ
2	6 g Goma Guar
3	150 g Maltodextrina

El proceso comenzó con el pesaje de las materias primas y posteriormente se adicionaron lentamente a matraces con 500 mL de cultivo, con agitación a temperatura ambiente hasta lograr una solución homogénea. Finalmente se dejó en reposo a temperatura de refrigeración por 24 h para inducir la esporulación del *Bacillus subtilis*, condición favorable al momento de aplicar secado *Spray*.

Las viscosidades de cada formulación fueron medidas a temperatura de 25°C en el viscosímetro Visco Star –R, equipo automático, a diferentes revoluciones por minuto de manera de obtener una curva comparativa de viscosidad de cada mezcla y determinar de esta manera con que tipo de fluido se está trabajando.



FIGURA 6 Fermentador artesanal capacidad 9L, propiedad de levaduras Collico prestado para realizar la fermentación.

3.6.5 Secado *Spray* de *Bacillus subtilis*. Las fórmulas **1**, **2**, **3**, se deshidrataron en una torre de secado *Spray* NIRO Atomizer (FIGURA 7). Los parámetros de proceso utilizados, para cada fórmula se muestran a continuación, donde se indica con x cada prototipo obtenido, los que se recepcionaron directamente en un frasco de vidrio estéril, para evitar contaminación y que absorbiera humedad.

Fórmula	Temperatura Entrada (°C)			Temperatura Salida (°C)		
	160	170	180	85/95	90/100	95/105
1	1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3
2	2.1	2.2	2.3	2.1	2.2	2.3
3	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1



FIGURA 7 Secador *Spray* Niro Atomizer propiedad del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile.

3.6.6 Evaluación de las fórmulas de biopesticidas en polvo logradas. Una vez deshidratadas las fórmulas, a cada una se le realizó un recuento de unidades formadoras de colonia (ufc/mL), y prueba de antagonismo.

Los análisis antes mencionados se realizaron a las 24 h para continuar a los días 7, 14, 21, 28 y 60 días, después de secada cada fórmula.

3.7 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se usó Microsoft Excel aplicando regresión a cada experimento, observando las pendientes, determinando la existencia de diferencias entre las fórmulas, desde el punto de vista de la viabilidad de la célula y de su capacidad antagonista.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

Las características propias de las bacterias del genero *Bacillus* las hace resistentes a diversas condiciones del medio ambiente, lo que sugiere que puedan ser comercializadas como ingredientes de biopesticidas, ya que al ser formadoras de endosporas, pueden permanecer en estado de latencia durante largos períodos de tiempo resistiendo condiciones desfavorables (VENEGAS *et al.*, 2005).

Entre los microorganismos más importantes usados en el control biológico se encuentran las bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium*, *Fusarium* y *Trichodema* (BETTIOL, 1991). El género *Bacillus* incluye una variedad de especies de importancia industrial y es conocido históricamente por su amplio uso en la conservación de alimentos. *B. subtilis*, es un microorganismo considerado no patógeno o toxigénico de los humanos, animales, o plantas, por lo que el potencial riesgo asociado a su uso en instalaciones industriales es bajo. Esto es confirmado por GIACAMAN (2006), quien afirma que *B. subtilis*, es la especie tipo del género *Bacillus* que con mayor frecuencia ha sido informada por su capacidad de producir sustancias antibióticas contra patógenos vegetales.

Por otra parte, se tiene conocimiento que la cepa *B. subtilis* BC-10, presenta actividad antagonista contra *E. carotovora*, estudios preliminares lo confirman (GIACAMAN, 2006).

4.1 Ensayos preliminares

Son numerosos los estudios que demuestran la efectividad de *B. subtilis* para ejercer antagonismo contra hongos y bacterias patógenas, mediante la producción de sustancias bactericidas o bacteriostáticas. La posible aplicación de esta cepa a cultivos de carácter comercial y su capacidad de formar esporas rápidamente al someter la célula a un cambio de temperatura, llevó a la idea de estudiar una forma de producirla masiva y económicamente, por lo cual se pensó en someter esta cepa a secado *Spray*, para obtener un producto deshidratado, que sea fácil de transportar, comercializar y usar, estableciéndose que para este ultimo punto el producto resultante, debiera contener células viables, con actividad antagonista y ser estable en el tiempo. Por lo tanto, para la realización de este trabajo fue fundamental realizar ensayos preliminares, que consistieron en producción de una pequeña porción de cultivo concentrado en polvo para de verificar la premisa de que la cepa resistía el tratamiento.

El producto obtenido en el prueba preliminar presentó una apariencia granular similar a la leche en polvo, aroma dulce producto de la melaza, y color café lechoso, el rendimiento no fue determinado dado el pequeño volumen de trabajo. El recuento de células viables practicado reveló un promedio de 10^9 ufc/mL, no obstante lo dificultoso que resultó estimarlos, dada la esporulación de la cepa.

Asimismo, tanto muestras de polvo, tal cual, como suspensión líquida reconstituida presentaron evidente antagonismo frente a *Erwinia carotovora*, la primera, sin

embargo, presentó una excesiva demora ya que al encontrarse deshidratada tardó mas tiempo en salir de su estado esporulado, por lo tanto para efectos posteriores la prueba de antagonismo se realizará luego de una hidratación previa de las células por un periodo no mayor a las 12 horas.

Según los resultados obtenidos de los ensayos preliminarmente, se pudo concluir, que sí es posible producir, a partir de un concentrado celular de *Bacillus subtilis*, un biopesticida en polvo con actividad biológica antagonista frente a *Erwinia carotovora*.

4.2 Ensayos definitivos

Es importante señalar que previo a esta etapa se produjo un siniestro de consideración en dependencias del ICYTAL, donde se perdieron todos los equipos automáticos (fermentador de 14 L New Brunswick, centrífuga continua y equipo concentrador de microfiltración Sprintrex) donde se tenía programado realizar las fermentaciones.

Lo anterior desencadenó una serie de contratiempos por lo que se debió optar por usar equipos artesanales antiguos reacondicionados para desarrollar este trabajo.

4.2.1 Producción de *Bacillus subtilis* en fermentador.

La producción del cultivo de *B. subtilis* se realizó en un fermentador artesanal, que cuenta sólo con control de temperatura y aireación, este es un sistema muy rudimentario, considerando que existe tecnología con la cual es posible producir un cultivo puro con control de temperatura, aireación, pH, toma muestras en línea, etc.

Al realizar la fermentación es importante analizar las muestras al microscopio para controlar la pureza del cultivo, además de la concentración, durante la fermentación, fue posible apreciar que se trataba de bacilos Gram positivos y en algunos casos con esporas en su interior.

4.2.1.1 Recuento. Resulta particularmente complejo efectuar recuentos de células viables de *B. subtilis*, ello debido a la facilidad para formar endosporas, lo cual entrega resultados poco exactos. Es así como, no obstante las muestras obtenidas son analizadas inmediatamente realizando las diluciones correspondientes, durante este procedimiento es probable que la célula forme esporas, por lo tanto al momento del recuento en placa se observaban colonias en diferentes estados de crecimiento, producto de esto el recuento se realizó a las 24 horas de incubación a 32°C. Los resultados obtenidos, (CUADRO 3) a pesar de la dificultad propia del género *Bacillus*, fueron similares para el original y su duplicado (duplicado en placa). Las colonias que se desarrollaron se apreciaban de una forma y tamaño irregular, de borde estrellado y textura seca y opaca. Ambas observaciones confirman la pureza del cultivo y coinciden con lo indicado por GIACAMAN (2006).

Sin embargo existen antecedentes previos, que indican que los recuentos celulares a cepas de *Bacillus*, no se pudieron llevar a cabo debido a sucesivos incrementos y reducciones, dando resultados poco lógicos y no repetitivos, bajo las mismas condiciones medioambientales algunas bacterias pueden reactivarse rápidamente, formando grandes colonias mientras que otras retardan su activación observándose colonias muy pequeñas.

CUADRO 3. Recuento promedio de unidades formadoras de colonias a muestras tomadas cada 24 h durante la fermentación de *Bacillus subtilis*.

Muestra	Recuento de células totales (ufc/mL)*
Inóculo	7,00E+09
0 horas	5,50E+07
24 horas	1,68E+09
48 horas	3,64E+09
72 horas **	2,00E+10

(*) Corresponde al promedio de tres lotes de producción.

(**) Este recuento corresponde al tiempo 0, o recuento previo al secado.

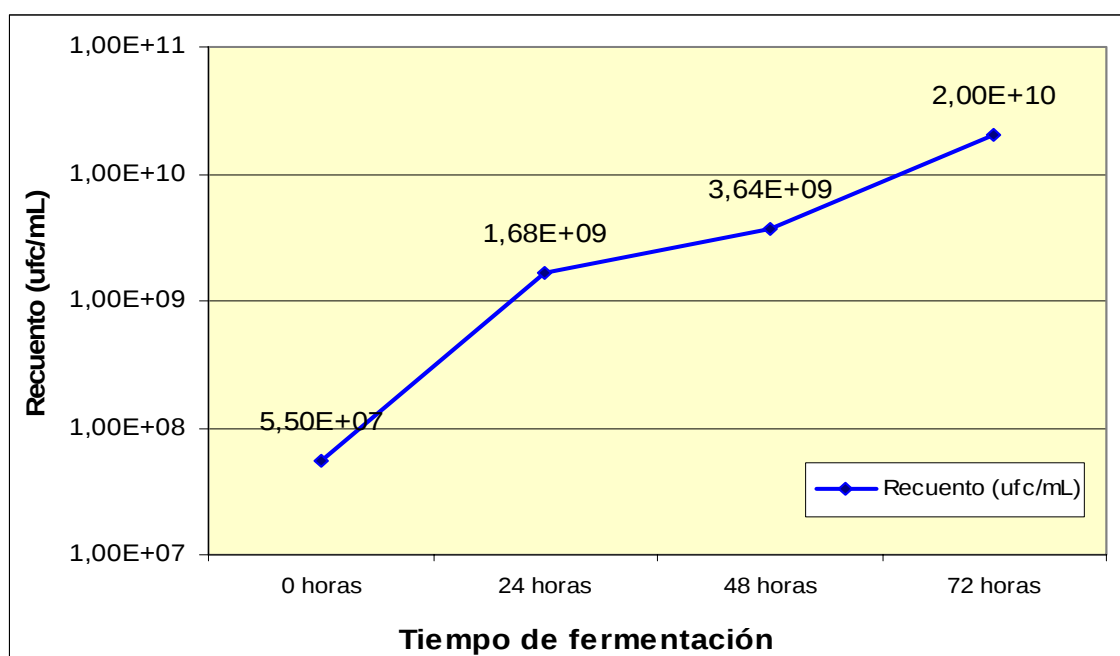


FIGURA 8 Recuento promedio de células totales del cultivo de *Bacillus subtilis* cada 24 horas durante la fermentación.

