



Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

**Bases per a la formulació
de l'agent de biocontrol
Candida sake CPA-1**

Abadias i Seró

Tesi Doctoral

Desembre 2000





Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia d'Aliments



Universitat de Lleida
Registre General

31 OCT. 2000

5720

S:

Bases per a la formulació de l'agent de biocontrol *Candida sake* CPA-1



Memòria presentada per:

M. Isabel Abadías i Seró

per optar al grau de Doctora

Directora: Dra. Inmaculada Viñas i Almenar

Co-Director: Dr. Josep Usall i Rodié

Lleida, Desembre del 2000

*Al Jordi,
als meus pares,
a la Noemí i l'Oscar.*

AGRAÏMENTS

En aquestes línies vull expressar el meu sincer agraïment a totes aquelles persones i institucions que m'han recolzat i encoratjat en tot moment i que han fet possible la realització d'aquest treball, especialment a la meua "família" del laboratori de Patologia.

En primer lloc a la Immaculada Viñas per la confiança que sempre ha dipositat en mi, pel seu optimisme i pel seu afany en cuidar de tots nosaltres. Pels seus consells i suport incondicional.

Al Josep Usall, per la seva inestimable ajuda i consells, per les seves crítiques, sempre constructives i per tenir sempre un moment per atendre els meus "problemes". Per donar-me en tot moment la seva sincera opinió i una visió més realista de les coses.

A la Neus Teixidó, pels incalculables consells i ajuda en la redacció d'aquest treball, per les hores compartides i perquè ha estat en tot moment una amiga.

Al Naresb Magan, per acollir-me tant al seu laboratori com a la seva casa, per entendre el meu anglès abans que parlés i per la seva ajuda en la correcció dels articles. "Thank you Naresb for wellcoming me in your laboratory and your house, for your patience, your advoices, your help with corrections and for our talks about science and life".

Al Vicent Sanchis, per què va ser qui em va introduir en el món de la microbiologia ja fa molts anys, pels seus consells i per respondre sempre a les meves consultes, no sempre fàcils.

A la Carla, la meua "germana de tesi", per ser una bona amiga i tenir sempre a punt un bon consell. Per tots els moments que hem compartit i les nostres converses. Muitos beijos.

A la Charo pels seus consells i la seva ajuda. Pel seu esperit de superació i per la seva força. I com no, a l'Antonio.

A l'Elena, amb qui apart d'amistat, he compartit els mateixos problemes de les "nostres bestioletes". Pel seu optimisme, la seva actioitat sempre frenética i per aportar sempre una nota d'alegria al laboratori.

A l'Àngels, per les incalculables hores de cabina compartides, per donar-me ànims en els moments baixos, pels seus consells des d'una òptica diferent a la nostra i per mantenir sempre l'harmonia i l'ordre entre tots nosaltres. Per ser la "teta" i, sobretot una persona en qui confiar.

A l'Asun, pels milers de plaques i bancs de dilucions que hem fet, a la Neus, Júlia, Pilar, Quico... per ser tal com sou i per aportar la nota "fresca" al laboratori.

A la Silvia, pels seus consells i suport, a l'Estanis, pel seu ajut, al Xavier, amb qui vaig compartir una época de treball que no s'ha vist reflexada en la tesi, pel seu bon humor i els seus consells.

Al Lluís, que va iniciar la "conquesta de les amèriques" i encara no ha acabat.

Al Departament de Tecnologia d'Aliments i al MEC que han confiat en mi aquests quatre anys per a poder realitzar la tesi.

Al Centre UdL-IRTA pel seu suport en la realització de la tesi.

A la CICYT pels seus ajuts econòmics.

I finalment al Jordi, qui ha aguantat les meves cabòries i moments baixos, sobretot durant els últims mesos, pel seu optimisme i per les seves paraules de suport i ànims. Als meus pares i germans, la Fuensanta i el Guillem per la seva paciència i per estar sempre al meu costat.

A tots,

Moltes Gràcies

W. Abadías

Aquest treball ha estat realitzat al laboratori de Patologia de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA, i ha rebut el finançament del MEC i la CICYT.

ABREVIATURES

ψ	Potencial hídric
ψ_c	Potencial hídric de les cèl·lules
ψ_m	Potencial hídric del medi de cultiu
a_w	Activitat d'aigua
CECT	“Colección Española de Cultivos Tipo”
cfu	Unitats formadores de colònies (en anglès)
CICYT	“Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología”
CPA	Col·lecció d'antagonistes de la Unitat de Patologia
DL ₅₀	Dosi Letal 50
EUA	Estats Units d'Amèrica
Glu	Glucosa
Gly	Glicerol
HR	Humitat Relativa
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
MEC	Ministeri d'Educació i Cultura
NYDA	Agar Nutritiu Llevat Dextrosa
NYDB	Brou Nutritiu Llevat Dextrosa
p/v	Relació pes/volum
Pro	Prolina
Sor	Sorbitol
UE	Unió Europea
ufc	Unitats formadores de colònies (en català)
USDA	Departament d'Agricultura dels EUA

RESUM

El desenvolupament de resistència als fungicides per part de molts patògens en postcollita de fruites i vegetals, conjuntament amb una preocupació creixent de la societat respecte als perills sanitaris i mediambientals que comporten els pesticides i els seus residus, han generat un gran interès pel desenvolupament de mètodes alternatius als productes químics de síntesi. El control biològic mitjançant la utilització de microorganismes antagonics s'ha presentat com una de les alternatives més prometedores al control químic. L'esforç que la investigació dedica a aquesta àrea ha incrementat d'una manera espectacular, i això s'està començant a reflexar en el nombre d'agents de biocontrol disponibles en el mercat o en fase de recerca. Entre ells destaca la soca CPA-1 del llevat *Candida sake*, aïllada de la superfície de pomes en el laboratori de Patologia del Centre UdL-IRTA. Aquesta soca ha demostrat tenir una bona capacitat antagonica enfront els principals fongs patògens en postcollita de fruita de llavor. Fins al moment, *C. sake* ha estat patentada a Espanya i cinc països més. No obstant, cara a la comercialització d'aquest biofungicida és necessari obtenir una formulació, que permeti una presentació adequada del producte, amb una alta viabilitat i estabilitat en el temps i que faciliti la seva distribució i aplicació mitjançant les tècniques ja existents. Ademés, aquesta formulació ha de tenir una efectivitat comparable a les cèl·lules fresques.

L'objectiu de la present tesi ha estat l'estudi de les bases per a la formulació d'aquest agent de biocontrol. En primer lloc, es va estudiar la possibilitat de deshidratar aquest agent mitjançant la liofilització, avaluant els diferents factors que poden contribuir a incrementar la viabilitat, com el mètode de congelació i l'addició de substàncies protectores (Capítol 3), i el medi utilitzat en la rehidratació de les cèl·lules liofilitzades (Capítol 4). També es va avaluar l'efectivitat de les cèl·lules liofilitzades contra *Penicillium expansum* en pomes "Golden Delicious" i la seva estabilitat en condicions d'emmagatzematge (Capítol 4). Ja que la manipulació fisiològica de les condicions de creixement pot afectar significativament la qualitat de les cèl·lules i la seva competència ecològica, es van dur a terme estudis per avaluar l'efecte que té la modificació de l'activitat aigua (a_w) d'un medi de cultiu a base de melassa de sucre de canya en el potencial hídric de les cèl·lules (Capítol 5), en el creixement de *C. sake*, en l'acumulació de reserves endògenes i en la resistència a l'estrès hídric (Capítol 6). Finalment, basant-nos en aquests resultats, es va estudiar per primer cop la possibilitat de conservar les cèl·lules de *C. sake* en solucions líquides isotòniques (Capítol 7).

Les cèl·lules de *C. sake* es van mostrar molt sensibles al procés de liofilització. La llet en pols desnatada, utilitzada al 10%, va presentar-se com un bon protector i va donar un producte sec porós i fàcilment rehidratable. Amb la utilització d'una solució

protectora que contenia el 10% de llet en pols i el 10% de lactosa, es va aconseguir augmentar la viabilitat de les cèl·lules fins el 40%. El medi de rehidratació també es va presentar com un factor important per a la reactivació del llevat. Així, utilitzant el 10% de llet en pols com a medi de rehidratació enlloc de la solució amortidora de fosfat, la viabilitat va augmentar del 40 al 85%. Les cèl·lules liofilitzades van reduir el percentatge de podridures causades per *P. expansum* en pomes "Golden Delicious". No obstant, la seva efectivitat va ser menor que la de les cèl·lules fresques. La viabilitat del producte liofilitzat va disminuir fins el 10% després de 2 mesos de conservació a 4°C.

El potencial hídric de les cèl·lules crescudes en el medi a base de melassa amb a_w modificada i sense modificar, va disminuir en disminuir l' a_w del medi de cultiu. Además, aquesta modificació de l' a_w del medi de cultiu va provocar un canvi en les reserves endògenes de les cèl·lules de *C. sake*, sense afectar significativament el seu creixement quan l' a_w del medi va ser de 0,98. Les cèl·lules crescudes durant 48 h en el medi de melassa no modificat i els modificats a a_w de 0,98 mitjançant l'addició de glicerol o NaCl, van presentar gran resistència a l'estrés hídric. Els principals soluts acumulats en les cèl·lules de *C. sake* quan l' a_w del medi de cultiu es va reduir van ser el glicerol i l'arabitol.

El medi de cultiu, el solut utilitzat per a disminuir el potencial hídric de les solucions líquides i la temperatura de conservació, van influir en la viabilitat de *C. sake* conservada en medi líquid, essent el medi de melassa no modificat i els modificats a a_w 0,98 amb glicerol o sorbitol els millors. S'ha aconseguit una formulació isotònica que després de 7 mesos de conservació a 4°C manté la seva viabilitat, i efectivitat contra *P. expansum* en pomes "Golden Delicious". Aquesta formulació es va preparar fent créixer les cèl·lules en el medi de melassa modificat amb sorbitol (a_w 0,98) i conservant-les amb una solució isotònica de trealosa.

RESUMEN

El desarrollo de resistencias a los fungicidas por parte de muchos patógenos, conjuntamente con un creciente interés social sobre los riesgos medioambientales y para la salud que tienen estos pesticidas, han generado un gran interés en el desarrollo de métodos alternativos a los productos químicos de síntesis. El control biológico de las enfermedades de postcosecha en fruta de pepita se ha mostrado como una de las alternativas más prometedoras al control químico. El esfuerzo que la investigación dedica a esta área ha incrementado de manera espectacular, y eso se está empezando a reflejar en el número de agentes de biocontrol disponibles en el mercado o en fase de estudio. Entre ellos destaca la cepa CPA-1 de la levadura *Candida sake* aislada de la superficie de manzanas en el laboratorio de Patología del Centro UdL-IRTA. Esta cepa ha demostrado tener gran actividad antagonica contra los principales patógenos de fruta de pepita. Hasta el momento se ha patentado en España y cinco países más. Sin embargo, para su aplicación comercial, es necesario formular este agente de biocontrol, con la finalidad de presentar el producto, con una alta viabilidad y estabilidad a lo largo del tiempo y que facilite su distribución y aplicación con las técnicas ya existentes. Además, esta formulación ha de tener una efectividad comparable a la de las células frescas.

El objetivo de la presente tesis ha sido el estudio de las bases para la formulación de este agente de biocontrol. En primer lugar se estudió la posibilidad de deshidratar este agente mediante liofilización, evaluando los diferentes factores que puedan contribuir a incrementar su viabilidad, como el método de congelación y la adición de sustancias protectoras (Capítulo 3), y el medio utilizado para la rehidratación de las células liofilizadas (Capítulo 4). Se evaluó la efectividad de las células liofilizadas contra *Penicillium expansum* en manzanas "Golden Delicious" y su estabilidad en condiciones de almacenamiento (Capítulo 4). Como la manipulación fisiológica de las condiciones de crecimiento pueden influir significativamente en la calidad de las células y en su competencia ecológica, se llevaron a cabo estudios para evaluar el efecto que tiene la modificación de la actividad de agua (a_w) de un medio de cultivo a base de melaza de azúcar de caña en el potencial hídrico de las células (Capítulo 5), en el crecimiento de *C. sake*, en la acumulación de reservas endógenas y en la resistencia al estrés hídrico (Capítulo 6). Finalmente, basándonos en estos resultados, se estudió por primera vez la posibilidad de conservar las células de *C. sake* en soluciones líquidas isotónicas (Capítulo 7).

Las células de *C. sake* se mostraron muy sensibles al proceso de liofilización. La leche en polvo desnatada utilizada al 10% se presentó como un buen protector. Además el producto obtenido fue poroso y fácilmente rehidratable. Con la utilización de una

solución protectora, que contenía el 10% de leche en polvo y el 10% de lactosa, se consiguió aumentar la viabilidad de las células hasta el 40%. El medio de rehidratación también se presentó como un factor importante para la reactivación de la levadura tras su liofilización. Así, la viabilidad de las células de *C. sake* utilizando el 10% de leche en polvo como medio de rehidratación en vez de tampón fosfato, aumentó del 40 al 85%. Las células liofilizadas redujeron el porcentaje de podredumbre causado por *P. expansum* en manzanas “Golden Delicious”. Sin embargo, su efectividad fue menor que la de las células frescas. La viabilidad del producto liofilizado disminuyó hasta el 10% después de dos meses de conservación a 4°C.

El potencial hídrico de las células crecidas en un medio a base de melaza con a_w modificada y sin modificar, disminuyó al disminuir la a_w del medio de cultivo. Además, esta modificación de la a_w del medio de cultivo, provocó un cambio en las reservas endógenas de las células de *C. sake* sin afectar significativamente a su crecimiento cuando la a_w del medio de cultivo fue 0,98. Las células que crecieron durante 48 h en el medio de melaza no modificado y en los modificados a a_w 0,98 con glicerol o NaCl presentaron una gran resistencia al estrés hídrico. Los principales solutos acumulados en las células de *C. sake* cuando la a_w del medio de cultivo se redujo fueron el glicerol y el arabitol.

El medio de cultivo, el soluto utilizado para disminuir el potencial hídrico en las soluciones líquidas y la temperatura de conservación, influyeron en la viabilidad de *C. sake* conservada en medio líquido, siendo los mejores el medio de melaza no modificado y los modificados a a_w 0,98 con glicerol o sorbitol. Se consiguió una formulación isotónica que, después de 7 meses de conservación a 4°C, mantuvo su viabilidad y efectividad contra *P. expansum* en manzanas “Golden Delicious”. Esta formulación se preparó haciendo crecer las células en el medio de melaza modificado con sorbitol (a_w 0,98) y conservándolas con una solución isotónica de trealosa.

SUMMARY

Biological control has emerged as the most promising alternative to chemicals in controlling postharvest diseases of fruit and vegetables. The development of resistance to many fungicides by major postharvest pathogens and concern for public safety have been the main driving force in the search for new and safer methods. The research effort expended in this area has increased dramatically and this is beginning to be reflected in the number of biocontrol agents available in the marketplace or in study. Among them stands out the strain CPA-1 of the yeast *Candida sake*, which was isolated from the apple surface in the Pathology laboratory of the UdL-IRTA Centre. This strain has demonstrated to have antagonistic activity against the major postharvest pathogens of pome fruits. *C. sake* has been patented in Spain and in five other countries. However, for commercial application, this antagonist should be formulated in order to present the product in a usable form, with high viability, stability, safety, ease of distribution and application, and with retained biocontrol activity similar to that of fresh cells.

The objectives of the present work were to carry out fundamental and applied studies to enable effective formulations of *C. sake*. Thus, dehydration of this biocontrol agent using freeze-drying was studied. The effect of freezing method and protectants was evaluated (Chapter 3), and the effect of rehydration media on viability examined (Chapter 4). Subsequently, the efficacy of such treatments against *Penicillium expansum* on Golden Delicious apples, and stability of the freeze-dried *C. sake* cells was also investigated (Chapter 4). Because physiological manipulation of growth conditions can significantly affect quality of cells and ecological competence studies were carried out on the effect of different water activity (a_w) treatments in molasses-based media on changes in internal water potentials (Chapter 5), and on growth parameters, accumulation of endogenous reserves and water stress tolerance identified (Chapter 6). Finally, based on these studies the potential for preserving *C. sake* cells in isotonic solutions to conserve viability and shelf-life were evaluated for the first time (Chapter 7).

C. sake cells were very sensitive to the freeze-drying process. Powdered skimmed milk (SM) used at 10% concentration was shown to give good protection to cells of *C. sake* against freeze-drying, providing the freeze-dried product with a porous structure that made rehydration easier. The combination of 10% SM + 10% lactose was the best combination tested, with 40% of cells remaining viable after freeze-drying. The rehydration medium was shown to be a critical factor influencing the recovery of *C. sake* cells. Using 10% SM as a rehydration medium instead of potassium phosphate, cell viability increased from 40 to 85%. Freeze-dried *C. sake* cells reduced the

incidence of decay caused by *P. expansum* in Golden Delicious apples. However, its efficacy was lower than that obtained with fresh cells. Stability of freeze-dried cells decreased during their preservation, and their viability was reduced to 10% after 2 months storage at 4°C.

Water potential of *C. sake* cells grown in molasses-based media with modified a_w decreased with decreasing a_w of medium. Moreover, modification of the a_w of the culture medium changed the concentration of endogenous sugars and polyols without affecting significantly its growth when the a_w of the medium was 0.98. Cells grown for 48 h in the unmodified molasses-based medium, and in those modified to 0.98 a_w with the addition of NaCl or glycerol showed high water stress resistance. The main solutes accumulated in *C. sake* cells in response to lowered a_w of molasses media were glycerol and arabitol.

Culture and preservation medium and temperature greatly influenced the viability of *C. sake* cells in isotonic liquid solutions. Unmodified molasses medium and those modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol or sorbitol were shown to be the best culture medium for cells of *C. sake*. This study enabled an isotonic liquid formulation of *C. sake* cells with retained viability and efficacy against *P. expansum* on Golden Delicious apples after 7 months of storage at 4°C to be achieved. This formulation was prepared by growing the cells in sorbitol-modified molasses medium (a_w 0.98) and preserving them in an isotonic trehalose solution.

INDEX

CAPÍTOL 1

Introducció general.....	1
1. El control biològic.....	2
1.1. Introducció.....	2
1.2. Avantatges del control biològic.....	2
1.3. Característiques desitjables d'un agent de biocontrol.....	2
1.4. Situació actual.....	3
2. Procés de desenvolupament d'un agent de biocontrol.....	4
2.1. Descobriment, identificació, assaigs d'eficàcia, toxicologia i patent de l'agentbiocontrol <i>C. sake</i>	5
2.2. Producció d'agents de biocontrol.....	7
2.3. Formulació d'agents de biocontrol.....	8
2.4. Registre d'agents de biocontrol.....	8
3. Formulació d'agents de biocontrol.....	9
3.1. Principis de formulació.....	9
3.2. Emmagatzematge i distribució.....	10
3.3. Aplicació.....	11
3.4. Tipus de formulacions.....	11
3.4.1. Formulacions líquides.....	11
3.4.2. Formulacions sòlides.....	12
3.5. Agents de biocontrol comercials.....	13
3.5.1. Productes biològics comercials per a la postcollita de pomes, peres i cítrics.....	15
4. Deshidratació de llevats.....	15
4.1. Tècniques de deshidratació.....	16
4.1.1. Liofilització.....	16
4.1.2. Atomització.....	16
4.1.3. Assecadors de cinta i túnel.....	16
4.1.4. Llit fluiditzat.....	17

4.2. Danys que sofreixen les cèl·lules durant un procés de deshidratació-rehidratació.....	17
4.2.1. Canvis morfològics.....	18
4.2.2. Canvis en la pressió osmòtica.....	18
4.2.3. Lesions en les membranes.....	18
4.2.4. Canvis bioquímics.....	18
4.3. Factors que afecten a la viabilitat de les cèl·lules durant un procés de deshidratació.....	19
4.3.1. Congelació.....	19
4.3.2. Medi de cultiu.....	19
4.3.3. Substàncies protectores.....	20
4.3.4. Condicions de rehidratació.....	21
5. Formulació líquida.....	22
5.1. Potencial hídric de les cèl·lules.....	22
5.2. Els soluts compatibles: Polihidroxiàlcohols.....	23
5.3. La trealosa.....	24
5.4. Millora dels microorganismes enfront l'estrès.....	25
5.5. Formulacions líquides isotòniques.....	26
Referències.....	27

CAPÍTOL 2

Objectius.....	40
Objectives (<i>English</i>).....	41

CAPÍTOL 3

Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast <i>Candida sake</i> (Int. J. Food Microbiol., in press).....	43
---	----

CAPÍTOL 4

Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent <i>Candida sake</i> using different protective and rehydration media (J. Food Protec., submitted).....	61
---	----

CAPÍTOL 5

- Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake* (J. Appl. Microbiol., in press)..... 77

CAPÍTOL 6

- Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation (Can. J. Microbiol., in press)..... 95

CAPÍTOL 7

- Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* in isotonic solutions (Appl. Environ. Microbiol., submitted)..... 113

CAPÍTOL 8

- Discussió general..... 133

1. Estudi de la liofilització com a mètode de deshidratació de l'agent de biocontrol *C. sake* 134
 - 1.1. Efecte del mètode de congelació..... 134
 - 1.2. Efecte de l'addició de medis protectors..... 135
 - 1.3. Efecte del medi de rehidratació..... 136
 - 1.4. Efectivitat de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades..... 137
 - 1.5. Viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades durant la conservació..... 140
2. Estudi ecofisiològic de l'agent de biocontrol *C. sake* crescut en medis de melassa amb a_w no modificada i modificada mitjançant l'addició de diferents soluts..... 141
 - 2.1. Creixement de l'agent de biocontrol *C. sake* en condicions d'estrès hídric..... 141

2.2. Mesura del potencial hídric de les cèl·lules de <i>C. sake</i> i la seva relació amb els soluts intracel·lulars.....	143
2.3. Caracterització de les reserves endògenes (sucres i poliols) acumulades pel llevat <i>C. sake</i> crescut en els medis a base de melassa.....	145
2.4. Millora del microorganisme <i>C. sake</i> enfront a condicions d'estrès hídric.....	147
3. Estudi de la conservació de l'agent de biocontrol <i>C. sake</i> en solucions isotòniques líquides.....	148
3.1. Viabilitat de <i>C. sake</i> conservat amb solucions líquides isotòniques.....	149
3.2. Efectivitat de les formulacions líquides isotòniques de <i>C. sake</i>	151
4. Conclusions.....	153
Conclusions (English).....	156
5. Perspectives de futur.....	159
6. Referències.....	161

Capítol 1

Introducció general

1. EL CONTROL BIOLÒGIC

1.1. Introducció

El control biològic, en un sentit ampli, pot definir-se com l'ús d'agents vius per a controlar plagues, patògens i males herbes. Durant l'última dècada, el control biològic ha sofert una atenció creixent per part de la comunitat científica, la premsa i el domini públic. Aquests esforços van sorgir de la necessitat d'alternatives als productes químics de síntesi per al control de malalties degut al desenvolupament de soques resistents (Bertrand i Saulie-Carter, 1978; Rosenberg i Meyer, 1981; Viñas i cols., 1991, 1993) i la preocupació per la seguretat del consumidor (National Research Council, 1987). L'esforç en la investigació dedicat en aquesta àrea, ja sigui per part del sector públic o privat, ha incrementat d'una manera espectacular, i això s'està començant a reflexar en el nombre d'agents de biocontrol disponibles en el mercat (Butt i cols., 1999; Droby i cols., 1998; Janisiewicz i Jeffers, 1997; Rhodes, 1993).

1.2. Avantatges del control biològic

Alguns dels avantatges del control microbiològic en relació a altres sistemes de lluita, es poden resumir en els següents (Deacon, 1983):

- Són més segurs
- Poden ser persistents al llarg del temps
- Produeixen un efecte insignificant en el balanç ecològic
- Són freqüentment compatibles amb altres sistemes de control, inclosos els productes químics de síntesi, per la qual cosa es poden aplicar conjuntament

1.3. Característiques desitjables d'un agent de biocontrol

A l'hora d'establir la selecció dels agents de biocontrol que aplicarem per controlar una determinada malaltia, haurem de considerar les següents característiques (Wisniewski i Wilson, 1992):

- Estabilitat genètica
- Efectivitat a baixes concentracions
- Poca exigència pel que fa a requeriments nutritius
- Efectivitat per a un gran nombre de patògens i per diversos fruits i vegetals
- Capacitat de reproduir-se en medis de creixement econòmics
- Facilitat d'aplicació

- No produir metabòlits secundaris que siguin tòxics per les persones o animals
- Resistència als insecticides i fungicides amb què pot arribar a estar en contacte
- Compatibilitat amb altres tractaments químics o físics
- No patogènic sobre l'hoste
- Capacitat de sobreviure sota condicions adverses (incloses baixes temperatures i l'emmagatzematge en atmosferes modificades)

1.4. Situació actual

Darrerament s'ha intensificat la recerca en el camp de la lluita biològica de les malalties de postcollita en fruita. En pomes i peres podem destacar, entre d'altres, els estudis de Janisiewicz (1987, 1988a, 1991), Janisiewicz i Roitman (1988), Janisiewicz i Marchi (1992), Viñas i cols. (1998), Usall i cols. (2000a, b). En el camp dels cítrics destaquen els estudis de Chalutz i cols. (1988), Smilanick i Denis-Arrue (1992), Viñas i cols. (1999). En fruits tropicals i subtropicals trobem les investigacions de Kanapathipilla i Jantan (1985), Koomen i Jeffries (1993), Korsten i cols. (1993) i sobre fruites petites, com ara la maduixa, Janisiewicz (1988b). En la Taula 1 estan descrits alguns exemples d'èxits obtinguts en la recerca d'agents de biocontrol de patògens en pomes i peres.

La indústria, el govern i la població comparteixen expectatives en el control biològic. Si aquestes expectatives s'han de veure complertes, es necessiten formulacions adequades. Fins ara, la recerca publicada en aquesta àrea és, malauradament, escassa en comparació amb el volum considerable de bibliografia que existeix en referència a efectivitat, mode d'acció i genètica. Això pot ser degut, en part al fet de què molta informació existeix com a secret comercial. El desenvolupament d'una tecnologia de formulació dirigida als requeriments dels agents microbians és essencial si els agents de biocontrol volen presentar-se com una alternativa real als productes químics (Rhodes, 1993).

Actualment també s'està treballant en la millora de la capacitat antagònica dels agents de biocontrol ja descoberts, com ara l'addició de nutrients (Janisiewicz i cols., 1992) o la combinació amb altres sistemes de lluita (El-Ghaouth i Wilson, 1995). També s'estan dedicant molts esforços en començar a treballar en la seva manipulació genètica (Pusey, 1994).

Taula 1. Antagonistes en el control dels principals patògens de postcollita en fruita de llavor.

Malaltia	Patogen	Agent de biocontrol	Referència
POMES			
Podridura blava	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Janisiewicz, 1987
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz i Roitman, 1988
		<i>Cryptococcus</i> spp.	Roberts, 1991; Wilson i cols., 1993
		<i>Pichia guilliermondii</i>	McLaughlin i cols., 1990
		<i>Candida sake</i>	Wilson i cols., 1993
		<i>Pichia anomala</i> K i	Jijakli i cols., 1993
		<i>Candida sake</i> O	
		<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas i cols., 1996, 1997
		<i>Cryptococcus laurentii</i> HRA5,	Chand-Goyal i Spotts, 1997
		<i>Cryptococcus infirmominiatus</i> YY6 i <i>Rhodotorula glutinis</i> HRB6	
Podridura grisa	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	Wisniewski i cols., 1988; McLaughlin i cols., 1990
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz i Roitman, 1988
		<i>Cryptococcus laurentii</i>	Roberts, 1990a
		<i>Acremonium breve</i>	Janisiewicz, 1988b
		<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas i cols., 1996, 1997
Podridura per <i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas i cols., 1996, 1997
PERES			
Podridura blava	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz i Roitman, 1988
Podridura grisa	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz i Roitman, 1988
		<i>Bacillus pumilus</i> 3PPE i	Mari i cols., 1996
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 2TOE	
	<i>Mucor</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> i <i>Cryptococcus albidus</i>	Roberts, 1990b

2. PROCÉS DE DESENVOLUPAMENT D'UN AGENT DE BIOCONTROL

Bowers (1982), va indicar la seqüència de passos necessaris per poder comercialitzar un agent de biocontrol:

- Descobriment i identificació de l'agent de biocontrol
- Realització dels assaigs d'eficàcia

- Realització dels assaigs de seguretat, tant per a l'home, com per a l'ambient i per als organismes que no ha de controlar
- Estudi de l'estabilitat genètica de l'agent de biocontrol, ja que durant la seva utilització no hauria de perdre la seva virulència
- Estudi del seu potencial per a la producció en massa
- Formulació de l'agent de biocontrol amb elements que incrementin la seva eficàcia
- Realització d'assaigs d'estabilitat i caducitat del producte
- Estudi de mercat potencial
- Avaluació dels costos del producte
- Realització d'anàlisis d'inversió
- Realització d'assaigs a nivell comercial
- Patentar l'agent de biocontrol
- Registre de l'agent de biocontrol
- Comercialització i venda del biopesticida als usuaris

2.1. Descobriment, identificació, assaigs d'eficàcia, toxicologia i patent de l'agent de biocontrol *C. sake*

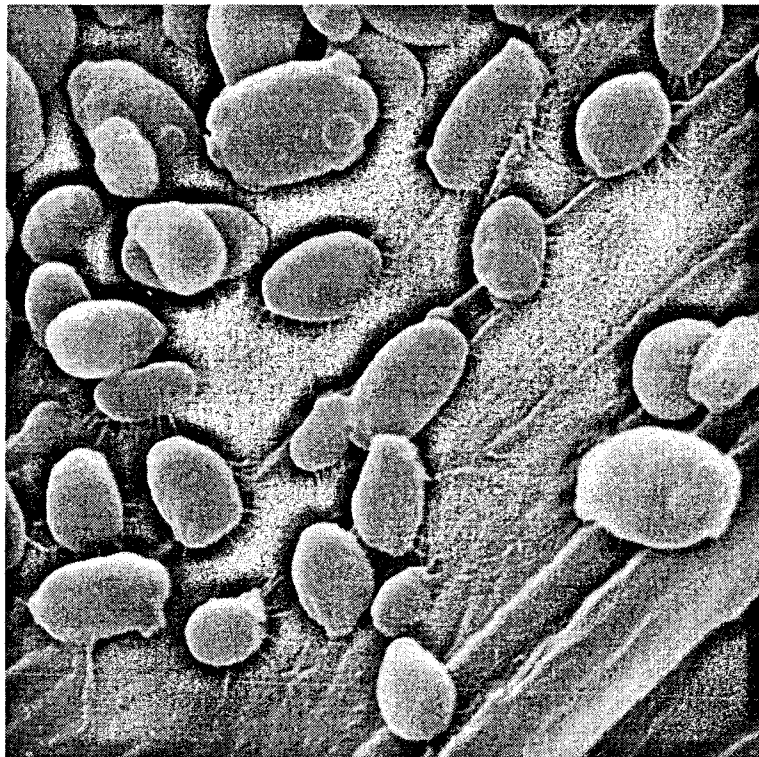
La soca CPA-1 del llevat *Candida sake* (Saito i Ota) van Uden i Buckley va ser aïllada de la superfície de pomes procedents de frigoconservació en el centre UdL-IRTA de Lleida. Aquesta soca presenta una efectivitat molt elevada com a antagonista de les principals floridures causants de podridura en postcollita de pomes i peres al nostre país: *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* i *Rhizopus nigricans* (Viñas i cols., 1998).

Aquesta soca va ser identificada pel "Centraalbureau voor Schimmelcultures" d'Holanda i es troba dipositada a la "Colección Española de Cultivos Tipo" (CECT-10817) de València. Està patentada a Espanya (Viñas i cols., 1997) i als EUA, Xile, Austràlia, Nova Zelanda i la República Sud-africana. Queda pendent l'extensió de la patent a 16 països més. L'empresa Sipcarn-Inagra en té els drets d'explotació.

En cultiu en placa, les seves colònies són de color blanc cremós, rodones, ben definides, amb vora llisa i una lleugera elevació central. Presenta pseudohifes en els cultius. Al microscopi de rastreig (Scanning Electronic Microscope, SEM) s'observa que les cèl·lules són el·líptiques o el·líptiques allargades i presenten reproducció vegetativa per gemació multilateral (Fotografia 1).

Aquesta espècie es pot trobar al sake, la cervesa, el vi, el suc de raïm i l'aigua, entre d'altres productes naturals (Barnett i cols., 1990). És important destacar que l'espècie *C. sake* no s'ha trobat associada a animals de sang calenta (Hurley i cols., 1987). A

més a més la ingestió de les dosis aplicades en el control biològic de l'esmentada soca no representen cap perill toxicològic per a l'ésser humà, ja que no pot desenvolupar-se a 37°C (temperatura corporal) i és ràpidament destruïda en contacte amb el suc gàstric simulat (Usall, 1995). La seva Dosi Letal 50 (DL₅₀) és superior a $1,7 \times 10^{10}$ ufc kg⁻¹, quan s'administra per via oral a rates Wistar. Els estudis toxicològics es van realitzar al "Centre d'Investigació i Desenvolupament Aplicat" (SAL) de Barcelona.



Fotografia 1. Vista general del llevat *C. sake* després de 24 h de creixement sobre pomes "Golden Delicious" ($\times 7500$, Microscopi Electrònic de Rastreig, SEM).

La seva efectivitat ha estat àmpliament demostrada a nivell de laboratori, tant a 20°C com en condicions de refrigeració (Usall, 1995; Viñas i cols., 1996, 1998). També és efectiva a nivell semi-comercial en condicions de refrigeració (Usall i cols., 2000a). A petita escala també s'ha demostrat la seva efectivitat contra *P. expansum* en pomes en refrigeració amb diferents condicions d'atmosfera controlada (Usall i cols., 2000a). Finalment cal destacar que durant tres campanyes s'han fet assajos en condicions comercials que han demostrat que *C. sake*, aplicada a una concentració de 10^7 ufc ml⁻¹, és igualment efectiva en el control de patògens de postcollita que el fungicida de síntesi

imazalil i més efectiva inclús que la barreja de tiabendazol i folpet a les dosis comercials (Usall i cols., 2000b). També s'ha assajat la seva efectivitat contra *P. expansum* en pomes mitjançant aplicacions en precollita (Teixidó i cols., 1998a, 1999). La fotografia 2 mostra l'aplicació de *C. sake* a nivell comercial mitjançant drenxer.



Fotografia 2. Assaig comercial d'efectivitat de *C. sake* en pomes "Golden Delicious". Esquerra: Aplicació en drenxer. Centre: Vista superior del drenxer. Dreta: Palots tractats.

2.2. Producció d'agents de biocontrol

La producció de la biomassa és el següent pas en el desenvolupament d'un agent de biocontrol. Per aquesta finalitat es poden utilitzar sistemes de fermentació líquida, semi-sòlida i sòlida (Lumsden i Lewis, 1989). No obstant, la fermentació líquida és la preferida (Churchill, 1982).

Un primer pas en la producció d'un agent de biocontrol és el desenvolupament d'un medi de cultiu adequat, utilitzant subproductes agrícoles barats, ràpidament disponibles i amb l'adient balanç nutricional (Latgé i Soper, 1977). Les melasses, el llevat de cerveseria, l'aigua de maceració de panís, i la farina de soja, entre altres, són materials acceptables (Lisansky, 1985).

Hi ha altres factors a considerar en la fermentació líquida, com ara la velocitat a la que es produeix la biomassa, ja que aquesta afecta el cost de producció així com també el risc de contaminacions (Lisansky, 1985). Així, és desitjable obtenir l'òptima quantitat de biomassa en el menor temps possible. Actualment, les melasses són la font de sucres

fermentables més barata i són les més utilitzades en la producció industrial del llevat de pastisseria i de cerveseria, *Saccharomyces cerevisiae* (Reed i Nagodawithana, 1991).

Quant a la producció del llevat *C. sake*, actualment s'estan duent a terme assajos en l'optimització de les condicions de fermentació en planta pilot. El medi de cultiu i les condicions de creixement a nivell laboratori estan ja definides. El medi està compost principalment per melassa de sucre de canya suplementada amb urea, degut a què la melassa és deficitària en nitrogen. En aquest medi és possible produir una gran quantitat de cèl·lules que són igualment efectives per al control de les principals malalties en fruita de llavor (Arévalo, 1998).

2.3. Formulació d'agents de biocontrol

Gairebé totes les matèries actives emprades en la protecció dels conreus es formulen abans de la seva comercialització. La formulació és necessària per poder obtenir una presentació adequada del producte i optimitzar la seva eficàcia, estabilitat, seguretat i maneig (Rhodes, 1993). Ja que aquest és un dels punts centrals de la tesi, se'n farà referència extensa més endavant.

2.4. Registre d'agents de biocontrol

Un cop obtinguda la patent de l'agent de biocontrol i la formulació adequada que compleixi amb els requisits desitjats s'ha de procedir al registre del producte. També es pot registrar el microorganisme com a matèria activa.

En el cas dels EUA, ja existeix una normativa específica de registre d'agents de biocontrol (biopesticides). L'Agència de Protecció Mediambiental dels EUA (EPA), va crear la "Biopesticides Pollution and Prevention Division" (BPPD) amb la finalitat d'accelerar el registre de biopesticides. Així, la BPPD va aprovar el registre de catorze nous biopesticides l'any 1995 i deu el 1996, representant un 35-40% del total dels nous pesticides registrats. La durada mitja per al registre d'un biopesticida és de 12 mesos vs. 36-45 mesos necessaris per a un pesticida químic convencional. A més a més, l'agència requereix moltes menys dades per un biopesticida ja que molts d'ells no presenten cap efecte advers ni pels humans ni pel medi ambient (Menn i Hall, 1999). D'entre els biopesticides registrats l'any 1995 cal destacar alguns productes biològics en el control de malalties de postcollita de fruita: el Bio-Save 10 i 11 (*Pseudomonas syringae* ESC-10 i ESC-11, EcoScience Corp., Worcester, MA) i l'Aspire (*Candida oleophila* I-182, Ecogen Inc., Langhorne, PA).

En canvi, al nostre país i a la resta de la UE, el registre representa un obstacle important per a la comercialització dels agents de biocontrol i la situació regulatòria està encara en un moment de canvi continu. No existeix una normativa específica pels

agents de biocontrol, i és la Directiva 91/414/CEE, la que cobreix els requeriments per ambdós, els pesticides químics i els biològics. La finalitat d'aquesta directiva és establir els procediments harmonitzats per l'autorització de productes per a la protecció de cultius dins la UE. En aquesta directiva es defineixen tots els assajos que s'han de dur a terme i totes les dades que s'han de facilitar, tant si és un biopesticida com a matèria activa o si és ja un producte formulat. El procés de registre pot durar 3-4 anys o més (Neale i Newton, 1999).

3. FORMULACIÓ D'AGENTS DE BIOCONTROL

3.1. Principis de formulació

La formulació és necessària per a presentar el producte en una forma utilitzable, i per a optimitzar l'eficàcia, estabilitat, seguretat i facilitat d'aplicació del producte (Rhodes, 1993). La matèria activa d'un pesticida biològic (biopesticida) és, generalment, el microorganisme en sí, excepte en el cas que sigui un antibiòtic o toxina que produeix durant la seva fermentació o quan s'associa amb el patògen o la planta hoste (Whitesides i cols., 1994). A més a més de la matèria activa, el dissolvent o el suport inert, les formulacions poden contenir un nombre d'adjuvants, definits com els compostos que ajuden o modifiquen l'acció de l'ingredient actiu (Foy, 1989). Els adjuvants compleixen tres funcions principals. Primer, poden ser utilitzats per optimitzar l'activitat de l'ingredient actiu. Segon, poden millorar les característiques del producte formulat durant la seva aplicació, per tal de distribuir i retenir l'ingredient actiu de la manera més eficient. I tercer, poden utilitzar-se per a mantenir l'estabilitat i la integritat física de la formulació durant el procés d'aplicació (Rhodes, 1993).

La principal diferència entre els productes químics i els agents de biocontrol és que, aquests últims són organismes vius, capaços de multiplicar-se en el medi ambient. Freqüentment, és necessari que es multipliquin després de la seva aplicació per tal de controlar la plaga, patògen o mala herba. L'agent de biocontrol ha de formular-se i mantindre's en forma activa o viable. Els agents de biocontrol són partícules discretes, ja siguin cèl·lules, espores, virus o estructures multicel·lulars. En general, la integritat d'aquestes estructures no pot ser alterada sense inactivar l'agent. La formulació ha de proveir les condicions que mantinguin la viabilitat durant la preparació, emmagatzematge i aplicació, i afavoreixin la supervivència de l'agent en el medi ambient, així com que recuperin ràpidament els seus processos metabòlics un cop s'ha aplicat (Rhodes, 1993). Per aconseguir això, es realitza algun tipus de deshidratació de l'agent, ja sigui mitjançant aire, atomització o liofilització. Això també afavoreix el maneig de l'agent de biocontrol pels canals normals de distribució i emmagatzematge.

L'exclusió de l'aigua ralenteix el metabolisme de les cèl·lules, preveu l'acumulació de productes tòxics i disminueix la desnaturalització de les proteïnes. Aquesta alternativa ha estat utilitzada amb èxit amb bacteris, virus i fongs. Desafortunadament, no tots els microorganismes s'han mostrat susceptibles a ser assecats i molts tendeixen a perdre la viabilitat durant el procés d'assecat i d'emmagatzematge (Kirsop i Doyle, 1991; Lapage i Redway, 1974).

Mantenir la viabilitat dels agents de biocontrol presenta un gran nombre de problemes tècnics, ja que els microorganismes i proteïnes, especialment quan no tenen estructures especialitzades de repòs, s'inactiven o moren fàcilment en condicions mediambientals desfavorables (Kirsop i Doyle, 1991). Això pot passar durant el procés de formulació, si el microorganisme s'exposa a la calor, compostos tòxics, dessecació incontrolada, o prematura germinació en presència d'humitat. Per tant, el procés de formulació ha de ser dissenyat amb molta cura segons les necessitats i limitacions de cada organisme (Rhodes, 1993).

Una alternativa a la deshidratació és la suspensió en olis, amb la finalitat d'excloure l'oxigen de l'organisme, prevenint així la respiració. Un exemple d'aquest sistema seria el Dipel ESNT, un insecticida formulat de *Bacillus turingensis* subspp. *kurstaki*, en el qual l'ingredient actiu està encapsulat i després suspès en una base oliosa (Butt i cols., 1999).

Finalment, la formulació de l'agent de biocontrol ha d'estar composta de substàncies inofensives. Una de les principals característiques dels agents de biocontrol és el seu benefici en el respecte del medi ambient, dels enemics naturals, dels consumidors i dels usuaris. Aquests beneficis serien eliminats si s'afegeixen components tòxics en la formulació (Butt i cols., 1999).

3.2. Emmagatzematge i distribució

Un altre problema, encara més difícil, és la necessitat de mantenir la viabilitat o activitat durant l'emmagatzematge o conservació i distribució, ja que els productes s'haurien de poder emmagatzemar durant períodes entre dos i quatre anys, i les condicions d'emmagatzematge estan habitualment fora del control del productor. En algunes ocasions és possible estipular que el producte s'hagi de refrigerar i utilitzar durant un període restringit, o encarregar-lo amb antelació i utilitzar-lo immediatament un cop lliurat. No obstant, aquestes restriccions s'accepten només quan el producte s'utilitza en poca quantitat o quan té alguna propietat única que justifica la inconveniència i les despeses per part del distribuïdor i usuari (Rhodes, 1993). El distribuïdor també espera que el producte envasat tingui el tamany i la forma estàndard (Butt i cols., 1999).

Les formulacions d'organismes vius pateixen degradacions significants en el temps. Aquest problema s'agreuja quan són fongs o bacteris no formadors d'espores. La situació és una mica més fàcil quan el microorganisme forma espores. Les estructures de repòs estan dissenyades per a retenir l'aigua, ser resistents i sobreviure de forma viable inclús quan les condicions són adverses. Aquests tipus de microorganismes són més fàcilment formulables i els productes líquids, com per exemple suspensions concentrades, són molt factibles (Butt i cols., 1999).

3.3. Aplicació

És igualment important que el tipus de formulació i el material d'embalatge siguin similars a aquells amb què el productor està acostumat. Els productes s'han de poder aplicar mitjançant les tècniques i equipaments ja existents. És poc probable que el productor inverteixi en una nova màquina només per a tractar amb un agent de biocontrol. D'altra banda, el productor vol comprar l'agent de biocontrol a través del mateix canal de distribució que els agroquímics (Butt i cols., 1999).

3.4. Tipus de formulacions

Les formulacions de biopesticides poden ser líquides o sòlides. Aquestes varien des del fresc comprimit conservat a 4°C i utilitzat ràpidament fins a sofisticades preparacions liofilitzades i conservades en atmosferes de nitrogen (Powell, 1992).

3.4.1. Formulacions líquides

Inclouen aquelles que són de base oliosa, base aquosa, base polimèrica o les seves combinacions.

Formulacions en base oliosa. Suposen normalment la barreja d'un cultiu processat amb un oli mineral o un oli de base vegetal i emulsificants per afavorir la seva dissolució en aigua. Les formulacions de base oliosa redueixen l'evaporació de les gotes i permeten una aplicació aèria de producte micronitzat (Boyetchko i cols., 1999).

Formulacions en base aquosa. Necessiten de pocs passos per a la seva consecució: fermentació de l'organisme en un medi líquid i addició de components, com per exemple, estabilitzants, adherents, surfactants, colorants, compostos anticongelants o altres nutrients addicionals (Boyetchko, 1996; Bryant, 1994; Fages, 1992; Harman i cols., 1991).

No obstant, la major part d'aquestes formulacions líquides necessiten ser emmagatzemades i distribuïdes a temperatures de refrigeració i tenen una vida comercial bastant curta.

3.4.2. Formulacions sòlides

La majoria de formulacions que proporcionen una llarga vida útil requereixen mantenir les cèl·lules en estat sec. L'assecat es pot aconseguir mitjançant un gran nombre de mitjans, entre els quals tenim la liofilització (Kirsop i Doyle, 1991), assecat amb gel de sílice (Blachère i cols., 1973; Kirsop i Doyle, 1991), l'atomització (Dulmage i cols., 1990) i l'assecat amb aire amb o sense l'ús d'un llit fluïditzat (Boyetchko i cols., 1999). Degut a la importància de la deshidratació com a part del procés de formulació, se'n parlarà detingudament més endavant. La capacitat de sobreviure a la dessecació i conservació en l'estat sec varien molt segons l'organisme (Lapage i Redway, 1974), però en alguns casos, les formulacions seques romanen estables durant un període d'alguns anys. Aquestes formulacions seques es poden trobar, entre altres, en forma de pols mullable, partícules deshidratades fluïditzables i granulats, incloent granulats mullables. Els granulats mullables i secs es produeixen mitjançant l'addició de lligants, dispersants, agents mullants i aigua al microorganisme sec en pols en un granulador. Tot i que les formulacions sòlides requereixen de més passos en el seu processat, cosa que incrementa les despeses de manufactura, es redueixen les despeses de transport degut a la reducció de pes (Boyetchko i cols, 1999).

La gran majoria de formulacions seques inclouen un material de suport, com poden ser argila, torba, vermiculita, alginats o boletes de poliacrilamida. Entre tots els components que formen la formulació, el material de suport ocupa el volum més gran. Per tant, aquests han de ser barats, fàcilment esterilitzables, no tòxics i amb característiques físiques consistents (Boyetchko i cols, 1999). Alguns materials afegits a les formulacions de bacteris són la terra de diatomees, talc i vermiculita i altres polímers, com la goma xantà (Digat, 1989).