En el sistema de fermentación utilizado el cultivo presenta un crecimiento lento con niveles de biomasa bajos, obteniéndose un recuento de 2×10^{10} ufc/mL a las 72 h de proceso (FIGURA 8), estudios realizados por GIACAMAN (2006) demuestran que esta cepa es capaz de alcanzar concentraciones más altas en periodos de tiempo considerablemente menores.

Es así como, GIACAMAN (2006), realizó estudios de cinética de crecimiento de la cepa BC10 en medio melaza los cuales mostraron una corta fase exponencial con un rápido crecimiento de cuatro a seis horas, alcanzando la fase estacionaria al cabo de las seis a siete horas aproximadamente, proceso de fermentación realizada en un equipo automático.

Cabe destacar, que la concentración alcanzada en la fermentación es muy importante para la producción del biopesticida, ya que a mayor concentración al final de proceso de fermentación (inicial de secado), se puede obtener mayor concentración en el producto deshidratado. Siendo entonces posible alcanzar biomásas más altas concentrando el cultivo antes de utilizarlo.

4.2.1.2 Densidad óptica. Las muestras fueron tomadas en conjunto con las de recuento de unidades formadoras de colonias, reservándose bajo condiciones de refrigeración por el periodo de espera antes de ser analizadas. Al momento de realizar la medición de densidad óptica, éstas eran homogenizadas y diluidas tres veces para obtener valores confiables. En lo reportado por GIACAMAN (2006) la cepa fue diluida hasta 6 veces.

Existen estudios previos de esta célula en los cuales se realizaron curvas de crecimiento que relacionan los recuentos (ufc/mL), con densidad óptica, indicando claramente los periodos de crecimiento, fase estacionaria y latencia, no obstante no fue posible guiarse por esas curvas, ya que el proceso de fermentación usado presenta condiciones muy distintas, observándose un lento crecimiento de la cepa.

En el CUADRO 4 y FIGURA 9 se presentan datos y gráfico que indican la tendencia, magnitud y tiempo de crecimiento de la cepa durante la fermentación.

CUADRO 4. Densidad óptica (DO_{600nm}) a muestras tomadas cada 24 h durante la fermentación de *Bacillus subtilis*.

Muestra	Densidad óptica 600nm
Inóculo	2,3760
Tiempo 0	0,6805
24 horas	0,9105
48 horas	1,0665
72 horas	1,7175

Se puede observar a partir de los datos entregados en el CUADRO 4, que el proceso de fermentación presentó deficiencias, ya que las absorbancias obtenidas son bajas y el tiempo de fermentación muy extenso, esto es producto de condiciones deficientes, sin control automático de pH, y aireación sin agitación.

Los resultados obtenidos bajo este procedimiento, no son exactos (no se realizó repetición) lo que podría justificar los bajos resultados y la diferencia con respecto análisis de investigaciones previas de GIACAMAN, 2006. Sin embargo, cabe destacar que los equipos utilizados para los procesos de fermentación en matraz agitado en Shaker y de fermentación por "batch" de 7,5 litros no son los mismos, mostrando la mayor diferencia en el fermentador, respecto de lo también efectuado por GIACAMAN, 2006.

Es posible apreciar que el inóculo presenta mayor densidad óptica que el producto obtenido del fermentador, de lo cual se podría deducir que es mejor durante este experimento realizar cultivos en matraz y no en fermentador, pero, la capacidad de producción es fundamental al momento de disminuir tiempos totales de proceso

(fermentación-secado), por lo que es necesario realizar los cultivos en fermentador. Además es importante considerar que el equipo utilizado era de emergencia y, por lo tanto, presentaba deficiencias para controlar los parámetros óptimos de proceso.

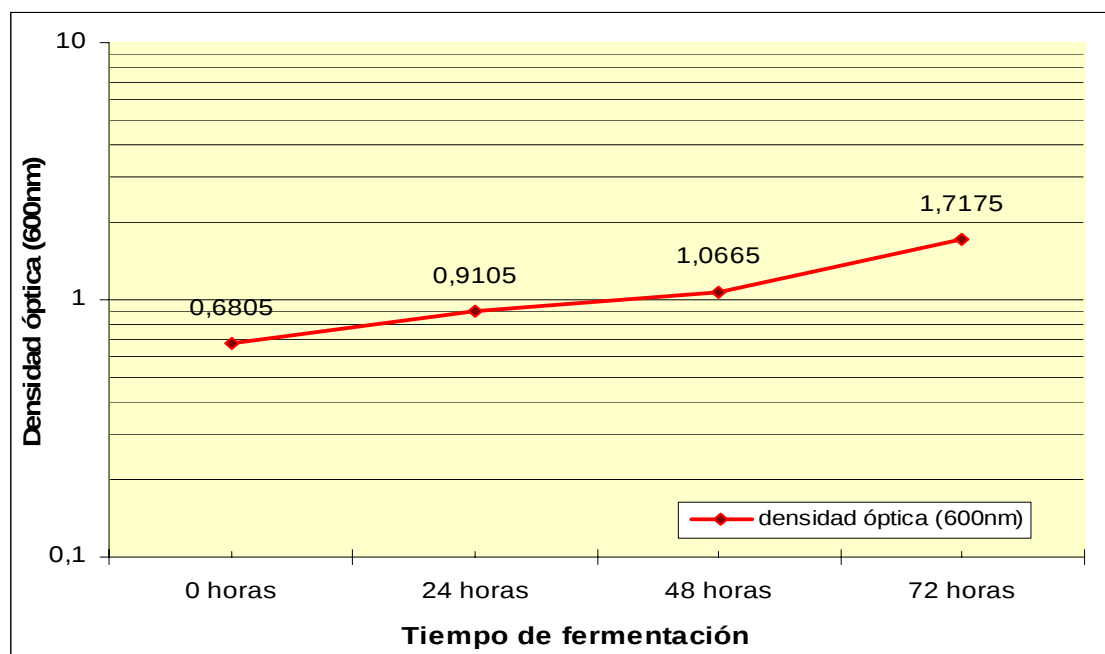


FIGURA 9 Curva densidad óptica del cultivo de *B. subtilis* en fermentador cada 24 horas (Do_{600nm}).

GIACAMAN (2006), llevó a cabo la producción de la cepa de *B. subtilis* en las modalidades de cultivo en matraz agitado, batch de 1 L, batch de 14 L y cultivo continuo de 1 L. La densidad óptica obtenida del cultivo en batch de 14 L fue tres veces mayor a la del cultivo “batch” de litro y 4 veces mayor a la obtenida en matraces agitados, esto estaría relacionado al hecho de que en los fermentadores de laboratorio se está regulando el pH, la temperatura, el flujo de oxígeno y la agitación en forma automática, en cambio el cultivo en matraces carece de tal control. Por otro lado, el equipo en que se realizaron los cultivos en batch de 14 L permite una mejor aireación y agitación que un sistema batch de L.

El seguimiento del cultivo mediante análisis de densidad óptica, resultó ser fundamental para observar el crecimiento de esta cepa, sin embargo, no fue contrastado ni calibrado con otros procedimientos.

Por otra parte, se puso énfasis en la realización de recuentos de células viables a través de la determinación de unidades formadoras de colonias (ufc/mL) intentando perfeccionarlo hasta obtener resultados representativos y repetitivos, ya que durante el proceso de elaboración del biopesticida la célula se somete a deshidratación, siendo por lo tanto la única opción para determinar viabilidad celular en el tiempo.

A pesar de que el proceso de fermentación es un factor primordial para obtener un producto de alta viabilidad, ya que la concentración final del producto deshidratado es

directamente proporcional a la concentración del cultivo a secar, debido a los inconvenientes del equipo artesanal, el ensayo se dirigió a estudiar el porcentaje de viabilidad residual, para de esta manera, extrapolar los resultados a procedimientos similares en los que se cuente con concentraciones superiores.

4.2.2 Secado.

Una vez realizadas las pruebas preliminares, con las cuales se concluye que es posible deshidratar células de *B. subtilis*, se continua con la investigación, seleccionando agentes encapsulantes y temperaturas de proceso de secado spray.

4.2.2.1 Selección del agente encapsulante “carrier”. Las sustancias que se usaron a modo de “carrier” fueron maltodextrina, carragenina λ y goma Guar, para lo cual se tomaron en consideración sus propiedades funcionales, costo y referencias de estudios previos donde fueron utilizados.

A continuación se esquematiza la concentración de “carrier” que conforman cada una de las formulas a modo de referir posteriormente a las fórmulas 1, 2 o 3.

Concentración de cada Formulación		
F1	F2	F3
10% p/v Maltodextrina + 0,3% p/v Carragenina λ	1,2% p/v Goma Guar	30% p/v Maltodextrina

Previo al proceso de encapsulación mediante secado *Spray*, se realizaron diferentes pruebas donde se varió el porcentaje de “carrier” de modo de formar una solución de viscosidad adecuada para el proceso de secado *Spray*, realizando inspecciones visuales y mediante el equipo Visco Star-R

CUADRO 5. Viscosidades (Pa s) de cada formulación a diferentes revoluciones por minuto medidas en el equipo automático Visco Star-R.

	Viscosidad de cada formulación (g/cm*s)		
Revoluciones por minuto	F1	F2	F3
5	0,092	0	0
6	0,098	0	0
10	0,089	0	0
12	0,086	0	0
20	0,0795	0	0,021
30	0,0715	0	0,019
50	0,0675	0,0175	0,0235
60	0,0655	0,0185	0,0245
100	0,0645	0,021	0,0305

Es posible observar (FIGURA 10) que las viscosidades de cada muestra resultaron diferentes, destacando por su diferencia la muestra “**F1**” que contiene 10% de maltodextrina y 0,3% de carragenina λ , esta formulación presenta mayor viscosidad por

su contenido de carragenina λ , polisacárido que se caracteriza por tener alta capacidad viscosante, por sobre las otras dos formulaciones que se diferencian por el tipo y contenido de sólidos. Cabe destacar que la muestra “F3” presenta un contenido de sólidos adecuado para proteger a las células durante el secado.

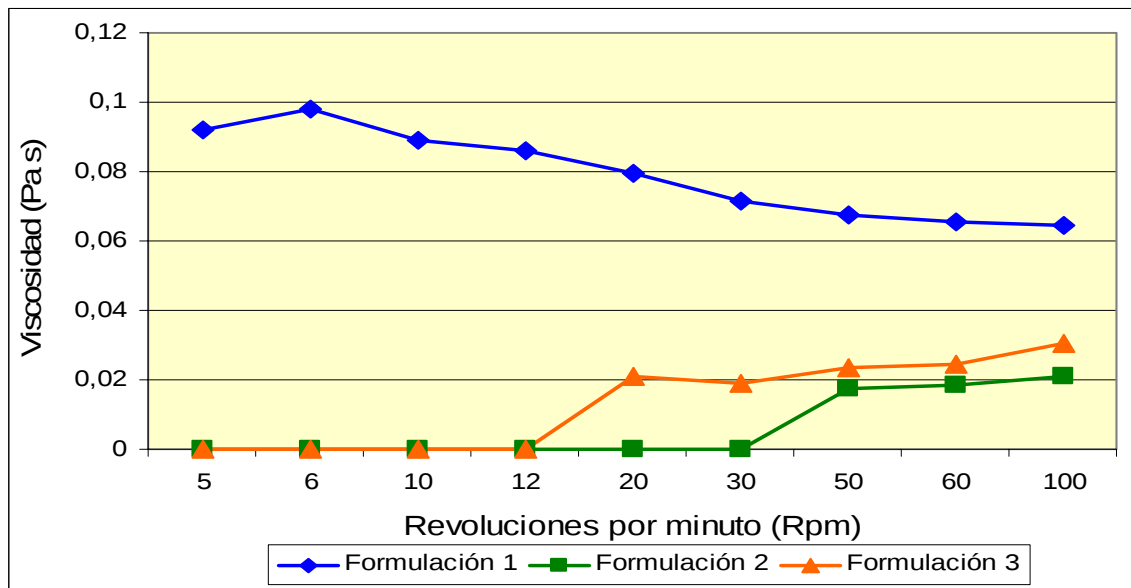


FIGURA 10 Comparación de viscosidad de distintas formulaciones, medida a diferentes revoluciones por minuto.

La característica de cada una de estas mezclas a destacar al momento de observar la grafica la viscosidad versus revoluciones por minuto es que las mezclas difieren en el tipo de fluido que representan. La mezcla “F1” constituye un fluido característico pseudoplástico que al aumentar la velocidad de deformación (revoluciones por minuto) disminuye su viscosidad y el esfuerzo cortante. Las mezclas “F2” y “F3” representan un fluido típico dilatante el cuál aumenta su viscosidad y esfuerzo cortante al aumentar la velocidad de deformación, estas dos últimas mezclas, sin embargo difieren en grado de viscosidad, esto se debe a las características particulares de cada “carrier”.

La torre de secado cuenta con un aspersor rotatorio que gira por sobre las 1000rpm lo que determina que la viscosidad de entrada a la cámara de secado para el caso del fluido pseudoplástico disminuye y para los fluidos dilatantes la viscosidad aumenta. También se puede apreciar de la gráfica anterior, una tendencia a estabilizar la viscosidad de los fluidos “F1” y “F2” no así el fluido “F3” que aun se muestra aumento a las 100rpm.

ESCALONA (2004), utilizó 10% de maltodextrina y 2% de aislado proteico de soja (APS) como agentes encapsulantes de colorantes alimentarios, mayores porcentajes de APS elevaron la viscosidad dificultando el secado *Spray*.

WAGNER y WARTHESEN (1995), estudiaron el efecto de dextrosa equivalente, (DE) de almidones y la influencia del porcentaje de agente encapsulante, para α y β carotenos de zanahoria, en la efectividad de encapsulación. Encontraron que

almidones hidrolizados de alto DE retienen mejor los productos a encapsular. Además demostraron que cuanto mayor es la proporción de agente encapsulante utilizado en la mezcla, menos es la velocidad de degradación ya que cuando hay más agente encapsulante el contenido de carotenos superficiales es menor; la velocidad de degradación disminuye en un 75 % cuando se utilizó 25% de almidón hidrolizado 15 DE. Maltodextrinas de bajo DE dan baja estabilidad porque contienen grandes cantidades de azúcares de cadena larga que causan que la barrera sea inflexible y más permeable al oxígeno.

Del párrafo antes citado, se puede deducir que al utilizar alto porcentaje de maltodextrina como agente encapsulante (**F3**), existe una mayor proporción de células que quedan atrapadas por el agente y no expuestas la superficie, lo que contribuye a una mejor viabilidad del producto después de ser sometido a secado *Spray*, y al mismo tiempo una mejor estabilidad en el tiempo, ya que las células se van liberando paulatinamente.

Aunque las proteínas son un agente ampliamente utilizado en formulados deshidratados, para este caso se prefirió trabajar con polisacáridos, y almidones, buscando el efecto de éstos en la conformación del polvo, es decir contenido de sólidos y viscosidad del fluido previo secado *Spray*, sin considerar las capacidades de fuente de energía que éstos puedan tener al reconstituir el producto antes de su aplicación. Cabe destacar que la Maltodextrina es ampliamente utilizada en formulaciones en polvo, ya que presenta excelentes cualidades al momento de hidratar.

4.2.2.2 Temperatura durante el proceso. Para un correcto secado *Spray* la preparación de la materia prima se debe realizar bajo condiciones higiénicas, de modo de no contaminar los cultivos; el concentrado celular fue dosificado a matraces estériles en raciones de 500 mL de cultivo puro por mezcla a deshidratar, luego se les adicionó el o los *carrier* correspondiente(s), una vez homogenizado el formulado, se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura de refrigeración para promover la esporulación de las células.

En esta etapa se cuenta con tres distintas mezclas, cada una de ella fue sometida a tres temperaturas de entrada diferentes durante el proceso de secado *Spray*, de esta manera se obtuvieron 9 formulados deshidratados distintos rotulados con numeración por ejemplo "1.1", donde el primer numero indica la mezcla y el segundo numero indica la temperatura de secado utilizada, cada proceso de deshidratación fue repetido tres veces. La elección de las temperaturas de proceso fue en base al ensayo preliminar y la bibliografía existente para procesos similares.

Las temperaturas de proceso utilizados por ESCALONA (2004), fueron:

- T° entrada = $117 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y T° salida = $75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ para la solución con maltodextrina, y
- T° entrada = $95 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y T° salida = $65 \pm 5^{\circ}\text{C}$ para la solución con APS.

El flujo de aire 600 l/h, velocidad de alimentación 5ml/min, presión de atomización fue 20 psi.

Las temperaturas antes citadas, ESCALONA (2004), son bajas debido a las características de la sustancia a deshidratar y lo sensible que esta puede ser a la temperatura. En la presente investigación se tiene en conocimiento, por los ensayos preliminares, que *B. subtilis*, cepa BC-10 es resistente a temperaturas altas de proceso.

CORCORAN *et al.* (2004), utilizaron una temperatura de entrada 170 °C y salida entre 85-90 °C para el estudio de la supervivencia de un lactóvacilo probiótico en presencia de sustancias prebióticas, formulo un producto en a base de una combinación de probióticos en un esfuerzo por generar productos combinados polvo.

HASSAN (2003), Realizó un estudio de influencia de material de encapsulación y viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* posterior a un proceso de sacado *Spray*, bajo los siguientes parámetros de proceso: temperatura de entrada del aire de secado 170 °C y temperatura de salida 55 °C. Parámetros similares encontramos en otros autores como ZAMORA, (2005) que utilizó dos temperaturas de entrada de 170 y 160 °C, con diferentes temperaturas de salida, entre 90-99 °C y 80-85 °C para la primera y 80-85°C para la segunda. Por su parte YOUNG *et al*, (1993) utilizaron temperaturas de 160°C de entrada y 80 °C de salida.

La torre de secado *Spray* NIRO Atomizer, cuenta con un sistema de control de la temperatura por medio de resistencias que calientan el aire de entrada a la cámara de secado, por lo tanto la temperatura de entrada (160°C, 170°C y 180°C) fue regulada y se mantuvo constante durante el proceso de deshidratación. La temperatura de salida del producto deshidratado, fue variable, ya que está se controla mediante el flujo de alimentación a la cámara de secado.

El equipo de secado utilizado en este estudio, no cuenta con un sistema de alimentación que genere un flujo constante y cuantificable, por lo tanto la alimentación se realizó por gravedad (lo que varió levemente la velocidad de alimentación), y fue regulada sólo por medio de una llave mariposa manual de poca precisión.

En las siguientes figuras (FIGURAS 11, 12 y 13) se representan, las temperaturas de salida cada 3 minutos durante los procesos de secado, a una temperatura de entrada constante e igual para las diferentes mezclas. Las tablas de datos se encuentran en el ANEXO 2 donde se incluye un detalle de la temperatura de entrada y salida de cada proceso de secado.

La temperatura de entrada para estas tres mezclas se mantuvo constante a 160°C, y se puede observar como a una temperatura de entrada similar la temperatura de salida varia según la característica particular de cada mezcla. Es así como se puede destacar que la **F2** que presenta una viscosidad más baja y menor contenido de sólidos, presentó la temperatura de salida más elevada, demostrando que la temperatura de salida se ve afectada por el flujo de alimentación y éste a su vez por la viscosidad y el contenido de sólidos.

En conclusión a mayor viscosidad y contenido de sólidos, menor temperatura de salida, lo cual es ideal para que el producto no se altere.

En las FIGURAS 12 y 13, se puede observar como el efecto de la temperatura afecta las características reológicas de los formulados, que al aumentar la temperatura

disminuye la viscosidad de un fluido pseudoplástico, lo que implica que el flujo de alimentación se altera, la temperatura de salida aumenta.