S'han estudiat tècniques per a l'encapsulació d'agents de biocontrol en poliacrilamida i alginat sòdic (Digat, 1989; Fravel i cols., 1985; Glass, 1993; Jha i cols., 1993 ; Knudsen i cols, 1991; Lewis, 1991; Lewis i Papavizas, 1985, 1987; Papavizas i cols., 1987). No obstant, la lenta hidratació i alliberament de la matèria activa són els principals impediments d'aquesta tecnologia. En canvi, la utilització de l'encapsulació en alginat com a mètode de formulació granular de *Gliocladium virens* (Soil Gard) s'ha desenvolupat amb èxit, així com també les formulacions en pols que contenen *Trichoderma* amb pirofil·lita (Pyrax) (Lumsden i cols., 1995).

S'ha intentat utilitzar les propietats de dessecació-protecció de polisacàrids com ara la metilcel·lulosa i la goma xantà en la conservació de cultius i formulació de cèl·lules microbianes. Malauradament, aquestes formulacions solen perdre viabilitat durant l'emmagatzematge (Klopper i Schroth, 1981; Suslow i Schroth, 1981). Quimby i cols. (1999) han estudiat un mètode simple de granulació dels fongs

Colletotrichum gloeosporioides i *Fusarium oxysporum*. El mètode, que s'anomena "Stabilaze" consisteix en la barreja d'una suspensió de les espores amb midó, sacarosa, oli de panís i sílica. Una matriu de gluten de blat (inòcul líquid, farina de blat i caolí) s'ha utilitzat per formular els agents fúngics *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria crassa* i *Fusarium lateritium*. Aquesta formulació s'anomena "Pesta", i s'aplica directament al sòl. La vida útil del producte es pot variar manipulant el contingut de sacarosa i d'humitat del grànul (Connick i cols., 1991, 1996).

L'adsorció de cèl·lules en torba és una tècnica utilitzada habitualment per a la formulació d'inòculs de *Rhizobium* així com també d'agents de biocontrol com *Pseudomonas fluorescens* (McIntyre i Press, 1991). La funció de la torba és tant de dispersant com de medi de protecció dels organismes. S'ha demostrat que aquesta tècnica no té èxit degut a que la torba no és un material homogeni i la vida útil de la torba no estèril és molt limitada.

Per a simplificar la producció i el procés de formulació, s'ha estudiat la fermentació dels microorganismes en un substrat sòlid, que més tard funciona com a matèria inert. El substrat i l'organisme s'apliquen conjuntament al camp. Alguns exemples inclouen la fermentació dels microorganismes en vermiculita o terra de diatomees (Backman i Rodriguez-Kabana, 1974; Paa i cols., 1991). El material pot ser aplicat directament al sòl, extrusionat en grànuls o suspès en aigua per alliberar les cèl·lules, que són aplicades per al control biològic de patògens del sòl. Riba (1984, 1985) ha desenvolupat una tècnica similar per a la producció de fongs per al control biològic d'insectes: *Beauveria bassiana* es fa créixer en uns microgrànuls d'argila impregnats de nutrients que s'apliquen directament als verticils del blat de moro per a controlar el barrinador del blat de moro.

S'ha desenvolupat una formulació liofilitzada seca del bacteri *Enterobacter agglomerans* E8 per al control de la podridura d'arrels en pomeres que presenta la mateixa efectivitat que les cèl·lules fresques (Utkhede i Smith, 1997).

3.5. Agents de biocontrol comercials

Tot i que ja fa temps que s'està investigant sobre el tema del control biològic, encara és força nou de cara a la patentabilitat, registre i comercialització. En la Taula 2 estan descrits alguns exemples d'agents de biocontrol formulats, registrats i disponibles comercialment.

Taula 2. Exemples d'alguns agents de biocontrol formulats i disponibles en el mercat.

Producte	Agent de biocontrol	Patògen o Malaltia	Cultiu	Tipus formulació	Distribuidor	Registral a*
AQ10	<i>Ampelomyces quisqualis</i> M-10	Oïdi	Poma, maduixa, cucurbitàcies, raïm, ornamentals, tomata	Grànuls dispersables en aigua	Ecogen	EUA
Aspire™	<i>Candida oleophila</i> 1-182	<i>Botrytis</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Postcollita de cítrics, poma i pera	Pols mullable	Ecogen	EUA, Israel
Blight Ban A506™	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Ametlla, poma albercoc, cirera, préssec, pera, patata, maduixa, tomata	Pols mullable	Plant Health Technologies	EUA
Bio-Save 100, Bio-Save 1000	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor pyriformis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Postcollita de poma i pera (Bio-Save 100) i de cítrics (Bio-Save 1000)	Pellets congelats de cèl·lules concentrades	EcoScience Corp.	EUA
Bio-Save 110	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-11	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor pyriformis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Postcollita de poma i pera	Pellets congelats de cèl·lules concentrades	EcoScience Corp.	EUA
Companion	<i>Bacillus subtilis</i> GB03	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>	Hortícoles i gespa	Líquida	Growth Products	EUP de l'EPA a EUA*
Conquer	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaassii</i>	Xampinyó	Líquida	Mauri Foods	EUA, Austràlia
Epic	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.	Cotó, llegums	Pols sec	Gustafson	
Trichodex	<i>Trichoderma harzianum</i>	Principalmnt <i>Botrytis cinerea</i>	Cogombre, raïm, nectarina, maduixa, girasol, tomata	Pols mullable	Makhteshim Chemical Works	Israel

*(EUP): Experimental Use Permit
Font: <http://www.barc.usda.gov/psi/bpd/bpdprod/bioprod.html>, última actualització Maig 2000.
* Registral a: <http://www.attra.org/attra-pub/ipm.html>.

3.5.1. Productes biològics comercials per a postcollita de pomes, peres i cítrics

L'any 1995, l'EPA va registrar els primers productes biològics contra malalties de postcollita de pomes, peres i cítrics, l'Aspire i el Bio-Save 10 i 11.

L'Aspire (actualment anomenat Decco I-182) és un biofungicida que té com a matèria activa el llevat *Candida oleophila* I-182. És efectiu per al control de *Penicillium digitatum* (podridura verda) i *Penicillium italicum* (podridura blava) en cítrics. Es presenta com a pols mullable del qual un 55% és llevat deshidratat i un 45% de matèria inert, amb un contingut $>2 \times 10^{10}$ ufc g⁻¹. Està envasat al buit i es conserva al menys durant 400 dies en refrigeració (1-4°C) i/o 20 dies a temperatura ambient (25-30°C).

El Bio-Save 10 i 11 són formulacions en forma de pols mullable del bacteri *Pseudomonas syringae* ESC-10 i ESC-11, respectivament, que han estat substituïdes per les noves formulacions Bio-Save 100 i 1000 (ESC-10) i Bio-Save 110 (ESC-11) l'any 1996. El Bio-Save 100 és efectiu per al control de *P. expansum* (podridura blava), *B. cinerea* (podridura gris) i *Mucor pyriformis* en pomes i peres. El Bio-Save 110, a més a més, controla també les podridures causades per *Fusarium sambucinum* i per *Helminthosporium solanum* en patates. El Bio-Save 1000 és efectiu contra *P. italicum* i *P. digitatum* i *Geotrichum candidum* en cítrics i contra *P. expansum* i *B. cinerea* en cireres. Tots tres productes estan formulats com a suspensions concentrades congelades, on un 83% és la matèria activa (el bacteri) i l'altre 17% són matèries inerts. El producte conté un mínim de 9×10^{10} ufc g⁻¹ de producte i s'ha de conservar en congelació (-70°C o amb gel sec). A més a més, la suspensió del bacteri s'ha de fer com a mínim 10 min abans de la seva aplicació.

Actualment, l'empresa EcoScience, en col·laboració amb universitats, l'USDA i empreses de conservació de fruita, estan en procés de desenvolupament de la formulació de l'agent de biocontrol *Cryptococcus laurentii*, descobert per Roberts (1990a), anomenada Bio-Save 150 (Stack, 1998).

També es troba en el mercat un altre llevat formulat en forma seca, el *Cryptococcus albidus*. El producte s'anomena YieldPlus, i està produït per Anchor Bio-Technologies (Cape Town, South Africa). El producte està registrat a Sudàfrica i s'aplica en postcollita de fruita de llavor (De Kock i cols., 1998).

4. DESHIDRATACIÓ DE LLEVATS

Com ja hem vist, la majoria de formulacions que proporcionen una llarga vida útil al producte requereixen mantenir les cèl·lules en estat sec. Pel que fa als llevats, la seva

deshidratació es pot aconseguir mitjançant un gran nombre de mitjans, entre els quals tenim la liofilització, l'atomització i el llit fluïditzat, entre d'altres.

4.1. Tècniques de deshidratació

4.1.1. Liofilització

Alguns materials biològics que no poden ser assecats convencionalment amb aire es poden liofilitzar. La substància a ser assecada es congela, i l'aigua s'elimina en forma de vapor mitjançant la seva sublimació en una cambra al buit (Liapis, 1987). La liofilització s'utilitza àmpliament per a deshidratar microorganismes al laboratori i a nivell comercial i, degut al ràpid desenvolupament de les bioindústries, també s'ha convertit en un mètode estàndard per l'estabilització de proteïnes i preparacions terapèutiques (Aguilera i Karel, 1997).

La liofilització està descrita com el mètode més convenient i de més èxit per a conservar bacteris, llevats i fongs filamentosos (Beryny i Hennebert, 1991). Els avantatges de la liofilització són: llarga viabilitat, protecció enfront la contaminació durant l'emmagatzematge i facilitat de distribució de les soques (Smith i Onions, 1983). No obstant, no totes les soques sobreviuen durant el procés i s'han trobat viabilitats <0,1% (Beryny i Hennebert, 1991; Smith i Onions, 1983).

4.1.2. Atomització

El procés d'atomització transforma un líquid bombejable en un producte sec en una sola operació. El líquid passa a través d'un atomitzador d'agulla o bé centrífug, i les petites gotes atomitzades entren ràpidament en contacte amb un flux d'aire calent. L'evaporació és molt ràpida, degut a la gran superfície d'evaporació de les gotes i aquestes es mantenen a una temperatura més baixa que l'aire. El temps d'assecat de les gotes atomitzades és molt petit en comparació amb la majoria de processos d'assecat. La baixa temperatura del producte, juntament amb el curt temps d'assecat, permeten la deshidratació de productes sensibles a la calor (Filková i Mujumdar, 1987).

Tot i que l'atomització és un mètode altament productiu i econòmic, i que s'utilitza àmpliament en la indústria per a l'obtenció de llet, cafè, te i altres productes alimentaris en pols, l'aplicació de l'atomització per a cèl·lules de llevat és limitada, ja que la viabilitat del producte sec és molt baixa (Reed i Nagodawithana, 1991).

4.1.3. Assecadors de cinta i túnel

Els assecadors de cinta i túnel són generalment utilitzats per a la producció de llevat sec actiu (Active Dry Yeast, ADY, 7,5-8,5% humitat). El llevat premssat s'extrusiona

en fils de 0,2-2,0 mm de diàmetre, que es tallen a una llargada de 1-2 cm. Aquests fils extrusionats es dipositen sobre una malla i una banda contínua transporta la capa de llevat extrusionat a través de tres a sis cambres d'assecat. L'aire passa alternativament de dalt a baix i de baix a dalt per la capa de llevat, a una temperatura entre 28-42°C durant 2-4 h (Reed i Nagodawithana, 1991).

4.1.4. Llit fluïditzat

Els assecadors de llit fluïditzat són els preferits per a la producció de llevat instantani (Instant Active Dry Yeast, IADY, 4,0-6,0% humitat). El procés es pot realitzar per lots o de forma contínua. El llevat s'extrusiona en forma de tires de 0,2-0,5 mm de diàmetre, que es dipositen en una safata de metall perforada de l'assecador. L'aire s'injecta per sota a través de la capa de llevat a velocitats que fan que les partícules de llevat es suspenguin. Generalment, els llits fluïditzats operen durant menys temps que els assecadors de cinta i túnel perquè permeten partícules de llevat més finament granulades (Reed i Nagodawithana, 1991). Langejan (1972) va utilitzar un corrent d'aire a 100-150°C al començament del procés d'assecat. D'aquesta manera, el temps del procés va ser de 10-30 min i la temperatura de les partícules de llevat es va mantenir entre 25-42°C.

4.2. Danys que sofreixen les cèl·lules durant un procés de deshidratació-rehidratació

La biomassa microbiana conté un 70-90% d'aigua. Els biopolímers i les membranes estan dispersos en un medi aquós, i la vida només té lloc en la presència d'aigua. L'aigua és un component estructural d'ambdós, biopolímers i membranes biològiques. A més a més, l'aigua com a substància està directament involucrada en nombroses reaccions bioquímiques. Una part d'aquesta aigua es troba lligada, combinada directament amb proteïnes, àcids nucleics, membranes i altres substàncies i és responsable de mantenir la seva organització estructural. La biomassa de llevat conté entre un 15-20% d'aigua lligada, les membranes biològiques un 25%, aproximadament.

Durant l'assecat, en primer lloc s'evapora l'aigua lliure, a una velocitat més o menys constant. Quan l'aigua lligada es comença a evaporar, la velocitat d'assecat decreix. En el llevat *S. cerevisiae* això té lloc aproximadament quan la massa microbiana té un 20% d'humitat (Beker i Rapoport, 1987). És en aquest punt on el comportament fisiològic de les cèl·lules canvia dràsticament. A nivells d'humitat per sota del 20% la respiració cel·lular s'atura. En l'interval entre el 10-20% d'humitat, l'aigua juntament amb les substàncies dissoltes forma un gel que ja no pot actuar més com a medi per a què tinguin lloc les reaccions bioquímiques. Una disminució més gran de la humitat

comporta una translocació d'aigua a les cèl·lules en forma de vapor i canvia els paràmetres físics del llevat en aspectes bastant essencials.

4.2.1. Canvis morfològics

L'interior de la cèl·lula, es veu reduït de tamany degut a la deshidratació, es deforma i s'encongeix. Les cèl·lules microbianes poden sobreviure tot i l'extracció d'aigua si la contracció interior de la cèl·lula arrossega la membrana i la paret cel·lular cap al centre i fa que es dobleguin. Només la ruptura de la paret cel·lular i el protoplast té conseqüències letals (Josic, 1982).

4.2.2. Canvis en la pressió osmòtica

La pressió osmòtica de la cèl·lula augmenta ràpidament a baix contingut d'humitat. Una creixent pèrdua d'aigua implica la formació d'una barrera osmòtica (Josic, 1982). La resistència de la paret cel·lular té valors negatius que s'incrementen a causa de la pressió osmòtica de la cèl·lula.

4.2.3. Lesions en les membranes

Durant la deshidratació de les cèl·lules, arriba un moment en el que la membrana canvia la seva estructura degut a transicions de líquid a gel-cristal·lí que tenen lloc durant el procés de deshidratació. És conegut que els sistemes de la membrana model perden la seva funció de barrera quan s'indueix una fase gel (Ladbrooke i Chapman, 1969).

La conservació de la membrana cel·lular és de crítica importància per a la producció de massa microbiana seca i activa. Alguns dels canvis que deterioren la cèl·lula viva, com podrien ser el pardejament enzimàtic, proteòlisi i similars, no tenen lloc per l'única raó que substrat i enzims estan localitzats en diferents compartiments cel·lulars, separats entre ells per les membranes cel·lulars. Només quan les membranes perden parcial o totalment les seves funcions és quan s'estableix el contacte entre enzims i substrats. Anàlogament, el desenvolupament o alliberament de substàncies perjudicials apareix només com a conseqüència de membranes danyades (Josic, 1982).

4.2.4. Canvis bioquímics

Entre alguns dels molts canvis bioquímics que sofreixen les cèl·lules durant el procés de deshidratació podem destacar:

- Decreixement de la quantitat de fosfolípids (Harrison i Trevelyan, 1963; Zikmanis i cols., 1983)

- Alteració del grau de saturació dels àcids grassos, la qual cosa també pot danyar les cèl·lules (Zikmanis i cols., 1980)
- Reaccions de peroxidació, que poden portar a la destrucció dels lípids de la membrana (Bewley, 1979)

Ja hem vist que el procés de deshidratació pot produir invaginacions i pot causar la ruptura d'alguna de les seves parts, perdent la funció de barrera. Llavors, durant la rehidratació l'aigua entra a les cèl·lules bruscament fins que s'equilibra la pressió osmòtica. Al mateix temps, la cèl·lula perd substàncies de baix pes molecular (electròlits, carbohidrats, aminoàcids i nucleòtids) a través de la membrana citoplasmàtica que encara no ha recuperat la seva funció de membrana semipermeable (Josic, 1982).

4.3. Factors que afecten a la viabilitat de les cèl·lules durant un procés de deshidratació

4.3.1. Congelació

En el cas particular de la liofilització, la velocitat de refredament de les cèl·lules és un factor crític. Com va demostrar Mazur (1977), la velocitat òptima de congelació és aquella que resulta de dos efectes oposats: quan la velocitat és més baixa que l'òptima, la concentració dels soluts intra- i extracel·lulars és la responsable dels danys, mentre que la formació de gel en l'interior de la cèl·lula és la responsable dels danys cel·lulars quan la velocitat de refredament és més ràpida que l'òptima.

Si la velocitat de refredament és més lenta que l'òptima, l'aigua es va congelant fora de la solució. Degut a la concentració progressiva de soluts extracel·lulars, l'aigua intracel·lular surt cap a l'exterior, augmentant la pressió osmòtica de la cèl·lula. Això comporta que la cèl·lula estigui exposada a elevades concentracions d'electròlits durant llargs períodes de temps, excessiva deshidratació i/o efectes mecànics de la formació de gel extracel·lular. Quan la velocitat de congelació és més ràpida que l'òptima, la cèl·lula no és capaç de perdre l'aigua de manera suficientment ràpida per mantenir el potencial osmòtic intracel·lular en equilibri amb l'extracel·lular. La solució intracel·lular esdevé més i més sobrefredada, resultant finalment, en la formació intracel·lular de nuclis de gel que poden produir danys letals (Berny i Hennebert, 1991; Meryman, 1974).

4.3.2. Medi de cultiu

Les condicions de cultiu influeixen de manera notable en la resistència dels microorganismes a la deshidratació. Està demostrat que s'obté llevat sec amb alta

viabilitat quan s'utilitza com a medi de creixement melassa concentrada amb un contingut de nitrogen limitat (Beker i Rapoport, 1987; Harrison i Trevelyan, 1963). També cal destacar que les cèl·lules en la fase de creixement exponencial són més làbils/sensibles a la deshidratació que aquelles que estan en fase estacionària (Beker i Rapoport, 1987).

Mitjançant l'enriquiment del medi de cultiu sintètic, és possible incrementar l'estabilitat dels llevats durant la deshidratació. Algunes vitamines (principalment la biotina), l'àcid oleic, l'àcid glutàmic, asparagínic i el glutatió estan referenciades com a substàncies que, afegides al medi, incrementen la resistència de *S. cerevisiae* (Beker i Rapoport, 1987).

La resistència dels llevats a la deshidratació també es pot veure incrementada mitjançant l'augment del contingut intracel·lular de trealosa. En cèl·lules de *S. cerevisiae*, el contingut de trealosa augmenta incrementant la temperatura i disminuint l'airejació al final de la fase de creixement. A més a més, el contingut de trealosa en *S. cerevisiae* pot incrementar-se fins al 15-16% amb l'augment de la pressió osmòtica o mitjançant un període d'inanició de 2-3 h abans del final de la fase de creixement (Beker i Rapoport, 1987).

4.3.3. Substàncies protectores

Com ja s'ha esmentat anteriorment, no totes les soques poden sobreviure a un procés de deshidratació. En el cas de la deshidratació mitjançant la liofilització, una gran quantitat de substàncies com per exemple polímers, sucres, albúmina, llet, mel, poliols i aminoàcids s'han testat pel seu efecte protector (Font de Valdez i cols., 1983a; Malik, 1976; Meryman i cols., 1977; Morris i Farrant, 1972; Pedersen, 1965). Aquestes substàncies s'afegeixen a la suspensió del microorganisme abans de la seva liofilització. S'ha demostrat que els components d'aquest medi de suspensió tenen dos funcions principals en l'obtenció de cèl·lules liofilitzades viables. La primera és donar al residu sec una estructura física, que actua com a material de suport. La segona és protegir les cèl·lules davant els danys bioquímics que es produeixen a les cèl·lules durant la liofilització i/o deshidratació (Berny i Hennebert, 1991).

La llet s'ha utilitzat àmpliament com a substància protectora durant el procés de liofilització de llevats (Berny i Hennebert, 1991), de bacteris làctics (El-Sadek i cols., 1975; Font de Valdez i cols., 1983a, 1985a, b; Kilara i cols., 1976) i de floridures (Berny i Hennebert, 1991). Entre els sucres utilitzats com a protectors, destaca la trealosa. Es creu que aquest disacàrid estabilitza les membranes biològiques durant la deshidratació perquè es lliga mitjançant ponts d'hidrogen a la membrana fosfolípida, substituint l'aigua que es va perdre durant la deshidratació (Crowe i cols., 1984).

Altres substàncies utilitzades satisfactòriament han estat, entre altres, la lactosa (Kilara i cols., 1976), la sacarosa (Nikolova, 1978), l'adonitol (Font de Valdez i cols., 1983*b*), el manitol (Efiuvwevwere i cols., 1999) i el glutamat sòdic (Font de Valdez i cols., 1983*b*; Kilara i cols., 1976). L'efecte protector de la llet s'ha augmentat en alguns estudis mitjançant la seva combinació amb algunes d'aquestes substàncies (Berny i Hennebert, 1981; Font de Valdez i cols., 1983*a*; Smith i Onions, 1983).

Certes substàncies protectores també s'han afegit en processos d'atomització, com per exemple, llet condensada al 30% per a protegir cèl·lules de *Brevibacterium linens* (To i Etzel, 1997*a*). Una solució de maltodextrines i lactosa també s'han utilitzat per a protegir bacteris acidolàctics enfront la congelació, liofilització o atomització (To i Etzel, 1997*b*). Solucions de glicerina i sacarosa també s'han emprat per a la protecció de l'agent biològic *Pseudomonas cepacia* B5 enfront la deshidratació (Aoki i cols., 1993).

4.3.4. Condicions de rehidratació

S'ha demostrat que la osmolalitat del medi de rehidratació (Choate i Alexander, 1967; Font de Valdez i cols., 1985*a, b*; Ray i cols., 1971), la temperatura del medi (Morichi i cols., 1967) i la velocitat i el volum utilitzat (Font de Valdez i cols., 1985*a, b*) tenen una gran importància en la recuperació de bacteris liofilitzats.

Quan es reactiva una població microbiana després d'un període d'anabiosi, es poden distingir tres processos (Beker i Rapoport, 1987):

- Humitejament de la mostra (rehidratació)
- Reparació de les estructures i macromolècules danyades i resíntesi d'una gran varietat de compostos per a substituir aquells degradats durant el procés (reactivació)
- Restabliment de la població inicial mitjançant la multiplicació de les cèl·lules viables (creixement i multiplicació cel·lular)

La rehidratació és un procés purament físic. S'aconsella començar la rehidratació de les cèl·lules seques de forma gradual, en atmosfera saturada amb vapor d'aigua. La temperatura del medi de rehidratació també és important. Les pèrdues de components intracel·lulars disminueixen si la rehidratació es duu a terme a temperatures altes. En el cas de *S. cerevisiae*, es poden disminuir les pèrdues de components intracel·lulars si la seva rehidratació es fa a temperatures entre 35 i 45°C (Beker i Rapoport, 1987).