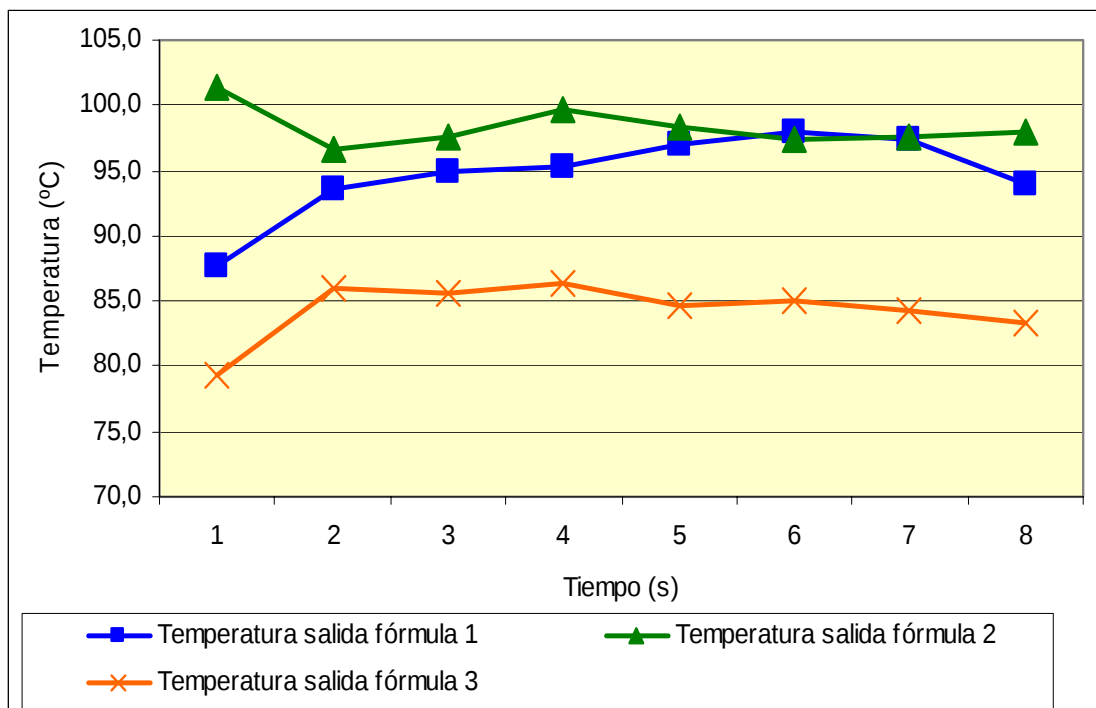


FIGURA 11 Temperatura de salida promedio de las tres repeticiones, de cada mezcla a la temperatura de entrada de 160°C.

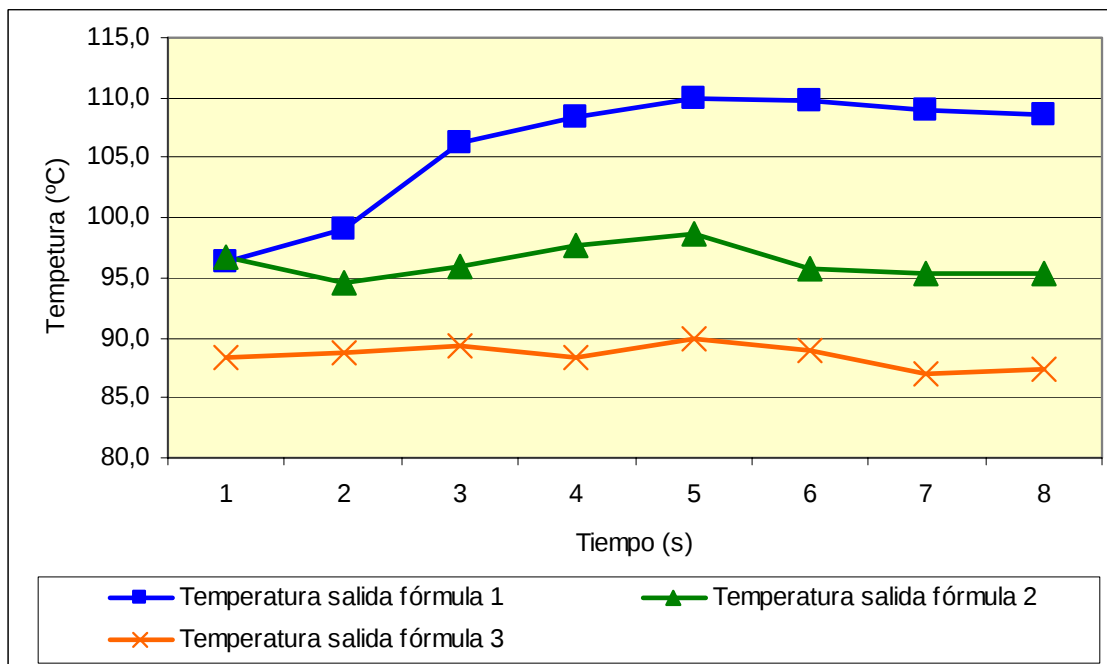


FIGURA 12 Temperatura de salida promedio de las tres repeticiones, de cada mezcla a la temperatura de entrada de 170°C.

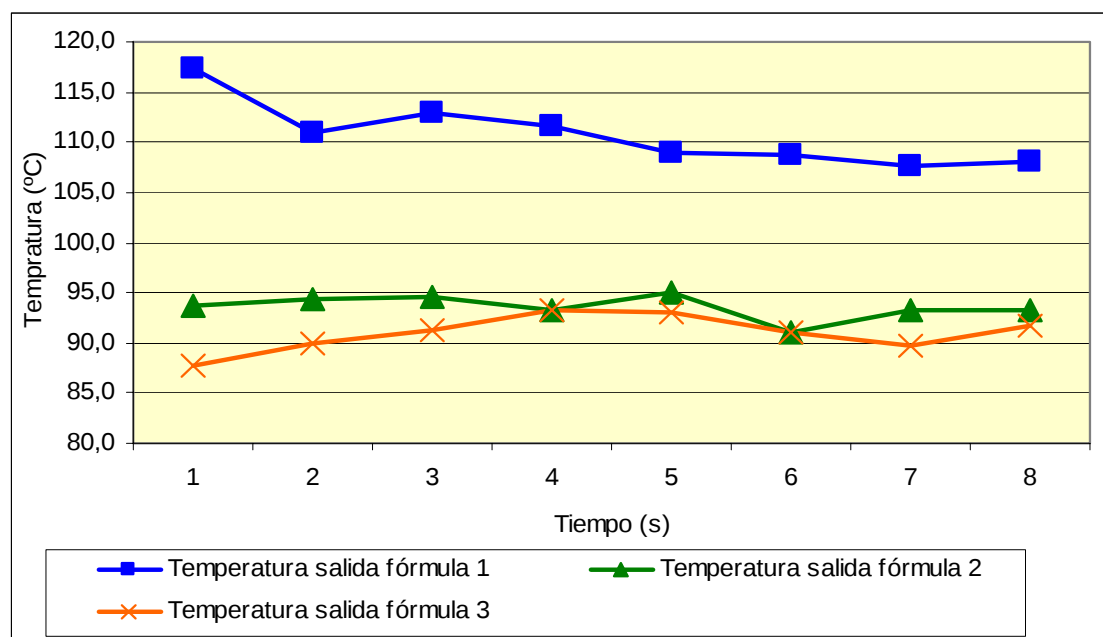


FIGURA 13 Temperatura de salida promedio de las tres repeticiones, de cada mezcla a la temperatura de entrada de 180°C.

4.2.3 Viabilidad y capacidad antagonista remanente de los productos deshidratados. Cada prototipo de mezcla deshidratada fue almacenado en frascos de vidrio estériles de capacidad medio litro y mantenidas a temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$) durante 60 días. Se extrajeron muestras los días 1, 7, 14, 21, 28 y 60 para realizar los respectivos recuentos, verificando el porcentaje de viabilidad remanente y pruebas de antagonismo, verificando persistencia de la capacidad antagonista.

4.2.3.1 Viabilidad remanente de cada producto deshidratado durante 8 semanas. Es evidente que después de un proceso de deshidratación por calor la viabilidad disminuye drásticamente en la mayoría de los casos; la FIGURA 14 muestra la viabilidad del *B. subtilis* después del proceso de secado Spray, mostrando las diferentes muestras obtenidas, según “carriers” y temperatura de proceso.

Es posible apreciar que todas las mezclas disminuyen su viabilidad en uno o dos ciclos logarítmicos, producto del proceso de secado *Spray* al que fueron sometidas, si bien los valores que se observan son relativamente altos estos pueden ser aun mayores si el proceso de fermentación se realizara en un equipo automatizado y que cuente con las condiciones adecuadas para un crecimiento rápido y mayor del *B. subtilis* lo que entregaría mejores resultados post-secado.

Existen estudios que demuestran que es posible mantener la viabilidad después del proceso de deshidratación por atomización. ZAMORA (2005), demostró que la viabilidad se mantenía cuando neutralizaba el pH de sus muestras, confirmando una relación entre neutralidad y supervivencia de las cepas, factor que no fue considerado

en este estudio ya que se mantuvo el pH del medio en el que crece el *B. subtilis* (pH 5,5 valor de pH de los suelos del sur de Chile).

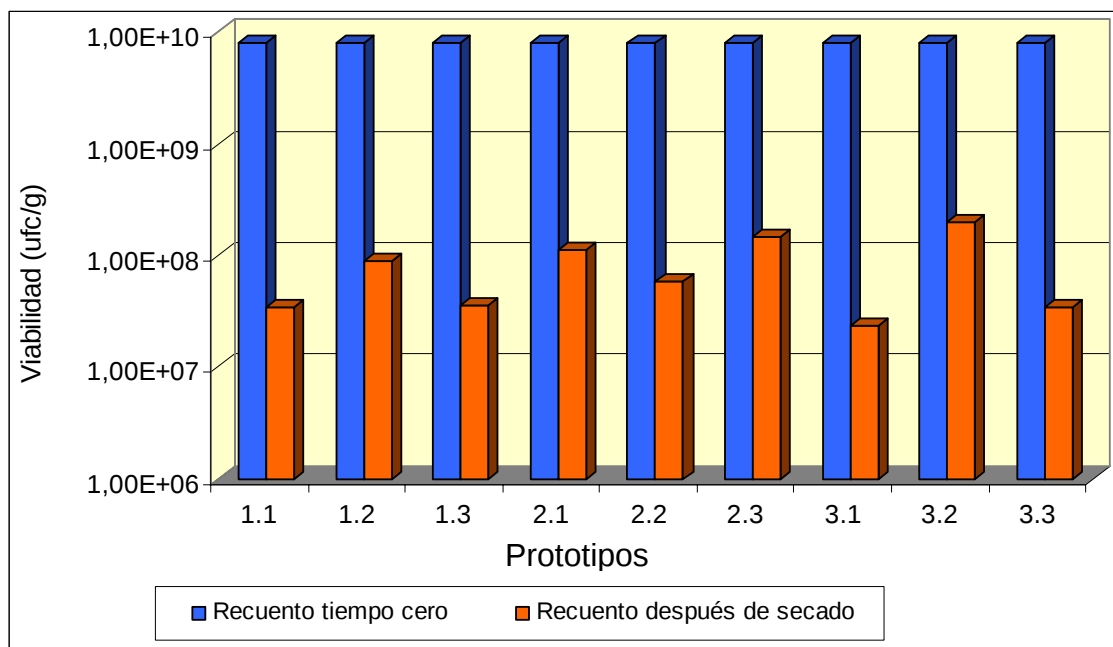


FIGURA 14. Viabilidad del *Bacillus subtilis* antes y después del proceso de secado Spray.

Para obtener la viabilidad remanente de cada una de las mezclas es necesario realizar recuento de unidades formadoras de colonia. Los resultados obtenidos se grafican en la FIGURA 15, la cual muestra los recuentos de unidades formadoras de colonia promedio realizado a intervalos de 7 días a partir del primer día posterior al secado, es posible apreciar la tendencia que tiene cada mezcla a través del tiempo de almacenamiento, evidenciando una tendencia común a disminuir la viabilidad, los datos de origen se encuentran en el ANEXO 3.

Es posible apreciar una marcada disminución a partir de la tercera semana de almacenamiento a temperatura ambiente. ZAMORA (2005), obtuvo resultados similares en un estudio realizado con BAL mantenidas a diferentes temperaturas de almacenamiento, demostrando que para el caso de las BAL a temperaturas más bajas la viabilidad es superior.

Los prototipos **3.2** (30% Maltodextrina, Te=170°C), **1.3** (10% Maltodextrina y 0,3% Carragenina λ , Te=180) y **2.3** (1,2% Goma Guar, Te=180°C) presentaron menor estabilidad durante el tiempo de almacenamiento, siendo cada una representante de una mezcla encapsulante, coincidiendo únicamente dos de ellas en la temperatura de entrada, esta coincidencia se puede deber al bajo contenido de sólidos de las dos mezclas la cual sometida a altas temperaturas no es capaz de proteger las células, por otra parte, al poseer menos agente encapsulante, una mayor proporción de células queda adherida en la superficie y no dentro de la micro-cápsula, contribuyendo también a la disminución de la supervivencia de las células de *B. subtilis*.

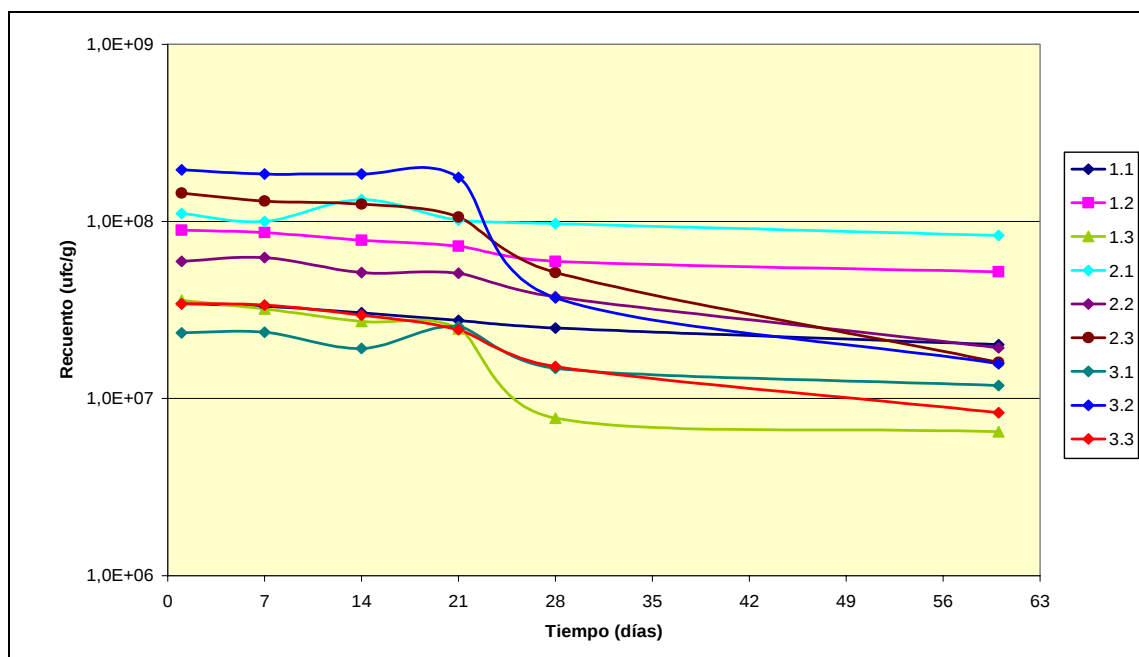


FIGURA 15 Efecto del secado *Spray* a tres diferentes temperaturas de proceso de las tres fórmulas durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Si bien a simple vista es posible observar el mejor resultado, es necesario realizar un análisis de regresión, ya que existe una correlación exponencial negativa entre la viabilidad de la cepa y el tiempo de almacenamiento. Según la siguiente ecuación:

$$y = a \cdot e^{bX} \quad (1)$$

Donde: a = intercepto
 b = pendiente

Del análisis antes mencionado se obtuvieron las siguientes pendientes.

CUADRO 6 Pendientes e interceptos de la viabilidad de cada una de las muestras, de correlación exponencial.

Muestras	Pendiente	Ln a
1.1	-0,0093	3,000E+07
1.2	-0,0097	9,000E+07
1.3	-0,0319	4,000E+07
2.1	-0,0052	1,000E+07
2.2	-0,0204	7,000E+07
2.3	-0,0395	1,000E+08
3.1	-0,0125	2,000E+07
3.2	-0,0475	2,000E+08
3.3	-0,0259	4,000E+07

Es posible observar que el prototipo **2.1** (1,2% Goma Guar, $T_e=160^{\circ}\text{C}$) presenta una menor pendiente por lo tanto su viabilidad se mantiene estable, lo que indica que el producto no ve alteradas sus características de viabilidad durante el tiempo de almacenamiento. En contraste con lo antes mencionado se puede observar que los prototipos **3.2** (30% Maltodextrina, $T_e=170^{\circ}\text{C}$), **1.3** (10% Maltodextrina y 0,3% Carragenina λ , $T_e=180^{\circ}\text{C}$) y **2.3** (1,2% Goma Guar, $T_e=180^{\circ}\text{C}$) presentaron la mayor pendiente, corroborando lo antes dicho al observar la gráfica representada en la FIGURA 15.

Estudios previos muestran que carotenos de zanahoria encapsulados con maltodextrina por secado *Spray* siguen una cinética de degradación de pseudo-primer orden (WAGNER y WARTHESEN, 1995).

Otro alcance que se puede realizar a partir de los recuentos de unidades formadoras de colonia es el porcentaje de viabilidad remanente, considerando como 100% al primer recuento obtenido después del secado *Spray*.

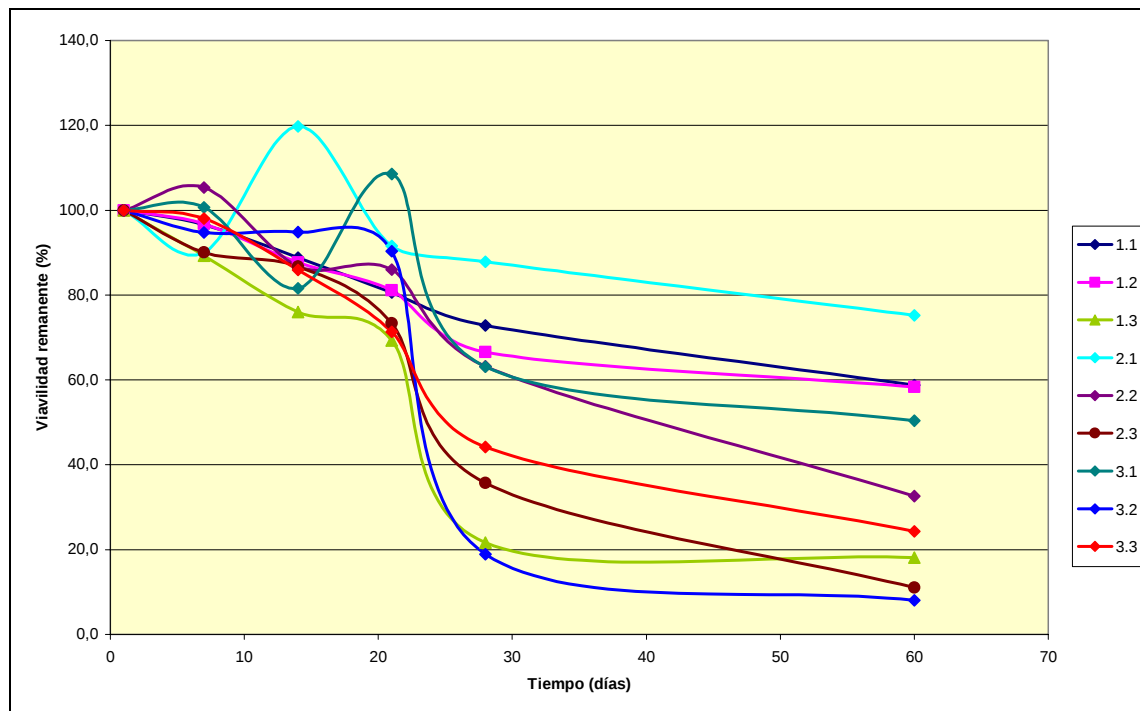


FIGURA 16 Viabilidad remanente de cada prototipo, respecto del primer día después de secado y durante el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente.