El medi de rehidratació i la seva molaritat també són factors importants (Ray i cols., 1971). L'aigua no és un bon medi de rehidratació (Champagne i cols., 1991). Sinha i cols. (1982) van demostrar que la sacarosa, dextrosa, la llet i la peptona, utilitzades al

10%, van resultar els millors medis de rehidratació per a estreptococs. També s'han utilitzat medis de rehidratació més complexos, com una solució que conté una combinació de peptona, extracte de llevat, triptona, glucosa, Tween 80 i àcid fòrmic per a la rehidratació d'estreptococs i *Leuconostoc* spp. (Font de Valdez i cols., 1985a).

La duració de la reactivació depèn del caràcter i nivell dels danys intracel·lulars. Els processos que tenen lloc durant la reactivació són els següents (Beker i Rapoport, 1987):

- Biosíntesi de noves molècules (macromolècules incloses) enlloc de les danyades
- Recuperació de la funció de les estructures danyades amb l'ajuda de mecanismes de reserva
- Destrucció i aïllament de les estructures parcialment danyades
- Reparació de les estructures reversiblement danyades

5. FORMULACIÓ LÍQUIDA

La formulació líquida dels agents de biocontrol és una alternativa a la formulació sòlida quan aquests són sensibles a la deshidratació. Com ja s'ha vist anteriorment, les formulacions líquides d'agents de biocontrol no són tan utilitzades com les sòlides, ja que són menys estables. Existeixen molt poques publicacions al respecte. Es poden preparar en base aquosa o en base oliosa. Per introduir el tipus de formulació líquida que es va estudiar en aquesta tesi, cal definir primer alguns aspectes ecofisiològics de les cèl·lules que es troben en suspensions líquides.

5.1. Potencial hídric de les cèl·lules

El potencial hídric (ψ) és un paràmetre fonamental àmpliament acceptat per a quantificar l'estat d'energia de l'aigua en solucions orgàniques. El potencial hídric es pot expressar en termes d'activitat aigua (a_w) tal i com es presenta en la següent equació:

$$\psi = \frac{R T \ln(a_w)}{\bar{V}_w}$$

On R és la constant dels gasos ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T la temperatura (K) i \bar{V}_w és la mitjana del volum parcial de l'aigua ($\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$).

Aquesta equació, a 20°C equival a (Blomberg i Adler, 1992):

$$\psi = 135 \ln (a_w)$$

El potencial hídric d'una cèl·lula (ψ_c) és la suma del potencial osmòtic del citoplasma (ψ_s) i la pressió de turgència (ψ_t) (Blomberg i Adler, 1992). Aquesta pressió de turgència depèn de la naturalesa de la paret cel·lular i és més important per a espècies osmotolerants (Levin, 1979). El potencial hídric de les cèl·lules gairebé és igual al del medi que l'envolta (ψ_m). Aquesta diferència entre el ψ_c i el ψ_m és el que permet el flux d'aigua cap a l'interior de les cèl·lules (Jennings, 1995; Papendick i Mulla, 1986). Quan les cèl·lules es sotmeten a un canvi hídric, s'ha de restablir aquest equilibri. Així, s'observen dos mecanismes de resposta: passiva i activa.

La resposta termodinàmica passiva es caracteritza per un flux d'aigua i soluts a través de la membrana cel·lular. El flux d'aigua està directament relacionat amb el gradient de potencial hídric entre la cèl·lula i el medi exterior. Si es tracta d'un xoc hiperosmòtic, hi ha una sortida d'aigua de la cèl·lula a l'exterior, les cèl·lules s'encongeixen i finalment poden sofrir plasmòlisi i morir (Gervais i Marechal, 1994). Si és un xoc hipoosmòtic, hi ha una entrada d'aigua cap a la cèl·lula, que s'expandeix i pot arribar a trencar-se (Atlas i Bartha, 1998).

La resposta biològica activa és deguda al sistema d'osmoregulació activa de la cèl·lula (Brown i Edgley, 1980). Aquest metabolisme correspon a la síntesi de soluts, glicerol (Edgley i Brown, 1983), arabitol (Yancey i cols., 1982), i finalment a una ràpida modificació de les propietats de permeabilitat de la membrana (Watanabe i Takakuwa, 1987). Aquest sistema permet que la cèl·lula recuperi el seu volum intern només si la resposta termodinàmica no ha provocat danys irreversibles. L'osmoregulació té lloc més a poc a poc (minuts o hores) que la resposta passiva (Niedermeyer i cols., 1977; Zimmermann, 1978).

5.2. Els soluts compatibles: Polihidroxialcohols

Com ja hem vist, quan les cèl·lules són sotmeses a un estrès hiperosmòtic, molts microorganismes acumulen intracel·lularment compostos de baix pes molecular (Van Eck i cols., 1993). Els principals soluts acumulats en llevats són els polihidroxialcohols (poliols) com el glicerol, D-arabitol, D-manitol i meso-eritritol (Spencer i Spencer, 1978). Aquests soluts són compatibles amb l'activitat metabòlica de les cèl·lules i és per això que es coneixen amb el nom de soluts compatibles (Brown, 1978). També s'ha demostrat que altes concentracions de soluts compatibles fan possible que els sistemes enzimàtics funcionin sota condicions d'estrès hídric i de vegades fins i tot d'estrès de temperatura (Brown, 1978).

El nombre de molècules que poden actuar com a soluts compatibles és relativament reduït i són els mateixos per a tipus de microorganismes filogenèticament molt separats i diferents (Yancey i cols., 1982). La concentració intracel·lular de glicerol, aràbitol i manitol incrementen significativament en llevats com *Pichia sorbitophila*, *Candida cacaui*, *Candida magnoliae* i *Zygosaccharomyces bisporus* sotmesos a un estrès osmòtic (Van Eck i cols., 1993). *Zygosaccharomyces rouxii* (Brown, 1978; Edgley i Brown, 1978) i *Hansenula anomala* (Van Eck i cols., 1989) també acumulen glicerol quan creixen a a_w reduïdes. La sacarosa, la glucosa i el sorbitol són acumulats quan estan presents en el medi (Corry, 1987). També s'ha observat que la prolina i altres aminoàcids poden tenir un paper important en fongs com ara *Fusarium solani* o *Sclerotium rolfsii*, naturals de sòls salins (El-Abyad i cols., 1994).

El glicerol és també el principal solut compatible en agents de biocontrol fúngics com *Epicoccum nigrum* (Pascual i cols., 1996) i *Penicillium frequentans* (Pascual i cols., 2000). Estudis recents han demostrat que el llevat *C. sake* també acumula glicerol quan creix en medi NYDA amb baixa a_w (Teixidó i cols., 1998b, c).

5.3. La trealosa

El disacàrid trealosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosid), és l'únic disacàrid no reductor de la glucosa i és isòmer de la maltosa. En principi, en llevats i altres fongs, la trealosa es presenta com el principal carbohidrat de reserva a més a més del glicogen. No obstant, s'ha vist que el comportament de la trealosa no és el que s'esperaria d'un compost de reserva típic, ja que no s'acumula quan les fonts exògenes són abundants per així servir de font de carboni quan hi ha períodes d'inanició (Wiemken, 1990). A més a més, tant en plantes com en fongs, la trealosa no es troba compartimentada en les vacuoles, com els compostos de reserva, sinó que és un component purament del citosol, cosa que va permetre especular en la seva possible funció com a agent protector (Keller i cols., 1982).

Es pensa que la concentració intracel·lular de trealosa juga un paper important en l'habilitat que tenen molts microorganismes, incloent els llevats, per a tolerar condicions mediambientals adverses (Thevelein, 1984; Van Laere, 1989). Elevades concentracions de trealosa en llevats s'ha associat amb l'increment de l'osmotolerància, termotolerància i tolerància a l'etanol (Van Laere, 1989). Molts autors han trobat que hi ha una gran correlació entre la concentració i l'habilitat de les cèl·lules a sobreviure un llarg període de conservació en congelació (Gadd i cols., 1987; Hino i cols., 1990). Existeix una correlació entre el contingut de trealosa en llevats i la seva habilitat per a suportar l'assecat, amb un mínim d'11-12% i, comunament el 20% (Aguilera i Karel, 1997). Van Dijck i cols. (1995) van observar que augmentant el contingut intracel·lular de trealosa de *S. cerevisiae* per sobre del

10% (pes sec), la seva resistència a la congelació i la liofilització va resultar òptima. Tot i que elevades concentracions endògenes de trealosa poden millorar la resistència a la deshidratació, aquesta resistència es pot augmentar mitjançant la presència de trealosa exògena (Eleutherio i cols., 1993; Gadd i cols., 1987).

Es creu que els 8 grups -OH de cada molècula de trealosa estan disponibles per formar ponts d'hidrogen amb els grups fosfat i carboxil de la doble capa lipídica, i que el sucre ocupa l'espai entre les molècules dels lípids de la membrana, substituint la funció que fa la molècula d'aigua (Aguilera i Karel, 1997; Crowe i Crowe, 1986). A més a més, l'efecte osmòtic de l'acumulació de trealosa també pot afegir un valor secundari a les funcions cel·lulars anteriorment citades, ja que acumulada en grans quantitats, pot tenir una gran influència en l'estat del citosol, particularment pel que respecta a l' a_w . Així, pot contribuir a disminuir el metabolisme i d'aquesta manera promoure la transició de les cèl·lules a un estat de repòs. Per tant, la trealosa pot actuar com un inhibidor general de les activitats metabòliques, impedir el funcionament i conservar l'estructura de les cèl·lules en l'estat estacionari (Wiemken, 1990).

5.4. Millora dels microorganismes enfront l'estrès

Segons el que s'ha explicat en l'apartat anterior, quan fem créixer un microorganisme en condicions d'estrès acumula una sèrie de substàncies, ja siguin poliols o trealosa, que el fan més resistent a les esmentades condicions adverses. Aquest enfoc s'ha intentat utilitzar en agents de biocontrol per tal de fer-los més resistents a les condicions extremes de camp.

Estudis fisiològics recents en fongs entomopatògens utilitzats en el control biològic de plagues, han demostrat que és possible manipular fisiològicament les condicions de creixement, les fonts de carboni, i les relacions carboni:nitrogen per aconseguir l'acumulació de poliols de baix pes molecular, com ara el glicerol i l'eritritol a l'interior del miceli i els propàguls de fongs filamentosos. Aquesta síntesi de poliols dóna lloc a una millor i més ràpida germinació sota condicions d'estrès hídric (Hallsworth i Magan, 1994a, 1995, 1996). Els conidis modificats d'aquesta manera poden ser més patògens per a controlar plagues en condicions de baixa humitat relativa que aquells que no han estat modificats i per tant contenen petites traces de poliols de baix pes molecular (Hallsworth i Magan, 1994b, c).

Pascual i cols. (1996) han demostrat que modificant l'inòcul de l'agent de biocontrol *E. nigrum* amb altes concentracions de glicerol i eritritol, s'ha aconseguit un millor control de la podridura causada per *Monilinia laxa* en préssecs a camp que amb l'inòcul sense modificar. Estudis similars han demostrat que l'acumulació de soluts

intracel·lulars també augmenta la capacitat de l'agent de biocontrol *P. frequentans* contra *M. laxa* en préssec (Pascual i cols., 2000).

Altres autors han suggerit que la trealosa millora la tolerància a la dessecació dels conidis de l'agent de biocontrol *Trichoderma harzianum* (Harman i cols., 1991) i d'*Aspergillus japonicus* (Gornova i cols., 1992). Hallsworth i Magan (1994c) van demostrar que modificant l' a_w del medi de cultiu amb diferents soluts, es poden obtenir elevades concentracions de trealosa en els conidis dels fongs entomopatògens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* i *Paecilomyces farinosus*. Aquests conidis crescuts en medis modificats van romandre viables durant un període d'emmagatzematge set setmanes més llarg que aquells conidis no modificats.

Teixidó i cols. (1998b, c) van demostrar que l'agent de biocontrol *C. sake* va acumular principalment glicerol i arabitol quan va créixer en el medi sintètic NYDB amb una a_w de 0,96, obtinguda mitjançant l'addició de glicerol i glucosa, respectivament. Aquestes cèl·lules amb el contingut intracel·lular de soluts modificat respecte el control, va presentar una major tolerància a condicions de baixa a_w . A més a més, aquestes modificacions de les reserves endògenes van mantenir o inclús augmentar el control biològic de *P. expansum* en pomes. No obstant, no sabem si aquests canvis en les reserves intracel·lulars es poden produir també quan *C. sake* creixi en un medi a base de melassa que és el que s'utilitzaria per a la producció industrial d'aquest agent de biocontrol, ni quin efecte tindrien aquestes modificacions en la viabilitat de les cèl·lules sotmeses a un procés de conservació en forma líquida.

5.5. Formulacions líquides isotòniques

El medi de cultiu és un factor molt important a l'hora d'obtenir cèl·lules resistents als processos de deshidratació. En principi, el medi de cultiu ha de ser l'adequat per a obtenir una producció màxima de cèl·lules de *C. sake*, i que alhora siguin resistents. Una possible proposta seria fer créixer l'agent de biocontrol en medi a base de melassa amb activitat d'aigua modificada i sense modificar i mesurar-ne el seu creixement, el potencial hídic i la concentració de soluts intracel·lulars. La formulació líquida es podria preparar amb cèl·lules crescudes en medi modificat i no modificat. Degut a la diferent a_w del medi de cultiu les cèl·lules podrien tenir, en principi, potencials hídrics diferents i haurien acumulat en el seu interior alguns soluts intracel·lulars. Aquestes cèl·lules es separarien del medi i es resuspendrien en solucions que tinguessin el mateix potencial hídic (isotòniques). D'aquesta manera les cèl·lules no es veurien sotmeses a cap tipus d'estrès hídic. Aquestes solucions de baix potencial hídic, es podrien preparar amb soluts descrits com a soluts compatibles. Fins ara, no hi ha cap estudi similar publicat en aquest camp.

REFERÈNCIES

- Aguilera, J.M., Karel, M. 1997. Preservation of biological materials under desiccation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37: 287-309.
- Aoki, M., Uehara, K., Tsuji, K., Ono, K., Iijima, M. 1993. Large-scale culture and preservation methods of *Pseudomonas cepacia* B5 for biological control against bacterial wilt disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57: 668-669.
- Arévalo, S.M. 1998. Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* CPA-1. Tesi doctoral. Universitat de Lleida, Lleida.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1998. Physiological ecology of microorganisms. Adaptations to Environmental conditions. A: *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. The Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, pp. 281-331.
- Backman, P.A., Rodriguez-Kabana, R. 1974. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology*, 65: 819-821.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 1990. Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beker, M.J., Rapoport, A.I. 1987. Conservation of yeasts by dehydration. *Adv. Biochem. Eng./Biotecnol.*, 35: 127-171.
- Berny, J.F., Hennebert, G.L. 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 83: 805-815.
- Bertrand, P.F., Saulie-Carter, J.L. 1978. The occurrence of benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in the mild-Columbia region of Oregon and Washington. *Plant Dis. Rep.*, 62: 305-320.
- Bewley, J.B. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 30: 195-238.
- Blachère, H., Calvez, J., Ferron, P., Corrieu, G., Peringer, P. 1973. Etude de la formulation et de la conservation d'une preparation entomopathogene à base de blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr. Siemaszko). *Annales de Zoologie et Écologie Animale*, 5: 69-79.
- Blomberg, A., Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. A: *Advances in microbial physiology*. Rose, A.H. (Ed.), Academic Press, London, pp. 145-212.
- Bowers, R.C. 1982. Commercialization of microbial control agents. A: *Biological Control of weeds with plant pathogens*. Charudatta, R., Walker, H.L. (Eds.). John Wiley & Sons, New York.
- Boyetchko, S.M. 1996. Formulating bacteria for use as bioherbicides. *Proceedings of Expert Committee on Weeds*. Victoria, pp. 85-87.

- Boyetchko, S.M, Pedersen, E., Punja, Z., Reddy, M. 1999. Formulations of biopesticides. A: *Biopesticides. Use and delivery*. Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 487-508.
- Brown, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 17: 181-242.
- Brown, A.D., Edgley, M. 1980. Osmoregulation in yeast. A: *Genetic engineering of osmoregulation*. Rains C.V., Valentine, R.C., Hollaender, A. (Eds.). Plenum Press, New York, pp. 75-90
- Bryant, J.E. 1994. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 49: 31-35.
- Butt, T.M., Harris, J.G., Powell, D.A. 1999. Microbial pesticides. A: *Biopesticides. Use and delivery*. Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 23-43.
- Connick, W.J.Jr., Boyette, C.D., McAlpine, J.R. 1991. Formulation of mycoherbicides using a pasta-like process. *Biol. Control*, 1: 281-287.
- Connick, W.J.Jr., Daigle, D.J., Boyette, C.D., Williams, K.S., Vinyard, B. 1996. Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotricum truncatum* conidia in wheat flour-kaolin granules ('pesta'). *Biocontrol Sci. Techn.*, 6: 277-284.
- Corry, J.E.L. 1987. Relationships between water activity and fungal growth. A: *Food Beverage Mycology*. Beuchat, L.R. (Ed.) AVI, Philadelphia, pp. 51-99.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. 1986. Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. A: *Membranes, metabolism and dry organisms*. Leopold, A.C. (Ed.). Cornell University Press, Ithaca, pp. 188-209.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223: 701-703.
- Chalutz, E., Cohen, L., Weiss, B., Wilson, C.L. 1988. Biological control of diseases of citrus fruits by microbial antagonists. *Proceedings of the 6th International Citrus Congress*. Tel Aviv, pp. 15-16.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, Y. 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, 24: 118-128.
- Chand-Goyal, T., Spotts, R.A. 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control*, 10: 199-206.
- Choate, R.V., Alexander, M.T. 1967. The effect of rehydration temperature and rehydration medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. *Cryobiology*, 3: 419-421.

- Churchill, B.W. 1982. Mass production of microorganisms for biological control. A: *Biological control of weeds with plant pathogens*. Charudattan, R., Walker, H.L. (Eds.). John Wiley & Sons, New York, pp. 139-156.
- Deacon, J.W. 1983. Microbial control of plant pest and diseases. Van Nostrand Reinbold (UK). Co. Ltd.
- De Kock, S.L., Combrink, J.C., Reid, G.C., MacDonald, A.C. 1998. YieldPlus: Development, production and commercialization of *Cryptococcus albidus* for controlling post-harvest decay of apples and pears. Proceedings of the International Symposium "The future of fungi in the control of pests, weeds and diseases". Southampton, p. 93.
- Digat, B. 1989. Strategies for seed bacterization. *Acta Hort.*, 253: 121-130.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., Shachnai, A. 1998. Commercial testing of Aspire: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control*, 12: 97-101.
- Dulmage, H.T., Yousten, A.A., Singer, S., Lacey, L.A. 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*, UNDP/WorldBank/Wld. Hlth. Org. TDR Prog., Geneva.
- Edgley, M., Brown, A.D. 1978. Response of xerotolerant and non-tolerant yeasts to water stress. *J. Gen. Microbiol.*, 104: 343-345.
- Edgley, M., Brown, A.D. 1983. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3453-3463.
- Efiuvwevwere, B.J.O., Gorris, L.G.M., Smid, E.J., Kets, E.P.W. 1999. Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 100-104.
- El-Abyad, M.S., Attaby, H., Abu-Taleb, A.M. 1994. Impact of salinity stress on the free amino acid pools of some phytopathogenic fungi. *Microbiol. Res.*, 149: 309-315.
- Eleutherio, E.C.A., Araujo, P.S., Panek, A.D. 1993. Role of trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1156: 263-266.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C.L. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. *Postharvest News and Information*, 6: 5-11.
- El-Sadek, G.M., Shehata, A.E., Shassaw, A.A. 1975. The effect of freeze-drying on viability and activity of lactic streptococci cultures. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 3: 38-42.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis*, 13: 15-26.
- Filková, I., Mujumdar, A.S. 1987. Industrial spray drying systems. A: *Handbook of industrial drying*. Mujumdar, A.S. (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York and Bassel, pp. 243-293.

- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. 1983a. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*, 20: 560.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. 1983b. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 302-304.
- Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. 1985a. Effect of the rehydration medium on the recovery of the freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1339-1342.
- Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. 1985b. Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology*, 22: 574-577.
- Foy, C.L. 1989. Adjuvants, terminology, classification, and mode of action. A: *Adjuvants and agrochemicals*. Chow, P.N.P, Grant, C.A., Hinshalwood, A.M., Simundsson, E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp. 1-15.
- Fravel, D.R., Mariois, J.J., Lumsden, R.D., Connick, W.J.Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*, 75: 774-777.
- Gadd, G.M., Chalmers, K., Reed, R.H. 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 48: 249-254.
- Gervais, P., Marechal, P.A. 1994. Yeast resistance to high levels of osmotic pressure: influence of kinetics. A: *Water in foods*. Fito, P., Mulet, A., McKenna, B. (Eds.). Elsevier Applied Science, London, pp. 399-408.
- Glass, D.J. 1993. Commercialization of soil microbial technologies. A: *Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management*. Blaine Metting, F.Jr. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 595-618.
- Gornova, I.B., Feofilova, E.P., Tereshina, V.M., Golovian, E.A., Krotkova, N.B., Kholodova, V.P. 1992. Effect of carbohydrate content of *Aspergillus japonicus* spores on their survival in storage and subsequent germination. *Mikrobiologiya*, 61: 549-554.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1994a. Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 8-11.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1994b. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140: 2705-2713.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1994c. Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. *Proceedings of British Crop Protection Conferences-Pests and Diseases*. Brighton, pp 1091-1096.

- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology-UK*, 141: 1109-1115.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2435-2442.
- Harman, G.E., Jin, X., Stasz, T.E., Peruzzotti, G., Leopold, A.C., Taylor, A.G. 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biol. Control*, 1: 23-28.
- Harrison, J.S., Trevelyan, W.E. 1963. Phospholipid breakdown in baker's yeast during drying. *Nature*, 200: 1189-1190.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., Takano, H. 1990. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1386-1390.
- Hurley, R., de Lovvois, J., Mulhall, A. 1987. Yeast and human and animal pathogens. A: *The yeast*. Vol. 1. Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 207-281.
- Janisiewicz, W.J. 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Phytopathology*, 77: 481-485.
- Janisiewicz, W.J. 1988a. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. *Phytopathology*, 78: 194-198.
- Janisiewicz, W.J. 1988b. Biological control of diseases of fruit. A: *Biocontrol of plant diseases*. Vol. II. Mukerji, G.G., Garg, K.L. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 153-165.
- Janisiewicz, W.J. 1991. Biological control of posharvest fruit diseases. A: *Handbook of applied mycology*. Vol. 1: *Soil and plants*. Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., Knudsen, G.R. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 301-326.
- Janisiewicz, W.J., Jeffers, S.N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.*, 16: 629-633.
- Janisiewicz, W.J., Marchi, A. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain on *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.*, 76: 555-560.
- Janisiewicz, W.J., Roitman, J. 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 78: 1697-1700.
- Janisiewicz, W.J., Usall, J., Bors, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology*, 82: 1364-1370.
- Jennings, D.H. 1995. Water relations and salinity. A: *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 398-446.