Los resultados que se observan son similares a los demostrados por el análisis de regresión exponencial. Manteniéndose el *ranking* de muestras con mejor y peor viabilidad tal como se observa a los 60 días de cada muestra de la FIGURA 16.

No es posible observar relación directa entre el tipo de agente encapsulante y la temperatura de proceso aplicada, en el ANEXO 4 se presenta una serie de gráficos que relacionan las diferentes mezclas a una misma temperatura de proceso.

Si se considera como conclusión solamente las 24 horas después del secado por atomización el mejor prototipo sería el **3.2**, sin embargo, es más importante considerar la estabilidad del producto a través del tiempo de manera que el consumidor tenga un producto de calidad estable al momento de comprar y de aplicarlo en un cultivo.

En la atomización la pérdida de viabilidad celular puede suceder a causa de la deshidratación e inactivación térmica debido a las temperaturas que alcanzan las células durante el proceso (ZAMORA, 2005).

4.2.3.2 Persistencia de la capacidad antagonista de cada producto deshidratado durante 60 días. Al momento de elaborar un biocontrolador, es muy importante considerar qué factor es más importante al momento de evaluar el producto. Para este estudio los factores más relevantes a evaluar después de someter al *B. subtilis* al proceso de deshidratación por medio del secado *Spray*, fueron la mantención de la viabilidad y la conservación de la capacidad antagonista, de estos dos últimos el factor más relevante al momento de concluir qué muestra es mejor o peor, es la conservación de la capacidad antagonista.

La capacidad antagonista se puede ver afectada por los procesos térmicos a los que se somete las células, es así como, ZAMORA (2005) afirma que existen estudios que demuestran que la capacidad antagonista de un cultivo se pierde después de someterlo a un proceso de deshidratación por secado *Spray*, sin embargo, estudios realizados por este mismo autor, demuestran que después secar por atomización una cepa de BAL, conservaron su capacidad antagonista.

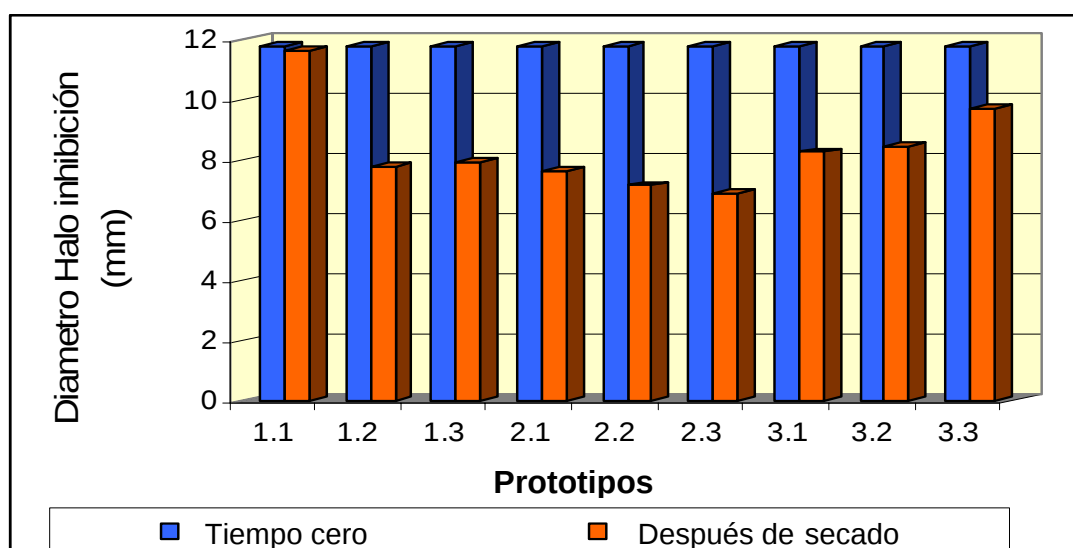


FIGURA 17 Diámetro del halo de inhibición a tiempo cero y 7 días después del proceso de secado *Spray*.

Antes de hacer una evaluación de la FIGURA 17, es necesario destacar que los valores de halos de inhibición que se observan después del proceso de secado corresponden al día 7, por problemas técnicos no fue posible contar con los halos de inhibición del día 1.

Como se observa en la FIGURA 17 la capacidad antagonista no se vio afectada por proceso de secado *Spray*, sin embargo, se observa una leve disminución y se destacan por conservar en mayor grado la actividad antagonista los prototipos **1.1** (11% aprox. de agente encapsulante) y el **3.3** (30% de agente encapsulante), mostrando que no existe relación entre la temperatura de proceso y la actividad antagonista, pero que si existe relación entre el contenido de sólidos y la capacidad antagonista.

La capacidad antagonista después del proceso de deshidratación persiste. Sin embargo, CAVAGLIERI *et al.* (2005), reconocen generalmente que la expresión del antagonismo por un microorganismo hacia un patógeno en medio de cultivo no se puede tomar como evidencia de que el microorganismo controlará el patógeno en el campo. Por otra parte, ZAMORA (2005), obtuvo resultados que indicaron una correlación importante entre el antagonismo registrado *in vitro* y la eficacia de *B. subtilis* CE1 en la inhibición de los *F. verticillioides* en grano del maíz y en ensayos del invernadero.

Se realizó un estudio de persistencia de la actividad antagonista a través del tiempo comenzando el día 7 hasta el día 60. La FIGURA 18 indica una tendencia a perder la capacidad antagonista a través del tiempo para algunos prototipos como la **2.3** y **3.2**, mostrando una tendencia similar al caso de la viabilidad ya que estas dos muestras disminuyen su capacidad antagonista a partir del día 28, sin embargo, existen otras muestras que a pesar de la disminución de su viabilidad, mantiene la capacidad antagonista. Como el caso de los prototipos **1.1** y **3.3**, confirmando lo afirmado anteriormente, que relaciona la capacidad antagonista con el contenido de sólidos. La tabla de datos de origen se encuentra en el ANEXO 5.

También es posible relacionar el efecto de la viscosidad, ya que justamente las mezcla **1** y **3** son las que presentan mayor viscosidad, coincidentemente la temperatura de salida de estas dos muestras fueron entre un rango de 90-100 °C, aseverando lo demostrado por ZAMORA (2003), quien probó similares temperaturas de entrada variando las temperaturas de salida, encontrando que la mayor supervivencia se obtenía con una temperatura de salida más baja.

Para poder determinar qué prototipo resulta mejor, hay que considerar la estabilidad de sus características en el tiempo, para esto se debió realizar un análisis de regresión, con la dificultad que los diferentes prototipos se comportan en relación a modelos distintos, por lo cual sus pendientes no son comparables.

Sin embargo, se realizó el análisis considerando aquellas muestras que presentaban una correlación lineal, ya que son las que se comportan de manera más estable en el tiempo, las otras mezclas se descartaron por la desigualdad (correlación polinomial) de sus datos y por ende de su comportamiento.

Los prototipos seleccionados son, en definitiva, aquellas que presentan mejores resultados al momento de evaluarlas desde el punto de vista de su capacidad antagonista.

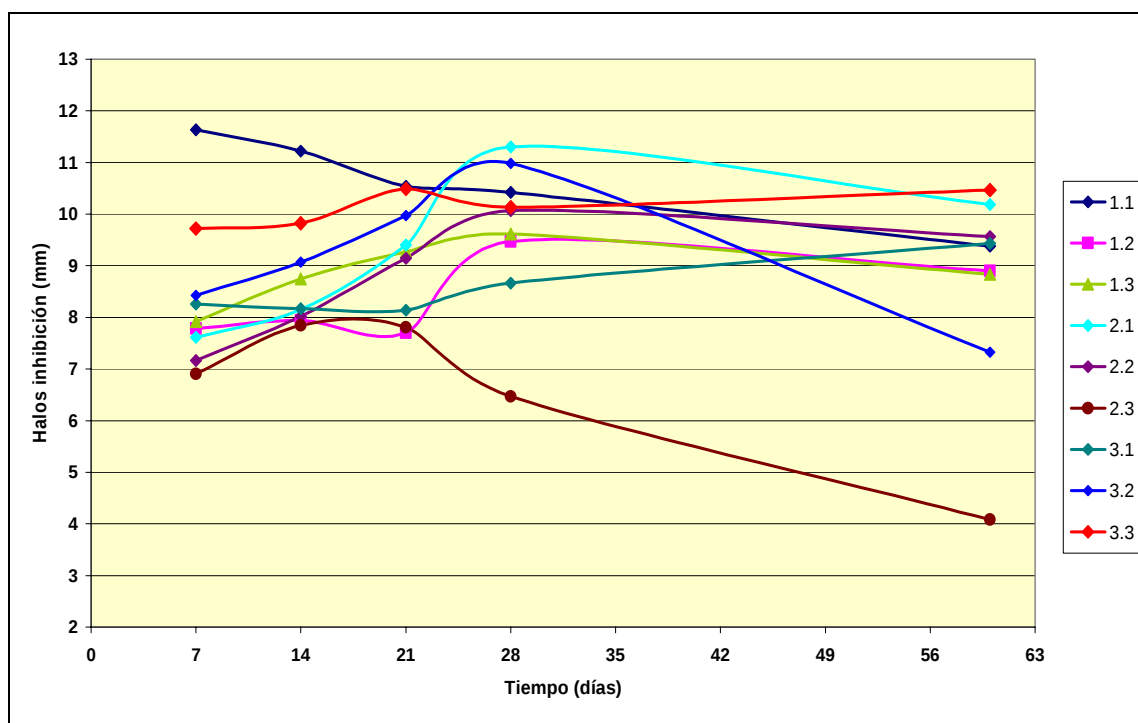


FIGURA 18 Halos de inhibición de cada una de los prototipos durante un periodo de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

En el CUADRO 7 es posible observar, desde el punto de vista de las pendientes, los prototipos que presentan mejores resultados son **3.3** y **3.1**, mostrando relación con el medio encapsulante adicionado, por su parte, la muestra **1.1** si bien presenta un excelente intercepto, su pendiente aumenta a medida que pasa el tiempo, mostrando una tendencia negativa.

CUADRO 7 Pendientes e interceptos de la actividad antagonista de cada una de las muestras, de correlación lineal.