- Jha, P.K., Nair, S., Babu, S. 1993. Encapsulation of seeds of *Sesbania sesban* with polyacrylamide and alginate gel entrapped rhizobia leads to effective symbiotic nitrogen fixation. *Ind. J. Expt. Biol.*, 31: 161-167.
- Jijakli, M.H., Lepoivre, P., Tossut, P., Thonard, P. 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58: 1349-1358.
- Josic, D. 1982. Optimization of process conditions for the production of Active Dry Yeast. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 15: 5-14.
- Kanapathipilla, V.S., Jantan, R. 1985. Approach to biological control of anthracnose fruit rot of bananas. *Proceedings of the First Regional Symposium of Biological Control: Biological Control in the Tropics. Malasia*, pp. 387-398.
- Keller, F., Schellenberg, M., Wiemken, A. 1982. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.*, 131: 298-301.
- Kilara, A., Shahani, K.M., Das, N.K. 1976. Effect of cryoprotective agents on freeze-drying and storage on lactic cultures. *Cult. Dairy Prod. J.*, 11, 8-12.
- Kirsop, B.E., Doyle, A. (Eds.). 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells*. Academic Press, London.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N. 1981. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*, 71: 590-592.
- Knudsen, G.R., Eschen, K.J., Dandurand, L.M., Wang, Z.G. 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2864-2867.
- Koomen, I., Jeffries, P. 1993. Effects of antagonistic organisms on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. *Plant Pathol.*, 42: 230-237.
- Korsten, L., de Villiers, E.E., Rowell, A., Kotze, J.M. 1993. Postharvest biological control of avocado fruit diseases. *South African Avocado Growers' Association Yearb.*, 16: 65-69.
- Ladbrooke, B.D., Chapman, D. 1969. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. Review and summary of some recent studies. *Chem. Phys. Lipids*, 3: 304-356.
- Langejan, A. 1972. A novel type of active dry baker's yeast. A: *Fermentation technology today*. Terui, G. (Ed.). Society of Fermentation Technology, Osaka, pp. 669-671.
- Lapage, S.P., Redway, D.F. 1974. *Preservation of bacteria with notes on other microorganisms*. HMSO, London.
- Latgé, J.P., Soper, R.S. 1977. Media suitable for industrial production of *Entomophthora virulenta* zygospores. *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 1269-1284.

- Levin, R.L. 1979. Water permeability of yeast cells at sub-zero temperature. *J. Membrane Biol.*, 49: 91-124.
- Lewis, J.A. 1991. Formulation and delivery systems of biological control agents with emphasis on fungi. A: *The rhizosphere and plant growth*. Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.). Academic Publishers, Netherlands, pp. 279-287.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C. 1985. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. *Plant Pathol.*, 34: 571-577.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C. 1987. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathol.*, 36: 438-446.
- Liapis, A.I. 1987. Freeze drying. A: *Handbook of industrial drying*. Mujumdar, A.S. (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York and Bassel, pp. 295-326.
- Lisansky, S.G. 1985. Production and commercialization of pathogens. A: *Biological pest control*. Husse, N.W., Scopes, N. (Eds.). Blandford Press, Poole.
- Lumsden, R.D., Lewis, J.A. 1989. Selection, production, formulation and commercial use of plant disease biocontrol fungi: problems and progress. A: *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Whipps, J.M., Lumsden, R.D. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 171-190.
- Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Fravel, D.R. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. A: *Biorational pest control agents. Formulation and delivery*. Hall, R.R., Barry, J.W. (Eds.), ACS Symposium Series 595, Washington, DC, pp. 166-182.
- Malik, K.A. 1976. Preservation of Knallgas bacteria. Proceedings of fifth international fermentation symposium. Dellway, H. (Ed.). Westkreuz Druckerei und Verlag, Bonn and Berlin, p. 180.
- Mari, M., Guizazardi, M., Pratella, G.C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biol. Control*, 7: 30-37.
- Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supra optimal rates. *Cryobiologie*, 14: 251-272.
- McIntyre, J.L., Press, L.S. 1991. Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A: *The rhizosphere and plant growth*. Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.). Academic Publishers, Netherlands, pp. 289-295.
- McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Chalutz, E., Kurtzman, C.P., Fett, W.F., Osman, S.F. 1990. Characterization and reclassification of yeast used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3583-3586.
- Menn, J.J., Hall, F.R. 1999. Biopesticides. A: *Biopesticides. Use and delivery*. Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 1-10.

- Meryman, H.T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3: 341-363.
- Meryman, H.T., Williams, R.J., Douglas, M.St.J. 1977. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural and artificial cryoprotection. *Cryobiology*, 14: 287-302.
- Morichi, T., Irie, R., Yano, N., Kerubo, H. 1967. Death of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* during rehydration. *Agric. Biol. Chem.*, 31: 137-140.
- Morris, G.J., Farrant, J. 1972. Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to -196°C. *Cryobiology*, 9: 173-181.
- National Research Council. 1987. Regulating pesticides in foods-The Delaney paradox. *Natl. Res. Council. Board Agric. Natl. Academic Press*, Washington, DC.
- Neale, M., Newton, P. 1999. Registration/Regulatory requirements in Europe. A: *Biopesticides. use and delivery*. Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 453-471.
- Niedermeyer, W., Parish, G.R., Moor, H. 1977. Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alterations to membrane structure and glycerol uptake. *Protoplasma*, 92: 177-193.
- Nikolova, N., 1978. Freeze-drying of starters for yoghurt and of *Lactobacillus bulgaricus* in protective media. *International Dairy Federation Congress*, Paris, p. 596.
- Paa, A.S., Graham, L.L., Bennett, M. 1991. Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants. A: *Plant growth-promoting Rhizobacteria-Progress and prospects*. Keel, C., Koller, B., Defago, G. (Eds.). IOBC/WPRS Bulletin XIV/8: 399-403.
- Papavizas, G.C., Fravel, D.R., Lewis, J.A. 1987. Proliferation of *Talaromyces flavus* in soil and survival in alginate pellets. *Phytopathology*, 77: 131-136.
- Papendick, R.I., Mulla, D.J. 1986. Basic principles of cell and tissue water relations. A: *Water, fungi and plants*. Ayres, P.G., Boddy, L. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-25.
- Pascual, S., Magan, N., Melgarejo, P. 1996. Improved biocontrol of peach twig blight by physiological manipulation of *Epicoccum nigrum*. *Proceedings of British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*. Brighton, pp. 411-412.
- Pascual, S., Melgarejo, P., Magan, N. 2000. Accumulation of compatible solutes in *Penicillium frequentans* grown at reduced water activity and biocontrol *Monilinia laxa*. *Biocontrol Sci. Techn.*, 10: 71-80.
- Pedersen, T.A. 1965. Factors affecting viable cell counts of freeze-dried *Cryptococcus terricolus* cells. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.*, 31: 232-240.

- Powell, K.A. 1992. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. A: *Biological control of plant diseases*. Tjamos, E.S. (Ed.). Plenum Press, New York, pp. 381-387.
- Pusey, L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. A: *Biological control of postharvest diseases. Theory and Practice*. Wilson, C.L, Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 77-89.
- Quimby, P.C.Jr., Zidack, N.K., Boyette, C.D., Grey, W.E. 1999. A simple method for stabilizing and granulating fungi. *Biocontrol Sci. Techn.*, 9: 5-8.
- Ray, B., Jezeski, J.J., Busta, F.F. 1971. Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. *Appl. Microbiol.*, 22: 184-189.
- Reed, G., Nagodawithana, T.W. (Eds.). 1991. *Yeast Technology*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Rhodes, D.J. 1993. Formulation of biological control agents. A: *Exploitation of microorganisms*. Jones, D.G. (Ed.) Chapman & Hall, London, pp. 411-439.
- Riba, G. 1984. Application en essais parcellaires de plein champ d'un mutant artificiel du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hyphomycets) contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* [Lep.: Pyralidae]. *Entomophaga*, 29: 41-48.
- Riba, G. 1985. Perspectives offertes par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.). Vuill. dans la lutte contre les ravageurs de grandes cultures. *Les Colloques d'INRA*, 34: 131-140.
- Roberts, R.G. 1990a. Postharvest biological control of grey mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 80: 526-530.
- Roberts, R.G. 1990b. Biological control of *Mucor* rot of pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus*, and *C. albidus*. *Phytopathology*, 80: 1051.
- Roberts, R.G. 1991. Characterization of postharvest biological control of deciduous fruit diseases by *Cryptococcus* spp. A: *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables Workshop*. Wilson, C.L., Chalutz, E. (Eds.). US Dep. Agric. Res. Serv. ARS-92, pp. 37-48.
- Rosenberg, D.A., Meyer, F.W. 1981. Postharvest fungicides for apples: Development of resistance to benomyl, vinclozolin and iprodione. *Plant Dis.*, 65: 1010-1013
- Sinha, R.N., Shukla, A.K., Lal, M., Ranganathan, B. 1982. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. *J. Food Sci.*, 47: 668- 669.
- Smilanick, J.L., Denis-Arrue, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.*, 76: 481-482.
- Smith, D., Onions, A.H.S. 1983. *The preservation and maintenance of living fungi*. CAB International, Wallingford.

- Spencer, J.F.T., Spencer, D.M 1978. Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. A: *Economic microbiology*. Vol. 2. Rose, A.H. (Ed.). Academic Press, London, pp. 393-425.
- Stack, J.P. 1998. Post-harvest biological control: Commercial successes and a model form public and private-sector cooperation. ICCPP98, Abstracts of the 7th International Congress of Plant Pathology. Edimburgh, p. 5.2.2S.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N. 1981. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 872-877.
- Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. 1999. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mold on apples during cold storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 203-210.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. 1998a. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88: 960-964.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. 1998b. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycol. Res.*, 102: 1409-1417.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Sanchis, V., Magan, N. 1998c. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 192-200.
- Thevelein, J.M. 1984. Regulation of trehalose mobilisation in fungi. *Microbiol. Rev.*, 48: 42-59.
- To, B.C.S., Etzel, M.R. 1997a. Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after spray drying, freeze-drying, or freezing. *J. Food Sci.*, 62: 167-170.
- To, B.C.S., Etzel, M.R. 1997b. Spray drying, freeze-drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *J. Food Sci.*, 62: 576-578.
- Usall, J. 1995. Control biològic de *Penicillium expansum* en postcollita de fruita de llavor. Tesi doctoral. Universitat de Lleida, Lleida.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. 2000a. Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 58: 83-92.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. 2000b. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol. Tec.*, en premsa.
- Utkhede, R.S., Smith, E.M. 1997. Effectiveness of dry formulations of *Enterobacter agglomerans* for control of crown and root rot of apples trees. *Can. J. Plant Pathol.*, 19: 397-401.

- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 109-115.
- Van Eck, J.H., Prior, B.A., Brandt, E.V. 1989. Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 3505-3513.
- Van Eck, J.H., Prior, B.A., Brandt, E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1047-1054.
- Van Laere, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Rev.*, 63: 201-210.
- Viñas, I., Usall, J., Nunes, C., Teixidó, N. 1999. Nueva cepa bacteriana *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Megaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Viñas, I., Usall, J., Sanchis, V. 1991. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest fungicide treatment in apple packinghouses in Lleida (Spain). *Mycopathology*, 113: 15-18.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Ochoa de Eribe, J. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples with a new strain of *Candida sake*. *Proceedings of British Crop Protection Conference, Pests and Diseases*. Brighton, pp. 603-608.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1997. Nueva cepa de levadura *Candida sake* (Saito & Ota) van Uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha en frutas. Patente española 2089981. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, 40: 9-16.
- Viñas, I., Vallverdú, N., Monllao, S., Usall, J., Sanchis, V. 1993. Imazalil resistant *Penicillium* isolated from Spanish apple packinghouses. *Mycopathologia*, 123: 27-33.
- Watanabe, Y., Takakuwa, M. 1987. Change of lipid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* after transfer to high sodium chloride culture medium. *J. Ferment. Technol.*, 65: 365-369.
- Whitesides, S.K., Daoust, R.A., Gouger, R.J. 1994. Commercialization of biological control agents: An industry perspective. A: *Biological control of postharvest diseases. Theory and practice*. Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp. 107-121.

- Wiemken, 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58: 209-217.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S., Chalutz, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Sci. Hortic.*, 53: 183-189.
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., Chalutz, E., Hershberger, W. 1988. Biological control of postharvest diseases of fruit: inhibition of *Botrytis* rot on apples by an antagonistic yeast. *Proc. Elec. Microsc. Soc. Am.*, 46: 290.
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience*, 27: 94-98.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, 217: 1214-1222.
- Zikmanis, P.B., Auzane, S.I., Kruce, R.V., Auzina, L.P., Beker, M.J. 1983. Interrelationship between the fatty acid composition and metabolic pathways upon dehydration-rehydration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 298-302.
- Zikmanis, P.B., Auzina, L.P., Auzane, S.I., Beker, M.J. 1980. Relationship between the fatty acid composition of lipids and the viability of dried yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 100-103.
- Zimmermann, U. 1978. Physics of turgor and osmoregulation. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 26: 121-148

Capítol 2

Objectius

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi és la recerca d'un mètode de conservació del llevat *C. sake*, que mantingui la seva viabilitat i eficàcia al llarg del temps, per així assentar les bases per a la seva posterior formulació. Amb la finalitat d'assolir aquest repte, es van plantejar els següents objectius:

1. Estudi de la liofilització com a mètode de deshidratació del llevat *C. sake*
 - 1.1. Avaluació del mètode de congelació a utilitzar abans de la liofilització.
 - 1.2. Efecte de l'addició de medis protectors a diferents concentracions.
 - 1.3. Efecte de la combinació dels millors protectors amb la llet.
 - 1.4. Efecte del medi de rehidratació en la viabilitat de *C. sake*.
 - 1.5. Estudi de l'efectivitat de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades contra *P. expansum* en pomes "Golden Delicious".
 - 1.6. Estudi de l'efecte del medi protector i rehidratant, i la temperatura en la conservació del llevat liofilitzat.
2. Estudi de l'ecofisiologia de *C. sake* en medi de cultiu a base de melassa
 - 2.1. Efecte de la modificació de l' a_w del medi de cultiu mitjançant l'addició de diferents soluts en el creixement de *C. sake*.
 - 2.2. Efecte de la modificació de l' a_w del medi de cultiu en el potencial hídric de les cèl·lules.
 - 2.3. Efecte de la modificació de l' a_w del medi de cultiu, del solut utilitzat per a reduir-la i de l'edat del cultiu en l'acumulació intracel·lular de sucres i poliols.
 - 2.4. Efecte de l' a_w del medi de cultiu, del solut utilitzat per a reduir-la i de l'edat del cultiu en la resistència a baixes condicions d'estrès.
3. Avaluació de la formulació líquida com a mètode de conservació
 - 3.1. Estudi de la viabilitat de *C. sake* conservada en solucions isotòniques preparades amb diferents soluts.
 - 3.2. Determinació de l'efectivitat de les formulacions líquides de *C. sake* conservades durant diferents períodes de temps.

OBJECTIVES

The main objective of this thesis is research for a effective preservation method of the yeast *C. sake*, maintaining its viability and efficacy, and to establish the basis for its subsequent formulation. In order to reach this goal, the following objectives were considered:

1. A study of freeze-drying as a dehydration method of *C. sake* cells
 - 1.1. Evaluation of the freezing method to be used before freeze-drying.
 - 1.2. Effect of the addition of different concentrations of protective agents.
 - 1.3. Effect of combinations of the best protectants with skimmed milk.
 - 1.4. Effect of rehydration media on the viability of *C. sake* cells.
 - 1.5. Study of the efficacy of freeze-dried *C. sake* cells against *P. expansum* on Golden Delicious apples.
 - 1.6. Study of protective and rehydration media and temperature on the preservation of *C. sake* cells.
2. Ecophysiological studies of *C. sake* grown in molasses-based media
 - 2.1. Effect of the modification of the a_w of the growth media with different solutes on growth of *C. sake*.
 - 2.2. Effect of modification of the a_w of the growth media with different solutes on the internal water potential of *C. sake* cells.
 - 2.3. Effect of the modification of the a_w of the growth media, the solute used to reduce it and culture age on intracellular accumulation of sugars and polyols.
 - 2.4. Effect of the modification of the a_w of the growth media, the solute used to reduce it and culture age on the water stress resistance of *C. sake*.
3. Evaluation of liquid formulation as a preservation method
 - 3.1. Study of the viability *C. sake* cells preserved in liquid isotonic solutions prepared with different solutes.
 - 3.2. Evaluation of the efficacy of preserved liquid formulations of *C. sake*.

Capítol 3

Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*

M. Abadias, A. Benabarre, N. Teixidó, J. Usall and I. Viñas.

International Journal of Food Microbiology, en premsa

ABSTRACT

The effect of freezing method, freeze drying process, and the use of protective agents on the viability of the biocontrol yeast *Candida sake* were studied. The effect of freezing at -12°C, -20°C, progressive freezing and liquid nitrogen on viability of cells was compared. Freezing at -20°C was the best method to preserve viability of *C. sake* cells after freeze drying using 10% skim milk as a protectant (28.9% survival). Liquid nitrogen freezing caused the highest level of damage to the cells with viability <10%. Different concentrations of exogenous substances including sugars, polyols, polymers and nitrogen compounds were tested either alone or in combination with skim milk. There was little or no effect when additives were used at 1% concentration. Galactose, raffinose and sodium glutamate at 10% were the best protective agents tested alone but the viability of freeze dried *C. sake* cells was always <20%. Survival of yeast cells increased from 0.2 to 30-40% by using appropriate protective media containing combinations of skim milk and other protectants such as 5 or 10% lactose or glucose, and 10% fructose or sucrose.

Keywords: viability, survival, preservation, protectants, formulation, freeze drying

INTRODUCTION

Fruits and vegetables suffer significant losses from fungal diseases after harvest (Eckert, 1975; Dennis, 1983; Snowdon, 1990, 1992). Application of synthetic fungicides has been the primary mean of controlling postharvest diseases (Eckert and Ogawa, 1988). The use of chemicals is becoming increasingly restricted because of concerns for the environment and health. Biological control using microbial antagonists has attracted much interest as an alternative to chemical methods of controlling pre- and post-harvest plant pathogens and pests of agricultural and horticultural crops (Janisiewicz, 1988; Wilson and Chalutz, 1989; Wilson and Wisniewski, 1989; Janisiewicz, 1990). Recently, detailed studies have shown that a strain of *Candida sake* (K. Saito & M. Ota) N. van Uden & H.R. Buckley (CPA-1) is an effective antagonist to the major fungal pathogens of apples and pears (Viñas et al., 1996; Teixidó et al., 1998; Viñas et al., 1998; Usall, 2000).

However, to be of practical use microbial agents must be formulated as products capable of storage, distribution and application into the agricultural marketplace, requiring different approaches from traditional agrochemical product design (Rodham et al., 1999). Formulation is necessary in order to present the product in a usable form

and in order to optimize the efficacy, stability, safety and ease of application of the product (Rhodes, 1993). The biological control agent must be formulated and maintained in a viable or active form. This presents a number of technical problems in that microorganisms and proteins, particularly in the absence of specialised resting structures, are easily killed or inactivated by unfavourable environmental conditions (Kirsop and Doyle, 1991). Drying of the product, and maintenance in a dry environment or suspension in oil are alternative approaches to formulate microbial agents so that they can be handled using the normal channels of distribution and storage. Unfortunately, not all microorganisms have proved amenable to drying and many tend to lose viability both during the drying process and in storage (Lapage and Redway, 1974; Kirsop and Doyle, 1991).

Freeze drying is the most convenient and successful method of preserving bacteria, yeasts and sporulating fungi (Berny and Hennebert, 1991). The advantages of freeze drying are protection from contamination or infestation during storage, long viability and ease of strain distribution (Smith and Onions, 1983). However, not all strains survive the process and, among those surviving, quantitative viability rates as low as 0.1% have been reported (Atkin et al., 1949; Kirsop, 1955; Smith and Onions, 1983; Berny and Hennebert, 1991). Substances such as polymers, sugars, albumin, milk, honey, polyols and amino acids have been tested for their protective effect during freeze drying (Pedersen, 1965; Morris and Farrant, 1972; Malik, 1976; Meryman et al., 1977; Womersley, 1981; Font de Valdez et al., 1983a). Skim milk has been widely used, either alone (Heckly, 1961) or associated with other compounds (Butterfield et al., 1974; Malik, 1976; Smith and Onions, 1983; Berny and Hennebert, 1991). Components of the suspending media have two main functions in preserving viability of freeze dried cells. The first is to provide a dry residue with a definite physical structure acting as a support material and as a receptor in rehydration, and the second is to protect the living cells biochemically against damage during freezing and/or drying (Berny and Hennebert, 1991). These workers found that by using skim milk as a support material in combination with two compounds from honey, sodium glutamate, trehalose or raffinose, the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells was increased from 30% to 96-98%.

Moreover, the cooling rate of the cells during the cooling phase is a critical factor in the freeze drying process. The optimum cooling rate appears to be that at which the cells do not lose water and reaches the eutectic frozen point in an amorphous state (Berny and Hennebert, 1991). If cooling is slow enough, water will have time to flow out of the cell by osmosis dehydrating the cell and thus avoiding freezing. If the cells do not lose water quickly enough to maintain equilibrium, ice crystals eventually form intracellularly (Mazur, 1977).

Surprisingly, practically no similar studies have been carried out to evaluate the efficacy of such treatments for conserving viability of cells of postharvest biological control agents such as *C. sake*. This is critical, since a high cell concentration is necessary in order to obtain a good formulated product for commercial application. Thus the objectives of this study were to compare the efficiency of different freezing methods, and compare the additions of a range of individual additives and combinations with powdered skimmed milk as protectants for preserving the viability of *C. sake* cells during freeze drying.

MATERIALS AND METHODS

Yeast

The yeast used in this study was the strain CPA-1 of *Candida sake* obtained from UdL-IRTA, Catalonia, Spain. It is deposited in Colección Española de Cultivos Tipo, CECT-10817 (Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, Burjasot, Valencia, Spain).

Cultures

Stock cultures were stored at 4°C and had been subcultured on nutrient yeast dextrose agar (NYDA), which contained nutrient broth, 8 g l⁻¹ (Biokar Diagnostics, BK003, Beauvois, France); yeast extract, 5 g l⁻¹, (Biokar Diagnostics, 112002, Beauvois, France); dextrose, 10 g l⁻¹, (Rectapur, 24 379.294, Prolabo, Fontenay S/Bois, France) and agar, 15 g l⁻¹ (NOKO, S.A., RG-99112318, Asturias, Spain).

Cell production

The growth medium was nutrient yeast dextrose broth (NYDB), which was NYDA without agar. Cultures were grown in a 5-liter bench-top fermentor (Gallenkamp, Loughborough, Leicestershire, UK) containing 4 l of medium at 25 ± 1°C with constant stirring and aeration for 38 h. Cells were harvested at the beginning of the stationary phase by centrifugation at 8315 g for 10 min at 10°C in an Avanti™ J-25 centrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). The growth medium was decanted and the cell paste resuspended in 10-15 ml of potassium phosphate buffer (PB, 70 ml 0.2 M KH₂PO₄ (Rectapur, 26 923.298, Prolabo) + 30 ml 0.2 M K₂HPO₄ (Rectapur, 26 930.293, Prolabo), pH 6.5, and centrifuged again. The resulting cell paste was stored at 4°C and used the same day. Usually, about 15 g of cell paste with a moisture content of about 75% (w/w) were obtained per liter of NYDB medium.

Freezing treatments

C. sake cells were produced as described above and the cell paste was then resuspended in powdered skimmed non-fat milk (SM, Sveltesse®, Nestlé España, S.A., Barcelona, Spain) at 10% (w/v) which was used as a control. Ten-fold dilutions of this suspension were made and spread plated in duplicate onto the surface of 9 cm Petri plates in order to calculate the initial concentration. Plates were incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h and the initial number of colony forming units per milliliter (CFU ml^{-1}) was calculated.

Thereafter samples of 5 ml were distributed in 24 autoclaved vials (10 ml, Serum Type Reaction Vial, Supelco, Inc., Bellefonte, PA) in order to evaluate the effect of four different freezing methods on *C. sake* viability. The first and second methods consisted of freezing directly at -12°C and -20°C respectively, and maintaining the samples at these temperatures overnight. Progressive freezing consisted of refrigerating samples at 4°C for 2 h, then freezing at -12°C for 8 h, and maintaining the samples at -20°C overnight. Liquid nitrogen freezing consisted in submerging the samples in liquid nitrogen (N_2) and then maintaining the cells at -20°C overnight. Thereafter, three of the six samples of each treatment were thawed at room temperature and viability was calculated by the standard plate count method as described above in order to evaluate the effect of freezing on *C. sake* cell viability. The other three vials were connected to a freeze-drier (Cryodos, Telstar, S.A, Terrassa, Spain) operating at 1 Pa and -45°C for 24 h. Each sample of freeze dried *C. sake* was rehydrated to its original volume (5 ml) with PB for 10 min at room temperature, and then CFU ml^{-1} was determined as described above. The survival level was determined for frozen, and freeze dried cell treatments, and quantitative comparisons made (CFU ml^{-1}) before and after freezing and freeze drying respectively. The experiments were all repeated twice.

Effect of protective agents

Cell paste obtained by centrifugation as described above was resuspended in the protective medium to make a total volume of 10% of the initial one, containing approximately 1.0×10^9 to 5.0×10^9 CFU ml^{-1} . Initial cell concentration of each protective suspension was calculated by the standard plate count method. Aliquots of 5 ml were distributed in three autoclaved vials and were frozen at -20°C overnight. Then samples were connected to the freeze-drier for 24 h. Each sample of freeze dried *C. sake* cells was rehydrated and plated as described above. The percentage of survival was determined from the viable yeast counts made before and after freeze drying.

Suspensions of sugars (glucose, fructose, galactose, trehalose, lactose, sucrose and raffinose); polyols (glycerol, mannitol, sorbitol, inositol and adonitol); polymers

(dextran, starch and polyethylene glycol 200, PEG); peptone and sodium glutamate were made with de-ionized water. Concentrations of 1, 5 and 10% (w/v) were prepared. Moreover, a 10% suspension of SM was studied in order to compare with the other treatments.

Solutions were autoclaved at 115°C for 15 min, except adonitol, which was sterilised by filtration using a 0.20 µm diameter filter (GS Type, Millipore, Ireland).

D(+)-sucrose, anhydrous D(+)-glucose, starch and glycerol 98% were provided by Rectapur (Prolabo, Fontenay S/Bois, France); D(+)-galactose, D(+)-raffinose pentahydrate, D-mannitol, D(+)-trehalose dihydrate, dextran, meso-inositol and adonitol by (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); D(-)-fructose, lactose-1-hydrate, PEG200, D(-)-sorbitol and sodium L-glutamate-1-hydrate by (Panreac Química, S.A, Montcada i Reixac, Barcelona, Spain).

Glucose, fructose, galactose, trehalose, sucrose, lactose, raffinose, glutamate, dextran, starch, sorbitol and adonitol were combined at 5 and 10% (w/v) with SM at 5 and 10% (w/v) concentration.

Data analysis

Resulting colonies from samples taken before and after freeze drying were counted and percentages of surviving *C. sake* estimated. Percentages of viability were analysed by a General Lineal Model (GLM) procedure with SAS software (SAS Institute, version 6.12, Cary, NC, USA). Statistical significance was judged at the level $P=0.05$. When the analysis was statistically significant Duncan's Multiple Range Test was used for separation of means.

RESULTS

Comparison of freezing treatments

The best viability of *C. sake* cells after freezing was obtained when samples were frozen at -12°C and -20°C, with survival >85% (Table 1). After freeze drying, the viability of the yeast cells was drastically decreased to <30% in all cases, with the best results obtained in the -20°C freezing treatment. The viability of the cells after freezing, and freeze drying when the cells were frozen with N₂, was significantly lower ($P<0.05$) than that obtained with the other freezing methods. Consequently, this method was rejected and freezing at -20°C was chosen as the best treatment with which to carry out further experimentation.

Table 1. Viability of *C. sake* cells after freezing and freeze drying with different methods using 10% of skim milk as a protective agent. Means with different letter within columns are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

Freeze method	Viability, %			
	After freezing		After freeze drying	
	Mean	Stdev ^a	Mean	Stdev ^a
-12°C	89.7 ^a	3.4	19.3 ^b	4.1
-20°C	85.1 ^a	5.3	28.9 ^a	1.1
Progressive	71.3 ^b	1.1	20.7 ^b	1.9
Liquid Nitrogen	52.1 ^c	4.5	9.2 ^c	2.1

^a: Standard deviation

Effect of protective agents

The additives tested as protective agents against freeze drying in this study may be divided in four groups: sugars, polyols, polymers and nitrogen compounds. In this experiment all additives were tested using deionized water as a suspending medium. After freeze drying, cell viability in the absence of the protective agents was very low, 0.2 and 0.3% for deionized water and PB respectively (data not shown). The viability of *C. sake* cells freeze dried in 10% SM was 22% (data not shown). Results with the additives are shown in Table 2.

An increase in viability was observed when the concentration of the protective agent was increased from 1 to 10%, except for dextran, glycerol, inositol, PEG and peptone. At 1% concentration the additives were all ineffective in conserving viability. At 5%, the best protective agent was raffinose, with 13.2% of cells remaining viable. Best viabilities were observed with 10% glutamate, raffinose and galactose, with 19.8, 19.1 and 16.6% survival, respectively.

Among the sugars, the trisaccharide raffinose was found to be the best protectant giving cell viabilities of 13.2 and 19.1% at concentrations of 5 and 10%, respectively. There were no significant differences ($P > 0.05$) between the disaccharides sucrose, lactose and trehalose at both of the higher concentrations tested. Galactose was the best monosaccharide treatment tested and showed statistically higher survival of *C. sake* cells than glucose and fructose. At 10% concentration, raffinose and galactose showed the best protective effect, significantly different from the other sugars.

Table 2. Viability of *C. sake* (%) after freeze drying using different concentrations of protective agents dissolved in deionized water. Different letters in the same column indicate that means are significantly different ($P<0.05$) according to a Duncan's Multiple Range Test.

	Protectant	Concentration, % w/v					
		1%		5%		10%	
		Mean	Stdev ^a	Mean	Stdev ^a	Mean	Stdev ^a
Monosaccharides	Glucose	0.2 ^{def}	0.0	2.8 ^{de}	0.3	8.6 ^{de}	1.2
	Fructose	0.2 ^{def}	0.1	4.3 ^{cd}	0.4	5.9 ^{ef}	0.7
	Galactose	1.0 ^{bc}	0.3	6.4 ^b	1.0	16.6 ^{ab}	6.5
Dissaccharides	Sucrose	0.7 ^{cdef}	0.2	6.2 ^b	0.7	11.4 ^{cd}	1.4
	Lactose	0.8 ^{cde}	0.2	5.9 ^{bc}	0.6	12.2 ^{cd}	2.7
	Trehalose	1.5 ^{ab}	0.0	6.1 ^{bc}	1.8	12.5 ^{cd}	1.4
Tri-saccharides	Raffinose	1.7 ^a	0.5	13.2 ^a	1.6	19.1 ^a	3.6
Polymers	Dextran	1.7 ^a	0.9	3.4 ^d	0.8	3.7 ^{fg}	1.5
	Starch	2.1 ^a	0.5	7.0 ^b	3.0	11.9 ^{cd}	2.0
	PEG	<0.1 ^f		0.2 ^f	0.1	0.2 ^g	0.1
Polyols	Glycerol	0.3 ^{cdef}	0.1	0.1 ^f	0.1	0.3 ^g	0.4
	Mannitol	0.1 ^{ef}	0.1	1.0 ^{ef}	0.3	6.4 ^{ef}	1.0
	Sorbitol	0.6 ^{cdef}	0.1	2.6 ^{de}	0.4	13.0 ^{bc}	1.7
	Adonitol	0.8 ^{cd}	0.6	1.5 ^{ef}	0.2	8.6 ^{de}	0.7
	Inositol	0.6 ^{cdef}	0.5	<0.1 ^f		<0.1 ^g	
Nitrogen compounds	Glutamate	0.6 ^{cdef}	0.2	5.4 ^{bc}	0.4	19.8 ^a	1.3
	Peptone	<0.1 ^f		<0.1 ^f		<0.1 ^g	

^a Standard deviation

The protective effect of polyols was in general lower than that obtained with sugars. Sorbitol (10%) addition gave the highest viability of all the polyols tested. Glycerol at 10% did not dry completely. Inositol was found to be ineffective in the protection of *C. sake* and the viability obtained was <1% for all concentrations tested. Mannitol and adonitol showed some effect on *C. sake* survival when tested at 10% concentration (6.4 and 8.6% viability, respectively).

Among the polymers tested, best results were obtained with starch. Its effect at 5 and 10% concentration was not significantly different to that obtained with the disaccharides tested. Dextran gave poor viability (<4% for all concentrations tested), and there were no differences in viability of cells when the concentration of dextran was increased from 1 to 10%. Finally, PEG was found to be ineffective in protecting *C. sake* cells.

Sodium glutamate (10%) proved to be one of the best protectants with 19.8% of *C. sake* cells remaining viable. However, the effect was concentration dependent with better conservation at 10 than 1% concentration. Peptone was inefficient in protecting yeast cells at all tested concentrations. Overall, although viability was enhanced with some protectants, the maximum percentage of viable cells was still <20%. Thus, further studies were conducted with combinations of SM and some protectants.

Effect of skimmed milk + protectant mixtures

Results obtained with SM in combination with glucose, fructose, trehalose and sucrose on viability of *C. sake* cells after freeze drying are shown in Fig. 1. For glucose and SM combinations, the addition of 5% glucose caused a significant increase in viability, with either 5 or 10% SM. Combinations of 10% SM + 5 or 10% glucose resulted in 30.0 and 33.4% cell viability. Addition of 5% fructose to 5% SM (Fig. 1B) gave a significant increase in viability (27.2%). However, mixtures containing 5 or 10% SM did not dry completely. The effect of the addition of the disaccharides trehalose and sucrose (Fig. 1C, 1D), to SM was more notable at 5 than 10% SM. Using 10% SM + 10% sucrose resulted in about 37% cell viability.



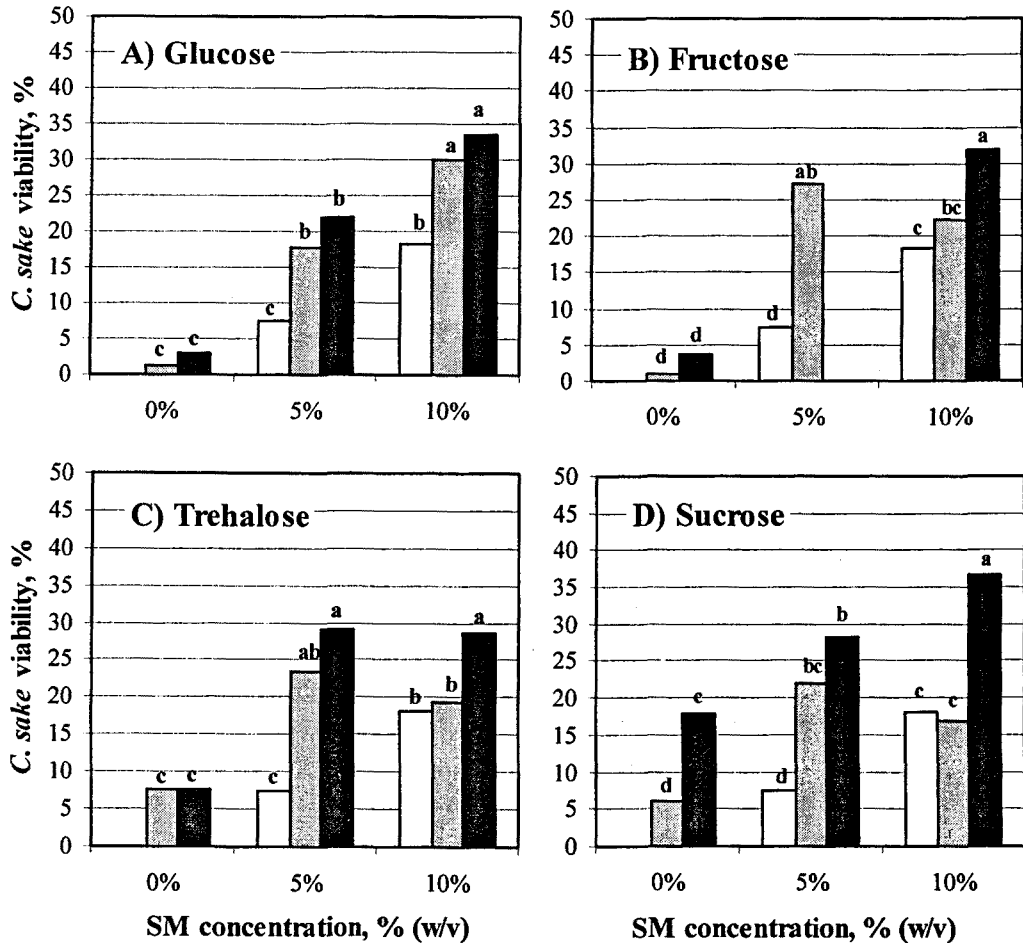


Fig. 1. Viability of *C. sake* cells after freeze drying using combinations of: (A) Glucose, (B) Fructose, (C) Trehalose and (D) Sucrose at 0% (□), 5% (▒) or 10% (■) with SM. Within the same figure, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range Test.

Results obtained with combinations of SM + galactose, lactose, raffinose and dextran are shown in Fig.2. The best result obtained was when combinations of 10% SM + 10% lactose were used, resulting in about 40% cell viability. Problems were encountered with 10% SM and dextran treatments which became curdled during the sterilisation process.

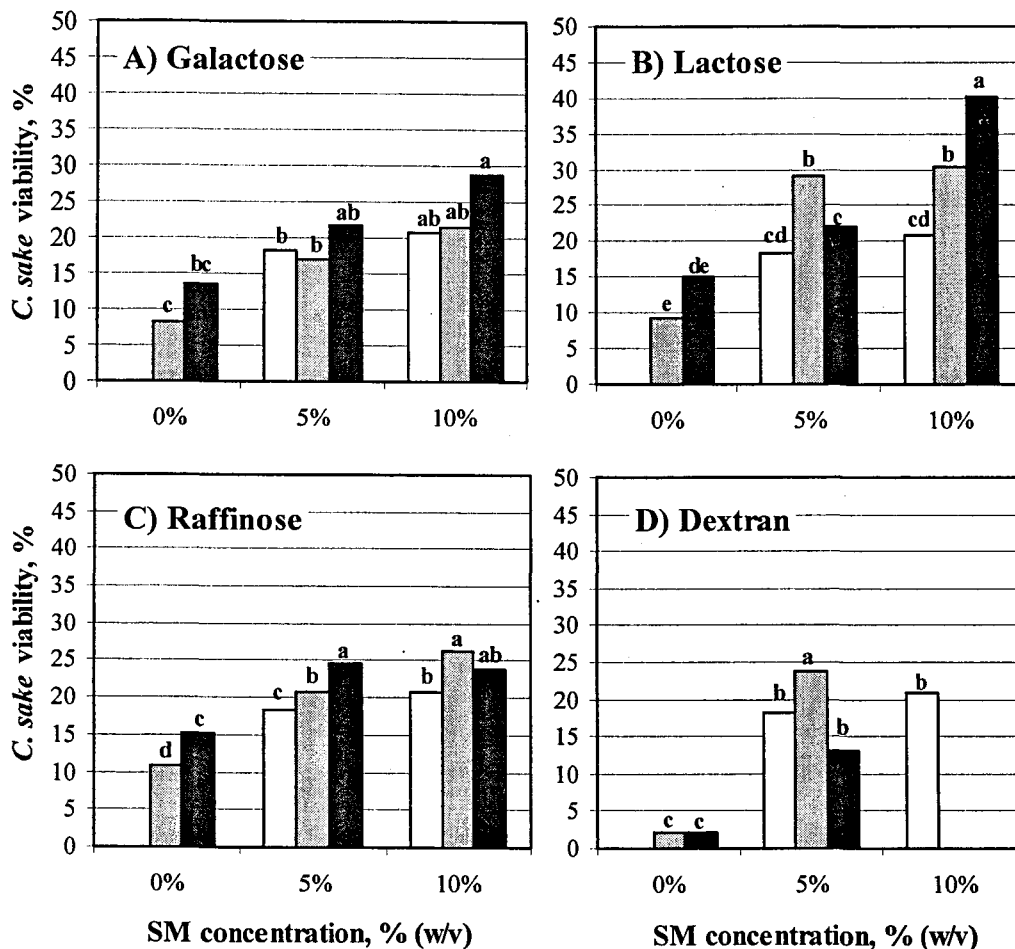


Fig. 2. Viability of *C. sake* cells after freeze drying using combinations of: (A) Galactose, (B) Lactose, (C) Raffinose and (D) Dextran at 0% (□), 5% (▒) or 10% (■) with SM. Within the same figure, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range Test.

Results obtained with the combination of SM with sorbitol, adonitol, glutamate and starch are shown in Fig. 3. The best combination of treatments was 10% SM + 5% adonitol where viability was increased to about 25%. Combinations of SM + glutamate or starch did not show any additional protective effect over that provided by SM alone. Again combinations of glutamate with 10% SM curdled during the sterilisation process.

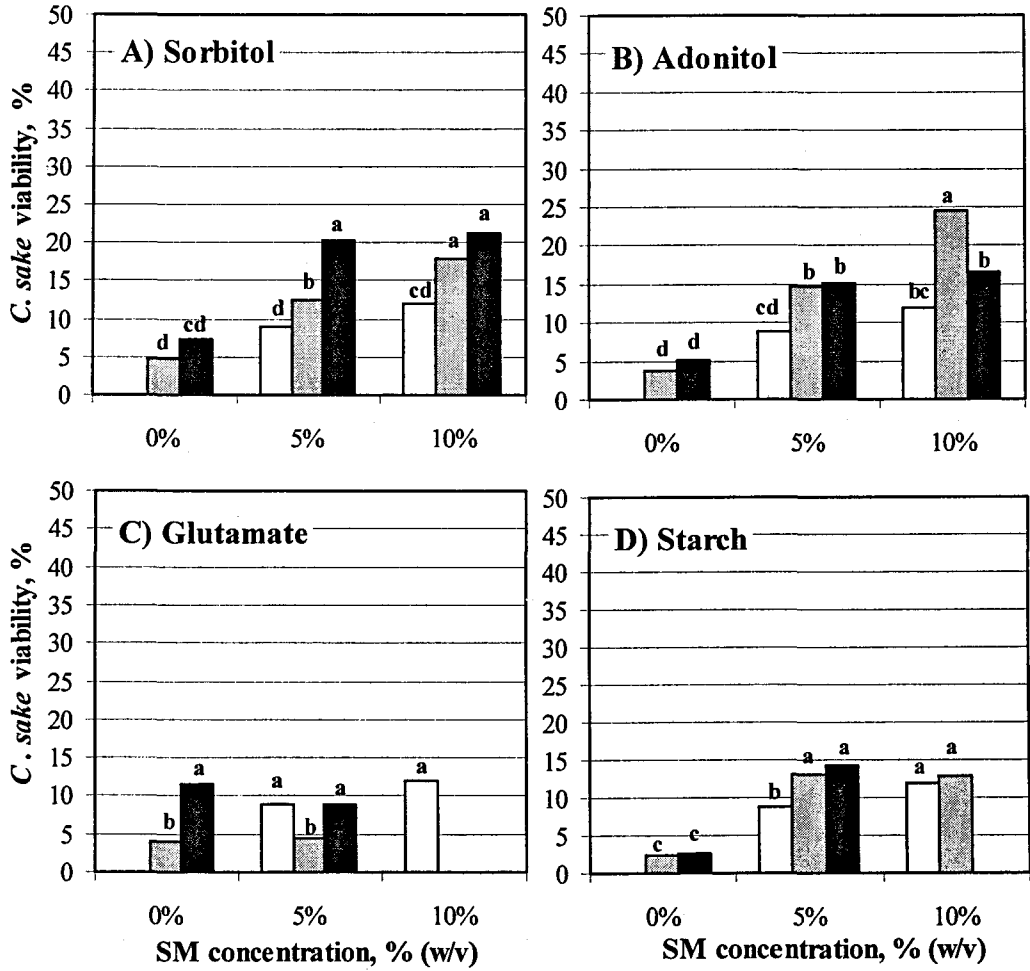


Fig. 3. Viability of *C. sake* cells after freeze drying using combinations of: (A) Sorbitol, (B) Adonitol, (C) Glutamate and (D) Starch at 0% (□), 5% (▨) or 10% (■) with SM. Within the same figure, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range Test.

DISCUSSION

This study is the first investigation of the resistance of cells of the biocontrol agent *C. sake* to freezing and freeze drying processes. It has demonstrated that these conditions and protectant additives have a significant influence on the survival of *C. sake* cells.

In the present studies, we found that freezing at -20°C appeared to be most suitable method of the four examined, followed by -12°C , and then the progressive freezing and liquid nitrogen systems. For the four freezing methods tested, liquid nitrogen was the method resulting in the lowest viability of *C. sake* cells probably because it was too fast to let the internal water migrate outside the cell, and water froze inside the cell resulting in lethal damage.

When compounds were tested alone, SM 10% afforded the higher protecting effect. The viability of *C. sake* cells suspended in 10% SM was 22%. Berny and Hennebert (1991) found a similar effect in protecting *Saccharomyces cerevisiae* cells with SM, obtaining 30% survival. It is thought that proteins contained in milk provide a protective coat for the cells (Champagne et al., 1991).

In our experiments, 12.5% viability was obtained using 10% trehalose as a protective agent and trehalose was much more efficient at a concentration of 10 than at 5%, as found by Coutinho et al. (1988) and Berny and Hennebert (1991) with other microorganisms. Among the sugars, trehalose has been widely studied. Its role in the stabilisation of dry biological membranes by hydrogen bonding to the polar head group of the phospholipid membrane has been pointed out (Crowe et al., 1984). Berny and Hennebert (1991) found that using 10% trehalose as a protectant, the viability of *S. cerevisiae* was 74%. Combinations of this disaccharide with 5% SM increased the yeast survival further.

With all the disaccharides tested, approximately 12% viability was reached. Better results were obtained by Kilara et al. (1976) who found that lactose (7%) was a useful protectant of lactic acid bacteria obtaining viabilities of between 23 and 50% depending on the genera studied. Sucrose can also be used successfully (Nikolova, 1978). Polyols and sugars seem to require the presence of at least five properly arranged hydroxyl groups to provide protection (Webb, 1960; Moriche, 1970). Hanafusa (1985) found that the addition of protective substances, such as sugars or glycerol, reduce the amount of bound water on the surface of the proteins. The protectants may themselves form hydrogen bonds with the protein, thus substituting for the water in order to maintain the stability of the protein (Font de Valdez et al., 1983a, 1985; Hanafusa, 1985).

The findings obtained in our study seem to indicate that polyols are not appropriate for the preservation of cells of *C. sake* during lyophilization. Except for sorbitol, they gave poor protection. During freeze drying *S. cerevisiae* cells, the use of 5% inositol + 10% SM resulted in 25% viability, lower than that obtained with 10% SM alone (Berny and Hennebert, 1991). Glycerol, which is an effective cryoprotectant and is widely used in frozen concentrates, did not provide significant protection during freeze drying of *C. sake* cells. This result is similar to that obtained by Font de Valdez et al. (1983b) who indicated that glycerol was not appropriate for the preservation of lactic acid bacteria during freeze drying. However, mannitol was identified as a good protectant for dried lactic acid bacteria (Efiuvwevwere et al., 1999). Adonitol provided some protection to *C. sake* cells. In contrast, Font de Valdez et al. (1983b) demonstrated that adonitol had a strong protective effect on lactic acid bacteria during freeze drying. However, the cost of adonitol limits its industrial use.

Dextran at 5 and 10% concentration gave poor protection of freeze dried *C. sake* cells (3.4 and 3.7%, respectively). The effect of the same concentrations on *S. cerevisiae* cells was slightly higher (13 and 24% viability, respectively). In our experiments, 10% sodium glutamate gave one of the best results when using the cryoprotectants alone. Berny and Hennebert (1991) found that 30% of *S. cerevisiae* cells survived after freeze drying when 5% glutamate was used as protectant. This protection by amino acids is thought to be the result of a reaction between the carboxyl groups of the microorganism proteins and the amino group of the protectant, stabilising the proteins structure (Moriche, 1970).

In the present study skim milk gave the best viability to *C. sake* cells and also provided the freeze dried product with a porous structure that made rehydration easier. Consequently, SM was also used as a support material in mixture with the best protectants.