Prototipos	Pendiente	Intercepto
1.1	0,0406	11,69
1.2	-----	-----
1.3	-----	-----
2.1	-----	-----
2.2	0,0398	7,75
2.3	0,0667	8,35
3.1	0,0251	7,87
3.2	-----	-----
3.3	0,0125	9,80

Es posible inferir que existen diferencias entre los dos resultados, es decir, respecto del estudio de viabilidad y la actividad antagonista, ya que los resultados no son coincidentes. Sin embargo, considerando factores como:

- que la viabilidad se puede mejorar con un aumento en la concentración inicial de bacterias
- que el contenido de sólidos y agente encapsulante influye al momento de proteger la célula
- que una viscosidad mayor aporta a la reducción de la temperatura de salida
- que una temperatura de salida baja ayuda a conservar las características antagonistas del cultivo
- que la estabilidad de la capacidad antagonista en el tiempo es el principal factor a considerar para la producción de un biocontrolador.

Se puede determinar que los prototipos constituidos por un concentrado celular de *B. subtilis* y una con 30% de maltodextrina (prototipo 3.3) y otra con 10% de Maltodextrina y 0,3% de Carragenina λ (prototipo 1.1), son las más adecuadas para producir un controlados biológico en polvo, mediante el método de deshidratación por atomización.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados en este estudio y de los resultados obtenidos, se desprenden las siguientes conclusiones:

- Es posible aplicar un proceso de deshidratación mediante secado *Spray*, a un concentrado celular de *Bacillus subtilis* manteniendo su viabilidad y capacidad antagonista frente a *Erwinia carotovora*, obteniéndose de esta forma un biopesticida efectivo, de fácil transporte y aplicación.
- No fue posible determinar un medio de suspensión con un agente encapsulante que entregue una misma respuesta respecto de viabilidad y persistencia de la capacidad antagonista.
- El prototipo 3.2 (Maltodextrina 30%) presentó una buena respuesta a la viabilidad a las 24 horas del proceso de secado y el prototipo 2.1 (Goma Guar 1,2%) presentó una buena viabilidad en el tiempo hasta los 60 días.
- El prototipo 1.1 (Maltodextrina 10% y carragenina 0,3%) presentó una muy buena actividad antagonista a las 24 horas del proceso de secado y el prototipo 3.3 mostró una alta persistencia de la capacidad antagonista en el tiempo, hasta los 60 días.
- Respecto de las temperaturas de proceso, no se evidencia el efecto de la temperatura de entrada en los resultados (viabilidad y capacidad antagonista). Sin embargo, sí se aprecia que temperaturas de salida más bajas entregan mejor respuesta a los resultados evaluados.
- De los parámetros evaluados el más importante es la persistencia de la capacidad antagonista, que en mejor grado fue logrado con las mezclas 3 (Maltodextrina 30%) y 1 (Maltodextrina 10% y carragenina 0,3%) que presentaban mayores consistencias (μ) y contenido de sólidos, lo que se asocia con la formación de la microgota y el efecto protector a la célula.

6. RESUMEN

Secado “*Spray*” de *Bacillus subtilis* y su Actividad Antagonista contra *Erwinia carotovora*

La finalidad de este estudio fue aplicar un proceso de deshidratación por atomización a suspensiones concentradas de *Bacillus subtilis*, como método de conservación para obtener un biocontrolador de fácil aplicación y con capacidad antagonista contra *Erwinia carotovora*, patógeno responsable de la pudrición húmeda bacteriana que afecta a cultivos comerciales de cala (*Zantedeschia* spp.). Para lograr el objetivo de esa investigación, se procedió inicialmente con la producción de un cultivo puro en un fermentador (capacidad 10 L) controlándose temperatura, aireación y crecimiento del cultivo, seguido de la adición de un agente protector. Finalmente esta mezcla se somete a deshidratación por medio de secado *Spray* a temperaturas controladas, donde se estudiaron diferentes agentes protectores (maltodextrina, goma guar y carragenina λ) y temperaturas de proceso ($T_e=160^{\circ}\text{C}$, $t_e=170^{\circ}\text{C}$, $t_e=180^{\circ}\text{C}$), generándose 9 prototipos de biopesticidas. Para determinar el prototipo ideal, se estudió la persistencia de la capacidad antagonista y la respectiva viabilidad *in vitro* por un periodo de 60 días. Los resultados obtenidos se analizaron por medio de regresión exponencial para el caso de la viabilidad y regresión lineal para la capacidad antagonista, contrastando las pendientes respectivas y seleccionándose el prototipo que presentó la menor pendiente respecto de su actividad antagonista.

Palabras claves: Secado *Spray*, *Bacillus subtilis*, biocontrolador, *Erwinia carotovora*.

SUMMARY

Spray Drying of *Bacillus subtilis* and its Antagonistic Activity against *Erwinia carotovora*

The purpose of this study was to apply a process of Spray drying to concentrated suspensions of *Bacillus subtilis*, as a method of conservation to obtain a biocontroller of easy application and with antagonist capacity against *Erwinia carotovora*, pathogen responsible of bacterial soft rot which affects the commercial production of callas (*Zantedeschia* spp.). To achieve the objective of this research, initially must be proceeded with the development of a pure culture in a 10L fermentor controlling temperature, aeration and growth of the culture, followed by the addition of a protective agent. Finally this mixture is dehydrated by means of Spray drying at controlled temperatures, where different protective agents (maltodextrina, guar gum and carragenina) and process temperatures were studied (Te=160°C, Te=170°C, Te=180°C), ending up in the generation of 9 prototypes biopesticides. In order to determine the ideal prototype, the persistence of the antagonistic capacity and the respective viability in vitro was studied for a period of 60 days. The obtained results were analyzed by means of exponential regression in the case of the viability and linear regression for the antagonistic capacity, comparing the respective slopes and selecting the prototype that presented the lowest slope respect to its antagonistic activity.

Key words: *Spray drying, Bacillus subtilis, biocontroller, Erwinia carotovora.*

7. BIBLIOGRAFIA

- ARANCIBIA, A. 1981. Farmacotecnia Teórica y Práctica. Compañía Editorial Continental, S.A., México. Tomo VI, Cáp.49: 1793-1805.
- CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, A.J.; RODRÍGUEZ, M.I.; CHULZEB, S. y ETCHEVERRY, M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. Research in Microbiology. 156, 748–754
- 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 2004 N° 96, 1024–1039p
- DZIEZAK, J. 1988. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. Food Technology. 42:136-151.
- EL HASSNI, M.; EL HADRAMI, A.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M.; AIT BARKA, E. y EL HADRAMI, I. 2007. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. Environmental and Experimental Botany, 59(2): 224-234.
- ESCALONA, E. S. 2004. Encapsulados de luteína-enocianina y su aplicación en alimentos. Universidad de Chile. Santiago. Chile: 79p.
- FRYER, P.J., PYLE, D.L., RIELLY, C.D., 1997. Chemical Engineering for the Food Industry. Blackie A & P. 462p.
- GELYMAR. 2007. Carrageninas y gomas. www.gelymar.com. 20-10-2007.
- GIACAMAN, A.G. 2006. Formulación de biopesticidas para combatir las enfermedades de la cara producidas por *Erwinia carotovora*. Tesis Bioquímica. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- HASSAN, S. 2003. Influence of Different Capsule Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität. Bonn. Alemania: 166p.
- KUNSTMANN, J. 2004. Determinación de subespecies de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall como agentes causales de “pudrición blanda” en cara (*Zantedeschia spp.*). Tesis Lic. Agr. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- PEDROZA, R. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. Universidad Iberoamericana. México D.F: 10p

- PERRY, R. Y GREEN, D. 1997. Chemical Engineers`Handbook. Mcgraw-Hill. 7th edition. 2640p
- REID, ROBERT C. Y SHERWOOD, THOMAS K. 1968. Propiedades de los gases y líquidos su estimación y correlación. UTEHA IMPRESO EN MEXICO. 719p (660.2969 REI)
- RODRÍGUEZ, V. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprófitos contra *Rhizoctonia Solana* un fitopatógeno causante del (camping off) en plantas de tomate. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú: 105p.
- SHAMES, IRVING H. 1999. Mecánica de fluidos. McGRAW-HILL.Tercera edicion 825p
- TALBOT, M.; LARKIN, R. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection. 24, 939–950.
- VENEGAS, E. CIAMPI, L. COLLADO, L. COSTA, M. FUESTES, R. NISSEN, J. SCHÖBITZ, R. SCHÖBITZ, M. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias del genero *Bacillus cohn* antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium link* en cala. Agro Sur. Vol. 33(2) 1-12.
- WAGNER, L. y WARTHESEN, J. 1995. Stability of Spray-Dried Encapsulated Carrot Carotenes. J. Food Sci. 60:1048-1053.
- YOUNG, S. L., SARDA, X., ROSENBERG, M. 1993. Microencapsulating Properties of Whey Proteins 1. Microencapsulation of Anhydrous Milk Fat J. Dairy Science 76:2868-2877.
- ZAMORA, L. 2005. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de Bacterias Lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Girona. España: 259p.
http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0711105-114345/TLzr.pdf
 14-03-2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Técnica de la gota sobre césped utilizada durante esta investigación.

La técnica consiste en sembrar sobre una placa con Agar Papa Dextrosa (APD) con un algodón estéril un césped de la cepa patógena *E. carotovora* (previamente reactivada) y dejarla secar la placa por 15 min aproximadamente en cámara de flujo laminar. A continuación se deben rotular las placas sobre la base de vidrio (o plástico) y marcar puntos guías lugar donde luego se aplica 5 μ L de cultivo celular o 7 μ L de hidratado de cultivo celular en polvo, sobre el césped tomando como referencia los puntos guías (FIGURA 19).

Posteriormente, las placas deben ser nuevamente secadas, durante 30 min en cámara de flujo laminar, e incubadas en horno a 25°C durante 24 h y a continuación, en horno a 32°C durante 24 h. Finalmente se mide el radio del halo de inhibición. Para el caso de prueba de antagonismo con cepa hidratada, el periodo de incubación a 32°C se debe extender hasta 72 h. Para obtener el hidratado de cultivo celular en polvo se dispuso 0,1 g de este último en 10 mL de agua peptonada estéril, la fórmula se agitó bien y luego de incubó por 12 horas a 32°C.