The best results were obtained by using combinations of treatments by mixing 10% SM + 5% or 10% glucose, 10% fructose, 10% sucrose, 5% lactose and 10% lactose (30-40% viability). In general, using the same protectants the viability of *C. sake* cells was lower than that obtained for *S. cerevisiae* previously (Berny and Hennebert, 1991). *C. sake* cells appeared to be much more sensitive to freeze drying than *S. cerevisiae*. Combinations of 10% SM + 5 or 10% trehalose gave poor protection of *C. sake* cells resulting in 19 and 29% viability, respectively. However, previous studies with *S. cerevisiae* showed viabilities of 74 and 96% with the same protectants (Berny and Hennebert, 1991). Similar differences were observed for raffinose. Surprisingly, sodium glutamate which had been one of the best individual treatments, did not increase *C. sake* cell viability when combined with SM. This

parallels the results obtained by Berny and Hennebert (1991) with *S. cerevisiae*. Overall, by using an appropriate combination, we could improve the resistance of *C. sake* cells to freeze drying from 0.3% (using water) to 40% (using 10% SM + 10% lactose). Moreover, this combination significantly increased the viability obtained with individual treatments alone.

The mechanism of killing by freezing and/or dehydration and of protection of organisms from injury is complex. Evidence exists that the major contributory factor in cell death is osmotic shock (Harrison and Cerroni, 1956), although the findings of Mazur (1960) do not support this view. From the results obtained in our studies, it is difficult to draw definite conclusions as to the manner of action of each cryoprotective agent. However, the differences exhibited in the yeast survival indicate that certain suspending media are more effective than others in protecting *C. sake* cells subjected to freeze drying. We have demonstrated that an appropriate selection of suspending medium is essential in order to optimise cell viability. In order to increase *C. sake* viability after freeze drying, other factors such as growth media and rehydration media would have been studied.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. N. Magan from Cranfield University, UK, for his valuable discussion and advice, to the Spanish Government (MEC Ministerio de Educación y Cultura and CICYT Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología grant ALI99-0652-C02-01) for their financial support.

REFERENCES

- Atkin, L., Moses, W., Gray, P.P., 1949. The preservation of yeast culture by lyophilization. *J. Bacteriol.* 57, 575-578.
- Berny, J.F., Hennebert, G.L., 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia* 83, 805-815.
- Butterfield, W., Jong, S.C., Alexander, M.T., 1974. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. *Can. J. Microbiol.* 20, 1665-1673.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, Y., 1991. The freeze drying of lactic acid bacteria. A review. *Can. Inst. Sci. Technol. J.* 24, 118-128.
- Coutinho, C., Bernardes, E., Felix, D., Panek, A.D., 1988. Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast. *J. Biotechnol.* 7, 23-32.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223, 701-703.

- Dennis, C., 1983. Post-harvest Pathology of Fruits and Vegetables. Academic Press, Inc., New York.
- Eckert, J.W., 1975. Postharvest diseases of fruits and vegetables. Etiology and control. In: Haard, N.F. and Salunkhe, D.K. (Eds.), Postharvest Biology and Handling of Fruit and Vegetables. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. pp. 81-117.
- Eckert, J.W., Ogawa, J.M., 1988. The chemical control of postharvest diseases: Deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. Annu. Rev. Phytopathol. 26, 433-469.
- Efiuvwevwere, B.J.O., Gorris, L.G.M., Smid, E.J., Kets, E.P.W., 1999. Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 100-104.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., 1983a. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze drying. Cryobiology 20, 560-566.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., 1983b. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze drying. Appl. Environ. Microbiol. 45, 302-304.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., 1985. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze dried lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49, 413-415.
- Hanafusa, J.V., 1985. The hydration water and protein with cryoprotectant. In: Fundamentals and applications of freeze dried to biological materials, drugs and food stuffs. International Institute of Refrigeration. Paris, p. 59.
- Harrison, A.P., Cerroni, R.E., 1956. Fallacy of "crushing death" in frozen bacterial suspension. Proc. Soc. Exp. Biol. NY 91, 577-583.
- Heckly, R.J., 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. Appl. Microbiol. 3, 1-75.
- Janisiewicz, W.J., 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. Phytopathology 78, 194-198.
- Janisiewicz, W.J., 1990. Biological control of disease fruits. In: Mukerji, K.G., and Garg, K.L. (Eds.), Biocontrol of plant diseases 2, CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 153-165.
- Kilara, A., Shahani, K.M., Das, N.K., 1976. Effect of cryoprotective agents on freeze drying and storage on lactic cultures. Cult. Dairy Prod. J. 11, 8.
- Kirsop, B., 1955. Maintenance of yeasts by freeze-drying. J. Inst. Brew. 21, 466-471.
- Kirsop, B.E., Doyle, A. (Eds.), 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. Academic Press, London.
- Lapage, S.P., Redway, D.F., 1974. Preservation of bacteria with notes on other microorganisms. HMSO, London.

- Malik, K.A., 1976. Preservation of Knallgas bacteria. In: Dellway, H. (Ed.) Proceedings of fifth international fermentation symposium, Westkreuz Druckerei und Verlag, Bonn and Berlin.
- Mazur, P., 1960. Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures. *Ann. NY Acad. Sci.* 85, 610-622.
- Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supra optimal rates. *Cryobiology* 14, 251-272.
- Meryman, H.T., Williams, R.J., Douglas, M.St.J., 1977. Freezing injury from "solutions effects" and its prevention by natural and artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14, 287-302.
- Moriche, T., 1970. Nature and action of protective solutes in freeze drying of bacteria. In: Proceedings of the First International Conference on Culture Collections, University Park Press, Tokyo, p. 121.
- Morris, G.J., Farrant, J., 1972. Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to -196°C . *Cryobiology* 9, 173-181.
- Nikolova, N., 1978. Freeze drying of starters for yoghurt and of *Lactobacillus bulgaricus* in protective media. International Dairy Federation Congress, Paris. p. 596.
- Pedersen, T.A., 1965. Factors affecting viable cell counts of freeze dried *Cryptococcus terricolus* cells. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 31, 232-240.
- Rhodes, D.J., 1993. Formulation of biological control agents. In: Jones, D.G. (Ed.) Exploitation of microorganisms, Chapman & Hall, London, pp. 411-439.
- Rodham, D.K., Wang, Y., Cantwell, J.B., Winn, P.D., Foundling, J., 1999. Formulating microbial biocontrol agents. *Pestic. Sci.* 55, 340-342.
- Smith, D., Onions, A.H.S., 1983. The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Snowdon, A.L., 1990. Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Vol. 1: General Introduction and Fruits. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Snowdon, A.L., 1992. Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Vol. 2: Vegetables. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., 1998. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* in media with different water activity. *Phytopathology* 88, 960-964.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I., 2000. Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 83-92.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Ochoa De Eribe, J., 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples with a new strain of *Candida sake*. *Proc. British Crop Protection Conference, Pests and Diseases* 6C, 603-608.

- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V., 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 9-16.
- Webb, S.J., 1960. Factors affecting the viability of air-borne bacteria. *Can. J. Microbiol.* 6, 71.
- Wilson, C.L., Chalutz, E., 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hortic. Amsterdam* 40, 105-112.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 425-441.
- Womersley, C., 1981. Biochemical and physiological aspects of anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 669-678.

Capítol 4

Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media

M. Abadias, N. Teixidó, J. Usall, A. Benabarre and I. Viñas

Enviat a : *Journal of Food Protection*

ABSTRACT

Viability, efficacy against *Penicillium expansum* on Golden Delicious apples, and storage stability of freeze-dried *Candida sake* strain CPA-1 were studied. The effect of several protective agents and rehydration media was investigated in freeze-drying of *C. sake*. Skimmed milk at 10% concentration demonstrated to be a good rehydration media for all protectants tested. In general, good viability results were obtained when the same solution was used as a protectant and as a rehydrating media. The best survival was obtained when *C. sake* cells were protected with 10% lactose + 10% skimmed milk and rehydrated with skimmed milk (85% viability).

The potential for biocontrol of the best freeze-dried treatments against *P. expansum* on apples was compared with that by fresh cells. Freeze-dried treatments at 1.0×10^7 CFU/ml reduced the incidence of decay by 45-66%. The best biocontrol effect was obtained with cells which had been freeze-dried using 10% lactose + 10% skimmed milk as a protectant and 1% peptone as a rehydration medium, with a 66% reduction in rot incidence. However, in all treatments the efficacy of freeze-dried cells was significantly lower than fresh cells.

The stability of freeze-dried samples decreased during storage and was influenced by storage temperature. In the best treatment, storage of *C. sake* cells for 60 days at 4°C resulted in final concentrations of 2.5×10^8 CFU/ml which was a 10-fold reduction in relation to the initial starting concentration of cells prior to freeze-drying.

INTRODUCTION

Biological control of postharvest diseases of fruits has advanced greatly during the past decade. These efforts arose from the need for alternatives to chemical control measures (Rosenberg and Meyer, 1981; Spotts and Cervantes, 1986) due to the development of resistance to many fungicides by major postharvest pathogens (Bertrand and Saulie-Carter, 1978; Rosenberg and Meyer, 1981; Viñas et al., 1991, 1993), and concern for public safety (National Research Council, 1987). Recent studies have shown that *Candida sake* strain CPA-1 is an effective antagonist for the control of the major postharvest pathogens on pome fruits at small and semi-commercial scale (Teixidó et al., 1998, 1999; Usall et al., 2000a; Viñas et al., 1996, 1998). It has also demonstrated high efficacy in commercial scale trials in packinghouses (Usall et al., 2000b). However, to be of practical use, microbial agents should be formulated in a usable form in order to optimise the efficacy, stability, safety and ease application of the product (Rhodes, 1993). The major obstacle in the commercialization of biocontrol products is the development of a shelf-stable formulated product that retains biocontrol activity similar

to that of the fresh cells of the agent (Janisiewicz and Jeffers, 1997). Drying of the product and maintenance in a dry environment or suspension in oil are approaches to formulate microbial agents so that they can be handled using the normal channels of distribution and storage (Rhodes, 1993).

In 1995, the US Environmental Protection Agency (EPA) registered the first biological control products against postharvest diseases of apple, pear and citrus fruits. Bio-Save 10 and Bio-Save 11 (based on different strains of *Pseudomonas syringae*) have been developed by EcoScience Corp. (Orlando, FL) and Aspire (based on *Candida oleophila* Montrocher) by Ecogen, Inc. (Langhorne, PA) (Janisiewicz and Jeffers, 1997).

In a previous work, Abadias et al. (unpublished data) studied the capability of *C. sake* cells to survive after a freeze-drying process in order to obtain a dry product with high viability. The effect of protective agents was studied and the maximum viability rate obtained was 40%. However, to be of practical use, higher viability is necessary in order to obtain a good formulated product for commercial application. In addition to the physiological characteristics of the micro-organism and the protectant, growth and rehydration medium, and drying process, together with subsequent storage conditions including temperature, atmosphere and relative humidity appear to be very important for the recovery of freeze dried cells (Andersen et al., 1999; Font de Valdez et al., 1985a).

Thus, in order to obtain a good stable dried product, the objectives of this work were: (a) to study the effect of the rehydration media on the recovery of freeze-dried *C. sake* cells, (b) to evaluate the best treatments for biocontrol of *Penicillium* rot on apples and (c) to evaluate the effect of the protectants, storage temperature and rehydration media on the stability of preserved *C. sake* cells.

MATERIALS AND METHODS

Cultures

The yeast used in this study was the strain CPA-1 of *Candida sake* obtained from UdL-IRTA, Catalonia, Spain. It was isolated from the apple surface and has previously been demonstrated to have antagonistic activity against *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus nigricans* on pome fruits (Viñas et al., 1998). It is deposited in Colección Española de Cultivos Tipo, CECT-10817 (Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, Burjasot, Valencia, Spain).

Growth conditions

Stock cultures were stored at 4°C and had been sub-cultured on nutrient yeast dextrose agar (NYDA: nutrient broth, 8 g/l; yeast extract, 5 g/l; dextrose, 10 g/l; agar, 15 g/l). The growth medium was nutrient yeast dextrose broth (NYDB). Cultures were grown in a 5-liter bench-top fermentor (Gallenkamp, Loughborough, Leicestershire, UK) containing 4 l of medium at 25 ± 1°C with constant stirring and aeration for 38 h. Cells were harvested at the beginning of the stationary phase by centrifugation at 8,315 × g for 10 min at 10°C in an Avanti™ J-25 centrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). The growth medium was decanted and the cell paste resuspended in 10-15 ml of 0.05 M potassium phosphate buffer (PB), pH 6.5, and centrifuged again. The resulting cell paste was stored at 4°C and used the same day.

Protective agents tested

10% (wt/vol) powdered skimmed non-fat milk (SM, Sveltesse®, Nestlé España, S.A., Barcelona, Spain) alone, and combinations of 10% fructose + 10% SM (F10SM10), 10% glucose + 10% SM (G10SM10), 5% glucose + 10% SM (G5SM10), 10% lactose + 10% SM (L10SM10), 5% lactose + 10% SM (L5SM10), 5% lactose + 5% SM (L5SM5), and 10% saccharose + 10% SM (S10SM10) were used as protectants during the freeze drying of *C. sake* cells.

Sample preparation

Cell paste, prepared as described previously, was resuspended in the sterilized protectant solution treatment and was maintained in a rotatory shaker for 30 min at room temperature. Ten-fold dilutions of this suspension were made in PB and 0.1 ml of the solutions were spread plated in duplicate onto the surface of 9 cm Petri plates in order to calculate the initial concentration. Plates were incubated at 25 ± 1°C for 48 h and the initial number of colony forming units per milliliter (CFU/ml) was calculated. Initial concentration of *C. sake* suspensions was about 1.0×10^9 to 4.5×10^9 CFU/ml.

Freeze-drying process

For each protectant treatment, 5 ml samples were distributed in 24 autoclaved vials (10 ml, Serum Type Reaction Vial, Supelco, Inc., Bellefonte, PA) and then were frozen at -20°C overnight. Thereafter, samples were connected to a freeze-drier (Cryodos, Telstar, S.A, Terrassa, Spain) operating at 1 Pa and -45°C for 24 h.

Rehydration media

For each protectant tested, water, PB, 10% SM, 5 and 10% saccharose (S), 0.1 and 1.0% peptone (P) were tested. Moreover, for each of the eight freeze-drying protectants tested, the same solution was used as a rehydration medium (Id). For example, when cells were protected during freeze-drying with L10SM10, they were rehydrated with the rehydration media mentioned above and with L10SM10 (L10SM10-Id).

Three replicates of each freeze-dried *C. sake* sample were rehydrated to its original volume (5 ml) with one of the eight different rehydration media tested. Rehydrated samples were left at room temperature for 10 min and then CFU/ml were determined by the plating as described previously. Serial dilutions were done with the same solution as the rehydration media. Plates were incubated at 25°C for 48 h. The number of viable cells were calculated by comparing prior to, and after freeze-drying and rehydration. The experiment was repeated twice with the eight best combinations of protectant + rehydration media.

The percentage of viable cells was analyzed by a General Lineal Model (GLM) procedure with Statistical Analysis System, SAS software (SAS Institute, version 6.12, Cary, NC, USA). As the results were expressed as a percentage, data normality was studied and data transformation was not necessary. The effect of protectants and rehydration media and their interaction were studied as variables. Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$. When the analysis was statistically significant Least Significance Difference Test (LSD) was used for separation of means.

Antagonistic activity of freeze-dried and rehydrated *C. sake* cells against *P. expansum* on apples

In order to evaluate the efficacy of freeze-dried *C. sake* cells against *P. expansum* on apples, freeze-dried cells were rehydrated as describe above and compared with fresh cells. Fresh cells were obtained by growing them in 100 ml conical flask containing 50 ml of NYDB. After 38 h, cells were centrifuged at $8,315 \times g$ for 10 min and resuspended in 50 ml of PB. Cell concentration was determined with an haemocytometer and then adjusted to 1×10^7 CFU/ml with PB. Moreover, freeze-dried *C. sake* cell concentration was also adjusted with PB to 1.0×10^7 CFU/ml.

Golden Delicious apples were wounded with a nail by making an injury 2 mm diameter and 2 mm deep, at the stem (top) and calyx (bottom). A 25 μ l suspension of the appropriate concentration of *C. sake* suspensions from each rehydrated treatment and fresh cells of *C. sake* were applied to each wound. Fruits were left to dry and then wounds were inoculated with 20 μ l of an aqueous suspension of *P. expansum*

(1.0×10^4 conidia/ml) which had been isolated from decayed apples and had shown to be highly pathogenic to apples. Five apples constituted a single replicate and each treatment was repeated three times. Treated apples were incubated at 20°C and 85% relative humidity for 5 days, after which the percentage of infected wounds (incidence) and the lesion diameters (severity) caused by *P. expansum* were measured.

ANOVA procedure of the SAS system was also performed on disease incidence and severity data. Percentages of infected wounds infected were transformed by the square root of the arcsine prior to analysis. This transformation was used to improve homogeneity of variances. Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$. When the analysis was statistically significant, LSD Test was used for means separation.

Storage stability of freeze-dried *C. sake* cells

In order to study the stability of the best treatments, vials containing the freeze-dried samples were sealed with laboratory film (Parafilm® 'M') and then kept in an airtight container filled with silica gel in order to avoid sample humidification. Samples were stored at 4 and 25°C. After 15, 30, 45 and 60 days, three replicate samples of each treatment and temperature were destructively sampled, rehydrated with the suitable rehydration media and the viability checked as described previously.

RESULTS

Viability of *C. sake* cell treatments after rehydration

The results of *C. sake* viability according to the protective agent and rehydration media used are shown in Table 1. Statistical analysis demonstrated that there were statistically significant effects ($P < 0.05$) of single sources (protectant and rehydration medium) and their interaction. Thus, the effect of rehydration media depended on the protectant used. However, water gave the worst results of all rehydration media tested. In general, for the eight protectants, SM (10%) was shown to be the one of the bests rehydration media tested. When the same solution used as protectant was used for rehydrating freeze-dried samples, the viability obtained was the highest in G10SM10, L5SM5 and G5SM10 treatments (43.4, 52.2 and 50.7%, respectively). When F10SM10, L10SM10 and S10SM10 were used as protectants, rehydration with 1% peptone also resulted in good recovery of *C. sake* cells after freeze-drying (45.3, 50.7 and 35.0%, respectively). The best viability was obtained with L5SM10 as a protectant and 10% SM as the rehydration medium (L5SM10-SM), with approx. 61% cell viability.

The experiment was repeated twice with the eight best combinations of protectant agents and rehydration media: (1) 10% lactose + 10% SM and rehydrated with 10% SM (L10SM10-SM); (2) 10% lactose + 10% SM and rehydrated with 1% peptone (L10SM10-P1); (3) 5% lactose + 10% SM and rehydrated with 10% SM (L5SM10-SM); (4) 5% lactose + 10% SM rehydrated with 5% lactose + 10% SM (L5SM10-Id); (5) 10% fructose + 10% SM 10% rehydrated with 10% SM (F10SM10-SM); (6) 10% fructose + 10% SM and rehydrated with 10% fructose + 10% SM (F10SM10-Id); (7) 5% lactose + 5% SM rehydrated with 5% lactose + 5% SM (L5SM5-Id) and (8) 5% glucose + 10% SM rehydrated with 5% glucose + 10% SM (G5SM10-Id). Samples containing fructose in the protectant solution did not dry properly during freeze-drying. Consequently, both fructose treatments were not subsequently used.

Table 1. Viability of *C. sake* cells (%) after freeze-drying with different combinations of protectant and rehydration media. Within rows (protectants), different letters indicate that there were significant differences ($P<0.05$) between different rehydration media used, according to a Least Significant Difference Test.

Protectant*	Rehydration media**							
	PB	Water	SM10%	S 5%	S 10%	P 0.1%	P 1%	Id [#]
SM 10%	10.3 ^b	7.9 ^b	22.6 ^a	19.2 ^a	11.0 ^b	10.3 ^b	11.0 ^b	22.6 ^a
L10SM10	30.1 ^b	14.2 ^d	48.6 ^a	17.4 ^{cd}	32.9 ^b	22.9 ^{bcd}	50.7 ^a	26.5 ^{bc}
S10SM10	29.8 ^a	8.6 ^c	28.3 ^a	10.6 ^{bc}	18.1 ^b	27.0 ^a	35.0 ^a	29.7 ^a
G10SM10	12.4 ^c	9.2 ^c	41.3 ^a	27.9 ^b	24.0 ^b	9.3 ^c	8.7 ^c	43.4 ^a
L5SM10	44.5 ^b	16.0 ^c	60.8 ^a	26.4 ^{de}	28.2 ^{cde}	38.9 ^{bcd}	41.7 ^b	46.9 ^b
F10SM10	40.7 ^b	17.2 ^d	53.3 ^a	24.0 ^{cd}	27.6 ^c	40.5 ^b	45.3 ^{ab}	48.0 ^{ab}
L5SM5	35.1 ^{bc}	27.4 ^c	37.7 ^{bc}	40.8 ^b	36.6 ^{bc}	30.4 ^{bc}	34.7 ^{bc}	52.2 ^a
G5SM10	28.6 ^{cd}	23.7 ^d	37.7 ^b	30.3 ^c	31.0 ^c	26.2 ^{cd}	32.4 ^{bc}	50.7 ^a

*: SM: Skimmed milk; L10SM10: Lactose 10% + SM 10%; S10SM10: Sucrose 10% + SM 10%; G10SM10: Glucose 10% + SM 10%; L5SM10: Lactose 5% + SM 10%; F10SM10: Fructose 10% + SM 10%; L5SM5: lactose 5% + SM 5% and G5SM10: glucose 5% + SM 10%.

** : PB: phosphate buffer, SM: Skimmed milk; S: saccharose; P: peptone and Id[#]: rehydration was done using the same solution used as protectant.

The viability obtained with the best combinations of protectants and rehydration media are shown in Table 2. The highest viability (85.3%) was obtained using L10SM10 as a protectant and 10% SM as a rehydration medium. The lowest viability of cells was obtained with the treatments L5SM5-Id (45.5%) and G5SM10-Id (44.9%), with survival significantly lower than the rest of the treatments ($P<0.05$). The four best treatments were used for testing biocontrol efficacy against *P. expansum* and storage stability described later.

Table 2. Viability of *C. sake* cells (%) after freeze-drying with the best combinations of protectant and rehydration media. Different letters indicate that there were significant differences ($P<0.05$) between treatments according to a Least Significant Difference Test.

Treatment*	Mean**	Std. error [#]
L10SM10-SM	85.3 ^a	3.4
L5SM10-SM	71.4 ^b	5.3
L5SM10-Id	62.0 ^{bc}	3.6
L10SM10-P1	59.4 ^c	10.6
L5SM5-Id	45.5 ^d	4.4
G5SM10-Id	44.9 ^d	4.1

*: L10SM10-SM: lactose 10% + SM 10% rehydrated with SM 10%; L5SM10-SM: lactose 5% + SM 10% rehydrated with SM 10%; L5SM10-Id: lactose 5% + SM 10% rehydrated with lactose 5% + SM 10%; L10SM10-P1: lactose 10% + SM 10% rehydrated with peptone 1%; L5SM5-Id: lactose 5% + SM 5% rehydrated with lactose 5% + SM 5% and G5SM10-Id: glucose 5% + SM 10% rehydrated with glucose 5% + SM 10%.

** : Results are means of six values obtained from two replications of the experiment.

[#] : Std. error: Standard error

Antagonistic activity of freeze-dried and rehydrated *C. sake* cells against *P. expansum* on apples

Laboratory experiments showed that all *C. sake* treatments significantly inhibited development of blue mold (Fig. 1). Both incidence and severity of *P. expansum* on apples treated with freeze-dried *C. sake* cells were reduced up to 40 and 60%,

respectively. Within freeze-dried treatments, the best ones were L10SM10 rehydrated with 1% peptone and L5SM10 rehydrated with L5SM10 with disease incidence reduced by 66 and 53%, and a reduction in severity of 74 and 71%, respectively. However, rehydrated freeze-dried cells showed significantly lower biocontrol ($P<0.05$) than fresh cells.