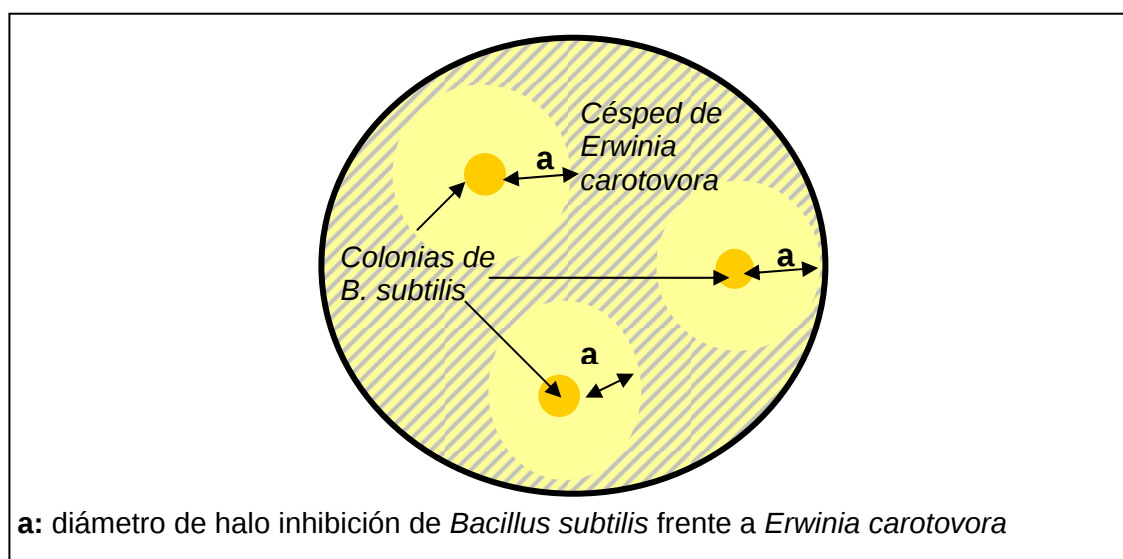


FIGURA 19. Esquema de la prueba antagonismo.

ANEXO 2

Temperaturas promedio de entrada y salida durante el proceso de secado para cada muestra en °C.

	Promedio secados 1.1		Promedio secados 1.2		Promedio secados 1.3	
Tiempo(min)	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 1	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 1	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 1
0	160,0	87,7	170,0	96,3	180,0	117,3
3	160,0	93,7	168,7	99,0	179,7	111,0
6	159,3	95,0	170,3	106,3	181,7	113,0
9	159,0	95,3	168,7	108,3	180,0	111,7
12	160,0	97,0	170,3	110,0	179,0	109,0
15	159,7	98,0	170,3	109,7	179,3	108,7
18	161,0	97,3	169,3	109,0	180,0	107,7
21	161,3	94,0	170,0	108,7	180,3	108,0
	Promedio secados 2.1		Promedio secados 2.2		Promedio secados 2.3	
Tiempo(min)	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 2	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 2	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 2
0	160,0	101,3	170,0	96,7	180,0	93,7
3	159,0	96,7	169,0	94,7	180,3	94,3
6	160,0	97,7	170,3	96,0	182,0	94,7
9	160,0	99,7	170,0	97,7	181,0	93,3
12	160,3	98,3	172,3	98,7	180,7	95,0
15	160,0	97,3	169,7	95,7	180,0	91,0
18	159,3	97,7	169,3	95,3	180,0	93,3
21	160,3	98,0	170,0	95,3	179,7	93,3
	Promedio secados 3.1		Promedio secados 3.2		Promedio secados 3.3	
Tiempo(min)	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 3	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 3	Temperatura entrada	Temperatura salida fórmula 3
0	160,0	79,3	169,3	88,3	180,0	87,7
3	159,0	86,0	169,7	88,7	179,3	90,0
6	161,0	85,7	170,3	89,3	180,3	91,3
9	159,7	86,3	172,0	88,3	180,7	93,3
12	160,3	84,7	169,7	90,0	180,3	93,0
15	160,7	85,0	170,3	89,0	180,3	91,0
18	161,3	84,3	170,0	87,0	180,0	89,7
21	160,0	83,3	169,7	87,3	179,7	91,7

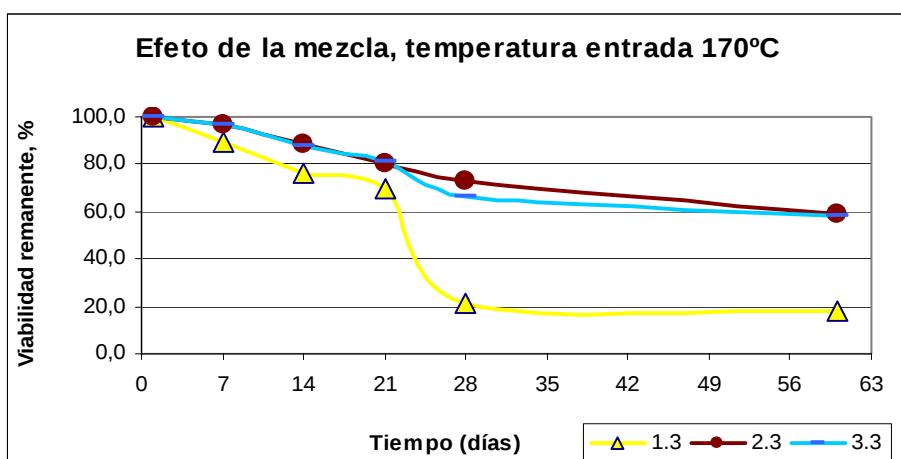
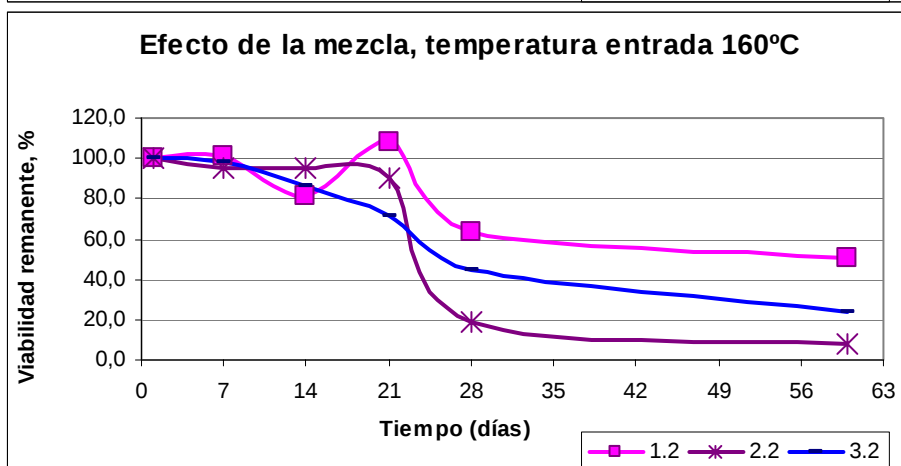
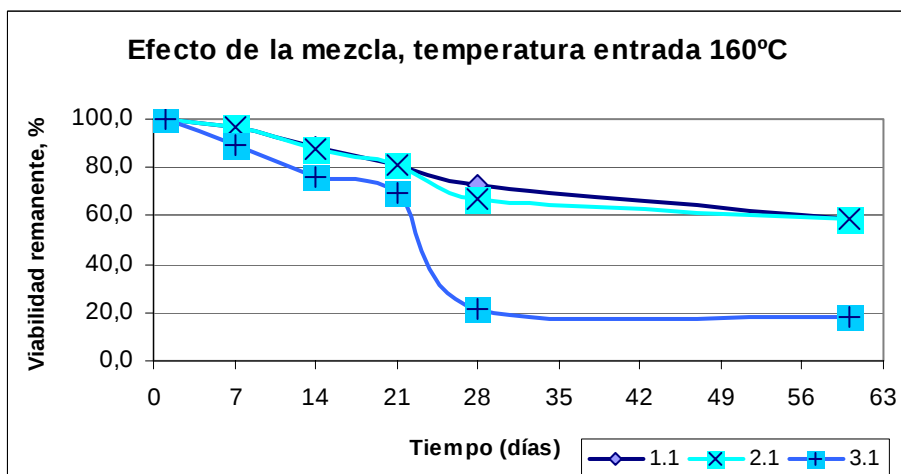
ANEXO 3

Recuento de unidades formadoras de colonias promedio de cada muestra para los días 1, 7, 14, 21, 28 y 60.

Muestra	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
/Día	1	7	14	21	28	60
1.1	3,4E+07	3,3E+07	3,1E+07	2,8E+07	2,5E+07	2,0E+07
1.2	8,9E+07	8,6E+07	7,8E+07	7,2E+07	5,9E+07	5,2E+07
1.3	3,6E+07	3,2E+07	2,73E+07	2,5E+07	7,8E+06	6,5E+06
2.1	1,1E+08	1,0E+08	1,3E+08	1,0E+08	9,7E+07	8,3E+07
2.2	5,9E+07	6,3E+07	5,2E+07	5,1E+07	3,8E+07	1,9E+07
2.3	1,4E+08	1,3E+08	1,3E+08	1,1E+08	5,2E+07	1,6E+07
3.1	2,4E+07	2,4E+07	1,9E+07	2,6E+07	1,5E+07	1,2E+07
3.2	2,0E+08	1,9E+08	1,9E+08	1,8E+08	3,7E+07	1,6E+07
3.3	3,4E+07	3,4E+07	3,0E+07	2,5E+07	1,5E+07	8,3E+06

ANEXO 4

Efecto de cada diferente mezcla a igual temperatura de entrada



ANEXO 5

Halos de inhibición promedio (mm) de cada muestra para los días 1, 7, 14, 21, 28 y 60.

Muestra /Día	Promedio 7	Promedio 14	Promedio 21	Promedio 28	Promedio 60
1.1	11,63	11,22	10,54	10,42	9,38
1.2	7,78	7,94	7,70	9,47	8,90
1.3	7,92	8,75	9,27	9,62	8,83
2.1	7,61	8,16	9,40	11,30	10,18
2.2	7,16	8,02	9,15	10,07	9,57
2.3	6,91	7,85	7,81	6,47	4,08
3.1	8,26	8,17	8,14	8,66	9,43
3.2	8,43	9,07	9,97	10,98	7,33
3.3	9,72	9,83	10,49	10,13	10,47