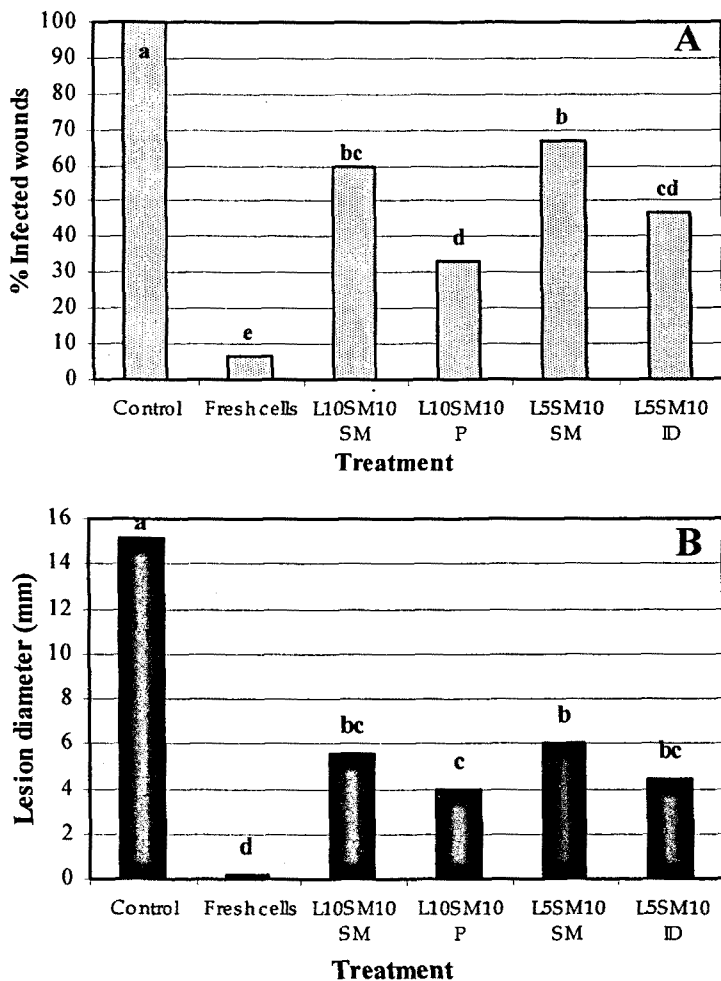


Figure 1. Efficacy of the freeze-dried *C. sake* treatments compared with fresh cells in reducing the development of *P. expansum* on apples. Fruits were artificially wounded and inoculated with freeze-dried or fresh antagonist at 1.0×10^7 CFU/ml and *P. expansum* at 1.0×10^4 conidia/ml. Fruits were stored at 20°C for 5 days. (A) Percentage of infected wounds and (B) Lesion diameter. Different letters in the same figure indicate that there are significant differences between means according to Least Significant Difference Test ($P<0.05$).

Storage stability of freeze-dried *C. sake* cells

Temperature greatly influenced the survival of freeze-dried *C. sake* cells under tested storage conditions. Better results were obtained at 4°C than at 25°C (Fig. 2) and differences between treatments were more marked at 4°C than at 25°C. Regardless of time, cells freeze dried with L10SM10 and rehydrated with 10% SM and stored at 4°C had a significantly higher viability ($P<0.05$) than the other treatments, but the viability after 60 days storage was only 10% when compared to that of cells prior to freeze-drying. In L10SM10 rehydrated with 1% peptone and stored at 4°C, a loss of viability was apparent during the first 30 days of storage followed by a stabilization in colony counts. The rest of assayed treatments showed a similar pattern with a gradual decrease in viability.

DISCUSSION

This study demonstrates that for yeasts such as *C. sake* both the protectants used during freeze drying and the rehydration medium have an important influence on the level of viability as well as the biocontrol potential. A significant increase in viability was demonstrated when cells were rehydrated with a protectant solution instead of water. Survival of 60 and 85% was obtained with the best combinations of treatments. This demonstrated a notable increase in viability compared with preliminary studies in which phosphate buffer was the rehydration medium (Abadias et al., unpublished data).

There was an interaction between the protectant used during freeze-drying and the rehydration medium. Thus, the effect of the rehydration medium depended to some extent on the protectant used. However, 10% SM was shown to be a good rehydration medium for all protectants tested. In general, very high survival of *C. sake* cells was achieved when the same solution tested as protectant was used to rehydrate dried samples. A significant loss of viability of *C. sake* cells was detected when water was used for rehydration. The use of 10% lactose + 10% SM as a protectant during freeze-drying and subsequent rehydration with 10% SM resulted in the highest *C. sake* cell viability (85%). Milk might supply a large variety of nutrients that enhance the recovery of *C. sake* cells after freeze-drying. It is possible that rehydration in a solution of high osmotic pressure probably controls the rehydration rate and thus reduce possible damage (Ray et al., 1971). Costa et al. (2000) demonstrated that the viability of the bacterial biocontrol agent, *Pantoea agglomerans*, after lyophilization using 10% sucrose as a protective agent was higher with 10% SM for rehydration than with phosphate buffer. Similarly, Sinha et al. (1982) found that sucrose, dextrose, SM and 10% peptone were the best rehydration media of freeze-dried cells of streptococci. More complex rehydration media, such a broth containing a combination of peptone,

yeast extract, tryptone, glucose, Tween 80 and formic acid gave good results with the streptococci and *Leuconostoc* spp. (Font de Valdez et al., 1985b).

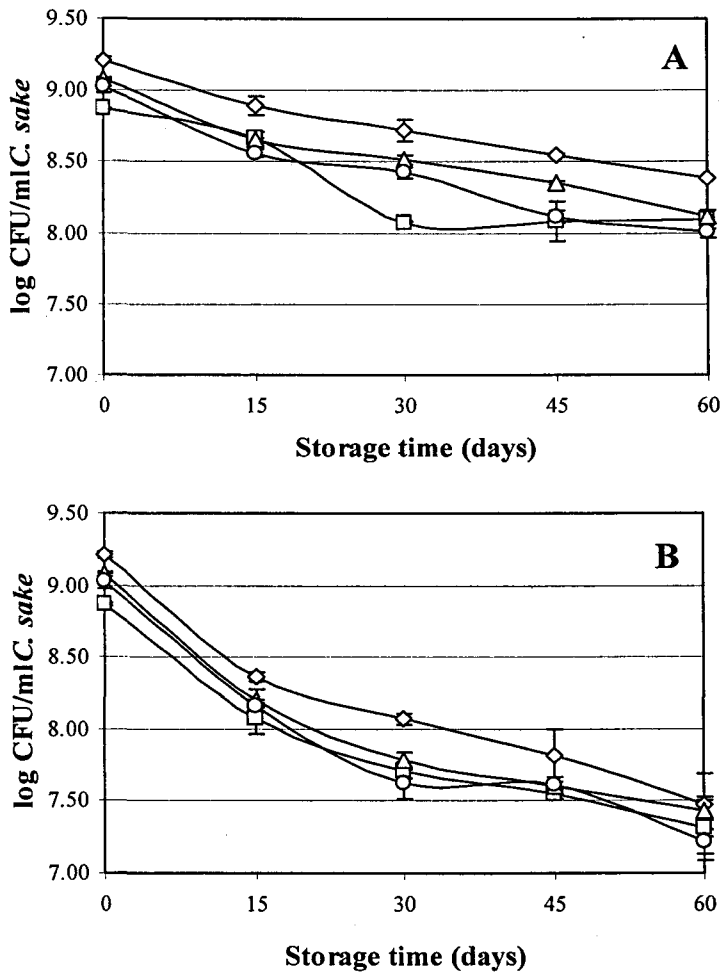


Figure 2. Effect of the protectant-rehydration media (◇) = L10SM10-SM; (□) = L10SM10-P; (△) = L5SM10-SM and (○) = L5SM10-Id on the stability of freeze-dried *C. sake* at (A) 4°C and (B) 25°C. Points represent the means of four replications and vertical bars indicate standard errors of the means. Where bars are not shown they were smaller than symbol size.

Our studies of biocontrol of freeze-dried *C. sake* against *P. expansum* on apples have shown that freeze-dried treatments were not as effective as fresh cells when they were applied at the same concentration. However, >65% control of blue mold decay on apples was obtained when cells were freeze-dried using L10SM10 as a protectant and 1% peptone for rehydration. Lower efficacy of freeze-dried cells may be partially attributed to the damaged cells, which could not totally recover their functions after the dehydration-rehydration process. The mode of action of *C. sake* is probably nutrient competition and/or site exclusion (Viñas et al., 1998). Thus, it might be possible that reconstituted freeze-dried cells do not recover their metabolism quickly enough to prevent *P. expansum* development in the fruit wounds. The duration of the reactivation period depends on the character and level of intracellular damages, and it was established that dried yeasts inoculated in a nutrient medium have a longer lag-phase than fresh cells (Beker and Rapoport, 1987). It is noteworthy that the treatment which had lower viability (L10SM10 as a protectant and 1% peptone for rehydration) showed better biocontrol of *Penicillium* rot than the other treatments examined. It is possible that cells that have suffered injury during the freeze-drying process recover their physiological activity faster when they are rehydrated with peptone than with SM or L5SM10. However, when L10SM10 was used as a protectant and 1% peptone for cell rehydration, a higher dosage of product was necessary in order to achieve the desirable concentration of viable cells, because of the lower viability level. One possible solution to increase efficacy of freeze-dried cells could be to increase the time between rehydration of the cells and application to fruits, allowing a better recovery of cells.

Previous commercial trials by Droby et al. (1998) studied the efficacy of a dry formulation of *Candida oleophila* (Aspire) on citrus fruit, and found a reduction in the incidence of decay by 45-60%. They obtained better results using a combination of Aspire plus the fungicide thiabendazole and concluded that Aspire as a stand-alone treatment was not sufficient to reduce the decay to commercially acceptable levels. In laboratory conditions, Janisiewicz and Jeffers (1997) found that a dry wettable powder formulation of the strain ESC-11 (Biosave® 11 WP) of *Pseudomonas syringae* performed as well as fresh cells in controlling *P. expansum* Link and *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. diseases on apples. In the same study, ESC-10 WP formulation (BioSave® 10 WP) significantly reduced the incidence of disease but less effectively than the fresh cells. At present, new formulations of *P. syringae* ESC-10 and 11 (Bio-Save® 100 and 110, respectively) are commercialized as frozen cell concentrated pellets, which must be kept and delivered under freezer conditions.

We have also demonstrated that the stability of freeze-dried *C. sake* cells depended both on the storage temperature and on the combination of suspending-rehydrating medium used. The combination that provided the best stability was L10SM10 as a

protectant and SM for rehydration, with a 6-fold decrease in viability after 2 months of storage at 4°C. This corresponded to a final viability of only 10% with respect to the initial concentration prior to freeze-drying, a result which is not satisfactory for a formulated product. Font de Valdez and Diekmann (1993) studied the viability of freeze-dried *Lactobacillus reuteri* and observed a viability loss of 5.8-5.6 log units after 6 months of storage at 25°C using maltose as a protectant, but a decrease of 1.6-2.8 log units when they used glutamate. At 4°C they observed a lower decrease in viability. The observed loss of viability after storage could be explained by the presence of air in contact with the stored cells. Oxygen is thought to interact with the membranous system, causing damage to the initiation of DNA synthesis (Israeli et al., 1975). Beker and Rapoport (1987) suggested the addition of anti-oxidants, thiourea, sorbitane esther and some other additives into *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to their drying in order to increase the stability of dried cells during storage.

We have found that freeze-dried *C. sake* cells using L10SM10 as protectant and SM10% as rehydration media had high viability (85%) and showed a 40% reduction of blue mold incidence and 67% reduction of blue mold severity. However, shelf-life of the obtained dried product was low at both 4 and 25°C. Storage of dried product at 25°C would alleviate transport, although refrigeration should not be a problem in packinghouses. Consequently, further attempts to stabilize freeze-dried *C. sake* cells during storage at room and cold temperature must be made. Next step in this research might be to study the effect of the modification of storage atmosphere, for example nitrogen or vacuum, or the addition of antioxidant compounds in order to prevent cell oxidation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. N. Magan from Cranfield University, UK, for his valuable discussion and advise, to the Spanish Government (MEC Ministerio de Educación y Cultura) and CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología grant ALI99-0652-C02-01) for their financial support.

REFERENCES

- Andersen, A.B., M.S. Fog-Petersen, H. Larsen, and L.H. Skibsted. 1999. Storage stability of freeze-dried cultures (*Streptococcus thermophilus*) as related to physical state of freezing matrix. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 32:540-547.
- Beker, M.J., and A.I. Rapoport. 1987. Conservation of yeasts by dehydration. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 35:127-171.

- Bertrand, P.F., and J.L. Saulie-Carter. 1978. The occurrence of benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in the mild-Columbia region of Oregon and Washington. *Plant Dis. Rep.* 62:305-320.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixidó, N. García, and I. Viñas. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* (In Press).
- Droby, S., L. Cohen, A. Daus, B. Weiss, B. Horev, E. Chalutz, H. Katz, M. Keren-Tzur, and A. Shachnai. 1998. Commercial testing of Aspire: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control* 12:97-101.
- Font de Valdez, G., and H. Diekmann. 1993. Freeze-drying conditions of starter cultures for sourdoughs. *Cryobiology* 30:185-190.
- Font de Valdez, G., G. Savoy de Giori, A. Pesce de Ruiz Holgado, and G. Oliver. 1985a. Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology* 22:574-577.
- Font de Valdez, G., G. Savoy de Giori, A. Pesce de Ruiz Holgado, and G. Oliver. 1985b. Effect of the rehydration medium on the recovery of the freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1339-1342.
- Israeli, E., A. Kohn, and J. Gitelman. 1975. The molecular nature of damage by oxygen to freeze-dried *Escherichia coli*. *Cryobiology* 12:15-25.
- Janisiewicz, W.J., and S.N. Jeffers. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protect.* 16:629-633.
- National Research Council. 1987. Regulating pesticides in foods-The Delaney paradox. Natl. Res. Counc. Board Agric. Natl. Academic Press, Washington, DC.
- Ray, B., J.J. Jezeski, and F.F. Busta. 1971. Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. *Appl. Microbiol.* 22:184-189.
- Rhodes, D.J. 1993. Formulation of biological control agents, p. 411-439. In D.G. Jones (ed.), *Exploitation of microorganisms*. Chapman & Hall, London.
- Rosenberg, D.A., and F.W. Meyer. 1981. Postharvest fungicides for apples: Development of resistance to benomyl, vinclozolin and iprodione. *Plant Dis.* 65:1010-1013.
- Sinha, R.N., A.K. Shukla, M. Lal, and B. Ranganathan. 1982. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. *J. Food Sci.* 47:668-669.
- Spotts, R.A., and L.A. Cervantes. 1986. Population, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis.* 70:106-108.
- Teixidó, N., J. Usall, and I. Viñas. 1999. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mold on apples during cold storage. *Int. J. Food Microbiol.* 50:203-210.

-
- Teixidó, N., I. Viñas, J. Usall, and N. Magan. 1998. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* 88:960-964.
- Usall, J., N. Teixidó, E. Fons, and I. Viñas. 2000a. Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 58:83-92.
- Usall, J., N. Teixidó, R. Torres, X. Ochoa de Eribe, and I. Viñas. 2000b. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol. Tec.* In Press.
- Viñas, I., J. Usall, and V. Sanchis. 1991. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest fungicide treatment in apple packinghouses in Lleida (Spain). *Mycopathology* 113:15-18.
- Viñas, I., J. Usall, N. Teixidó, E. Fons, and J. Ochoa De Eribe. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples with a new strain of *Candida sake*. *Proc. British Crop Protection Conference, Pests and Diseases* 6C:603-608.
- Viñas, I., J. Usall, N. Teixidó, and V. Sanchis. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40:9-16.
- Viñas, I., N. Vallverdú, S. Monllao, J. Usall, and V. Sanchis, 1993. Imazalil resistant *Penicillium* isolated from Spanish apple packinghouses. *Mycopathologia* 123:27-33.

Capítol 5

Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*

M. Abadias, N. Teixidó, J. Usall, I. Viñas and N. Magan

Journal of Applied Microbiology, en premsa

SUMMARY

Aims: To evaluate the effect of modifications of water activity (a_w , 0.996-0.92) of a molasses medium with different solutes (glycerol, glucose, NaCl, proline or sorbitol) on growth, intracellular water potentials (ψ_c), and endogenous accumulation of polyols/sugars in the biocontrol yeast *Candida sake*.

Methods and Results: Modification of solute stress significantly influenced growth, ψ_c and accumulation of sugars (glucose/trehalose) and polyols (glycerol, erythritol, arabitol and mannitol) in the yeast cells. Regardless of the solute used to modify a_w , growth was always decreased as water stress increased. *C. sake* cells grew better in glycerol and proline-amended media, but were sensitive to NaCl. The ψ_c measured using psychrometry showed significant effect of solutes, a_w and time. Cells from the 0.96- a_w NaCl treatment presented the lowest ψ_c value (-5.20 MPa); cells from unmodified media ($a_w=0.996$) had the highest (-0.30 MPa). In unmodified medium, glycerol was the predominant reserve accumulated. Glycerol and arabitol were the major compounds accumulated in media modified with glucose or NaCl. In proline media, arabitol concentration increased. In glycerol and sorbitol-amended media, the concentration of glycerol rose. Some correlations were obtained between compatible solutes and ψ_c .

Conclusions and significance: This study demonstrates that subtle changes in physiological parameters significantly affect the endogenous contents of *C. sake* cells. It may be possible to utilise such physiological information to develop biocontrol inocula with improved quality.

Key words: *Candida sake*, biocontrol, polyols, water stress tolerance, compatible solutes

INTRODUCTION

Biological control is emerging as the most effective alternative to chemicals in controlling postharvest diseases of fruits and vegetables (Wilson and Pusey 1985; Janisiewicz 1988; Wilson and Wisniewski 1989; Janisiewicz 1990). Recently, detailed studies have shown that strain CPA-1 of the yeast *Candida sake* is an effective antagonist of the major fungal pathogens of pome fruits (Usall 1995; Viñas *et al.* 1996, 1998; Teixidó *et al.* 1998a). The commercial development of this yeast as a biocontrol agent requires an economic system which can produce a large quantity of inoculum of consistent quality.

Water potential (ψ_w) is a fundamental parameter widely accepted for quantifying the energy state of water in inorganic solutions. It can be expressed in terms of water activity (a_w) (Marechal and Gervais 1994). The total water potential of a cell (ψ_c) is thus the sum of both, the osmotic potential of the cytoplasm (ψ_s) and the turgor pressure (ψ_p) of the cell wall (Blomberg and Adler 1992). When cells are exposed to water stress, low molecular mass compounds are synthesized or accumulated intracellularly to equilibrate the cytoplasmic ψ_c with that of the surrounding environment (Yancey *et al.* 1982; Csonka 1989). The main solutes accumulated in yeasts exposed to osmotic stress are sugar alcohols (polyols) such as glycerol, arabitol, mannitol and *meso*-erythritol (Spencer and Spencer 1978). The disaccharide trehalose has also been referred to as a compatible solute (Rudolph *et al.* 1993) although it does not contribute to the microbial internal osmoticity. However, it is important in dry conditions as it prevents cell dehydration and membrane damage (Leslie *et al.* 1994). The amount and type of polyol accumulation is thought to be related to the yeast species, the growth phase of the yeast (Nobre and Da Costa 1985) and the carbon sources used for growth (Van Eck *et al.* 1989).

Recent studies by Teixidó *et al.* (1998b,c) demonstrated that in nutrient-rich media modified with glucose or glycerol, modifications in growth occurred accompanied by significant changes in accumulations of endogenous polyols and sugars. In some cases, such modifications resulted in improved tolerance to water stress with retained biocontrol efficacy (Teixidó *et al.* 1998a,b). However, very little is known about the growth and endogenous changes which might occur in heterogeneous cheap media based on by-products from industry such as molasses, and when such substrates are modified nutritionally or environmentally.

The objectives of this study were to determine the effect of modifying the a_w of a molasses based medium with different solutes on (1) temporal growth, (2) intracellular water potential and (3) endogenous accumulation of polyols and sugars in cells of *C. sake*.

MATERIALS AND METHODS

Yeast isolate

The isolate used in this study was *Candida sake* (strain CPA-1) from UdL-IRTA (Lleida, Spain). Stock cultures were stored at 5°C and subcultured on nutrient yeast dextrose agar (NYDA; nutrient broth, 8 g l⁻¹; yeast extract, 5 g l⁻¹; dextrose, 10 g l⁻¹; agar, 15 g l⁻¹).

Basic media

Molasses medium (control; cane molasses 40 g l⁻¹; urea 1.2 g l⁻¹) was used as the basal medium. It had a pH of 6.3-6.6 and a water activity (a_w) of 0.996, which corresponds to -0.54 MPa Ψ_w . The a_w of this and all media was determined with a Novasina Humidat IC II (Novasina AG, Zurich, Switzerland). Solid basic medium was obtained by the addition of 15 g l⁻¹ of agar (Technical agar No. 2, Oxoid, Basingstoke, UK).

Effect of water activity and solute on *C. sake* growth rates

Initial studies were carried out with the basic solid molasses medium modified with the ionic solute NaCl (Lang 1967) and the non-ionic solutes glycerol (Dallyn and Fox 1980), glucose (Scott 1957), sorbitol (Sancisi-Frey 2000) and proline (Chirife *et al.* 1980) to obtain 0.98, 0.96, 0.94 and 0.92 a_w , which is equal to -2.78, -5.62, -8.60 and -14.50 MPa Ψ_w (Magan 1997). The composition of the media used is shown in Table 1. The pH of all media was between 5.60 and 6.80.

Table 1. Composition of modified media (g of solute to be added to 100 ml of water). The final volume was measured and then corresponding cane molasses and urea was added to obtain a final concentration of 40 g molasses per liter and 1.2 g urea per liter.

Solute	Water activity			
	0.98	0.96	0.94	0.92
Glycerol	9.20	18.40	32.20	41.40
Glucose	18.73	39.85	60.9	77.66
NaCl	3.55	7.01	10.35	13.50
Sorbitol	19.82	30.75	50.00	54.66
Proline	10.00	20.00	26.00	32.00

Media were inoculated by spread plating a 0.1 ml aliquot of a 10³ colony-forming units (cfu) ml⁻¹ yeast suspension grown for 38 h on NYDA medium. Plates were incubated at 25°C and examined visually every 24 h to determine whether colonies had grown on the different treatments. All treatments were carried out with four replicates. Media of the same a_w were always sealed in plastic polyethylene bags to maintain the equilibrium relative humidity conditions and to prevent water loss.

Evaluation of growth of *C. sake* cells in unstressed and water-stressed liquid media

C. sake was grown in non-modified and modified liquid molasses media. Modified molasses media were prepared at 0.98 and 0.96 of a_w with the addition of glycerol (Gly98, Gly96), glucose (Glu98, Glu96), NaCl (Na98, Na96), sorbitol (Sor98, Sor96) and proline (Pro98, Pro96) as described in Table 1. For each treatment 50 ml medium in 250-ml conical flasks were inoculated with a known concentration of *C. sake* (10^4 CFU ml⁻¹) and were cultured with agitation on a rotatory shaker (150 rev min⁻¹) at 25°C. After 24, 48 and 72 h of incubation, four replicates of each treatment were destructively sampled to measure growth, cell water potential and to obtain yeast cells for quantifying polyol and sugar concentrations. Growth rates of each treatment were determined turbidimetrically as follows, 1 ml subsample of each different solution was diluted 10-fold with de-ionized water, placed in a 1-ml cuvette, and the optical density determined with a spectrophotometer (CECIL CE 1020; CECIL Instruments Ltd, Cambridge, UK) set at 700 nm (O.D₇₀₀) with reference in each case to a 10-fold sterile solution of the same composition and a_w as the growth medium. All experiments were carried out with four replicates.

Water potential measurements

Thermocouple psychrometry was used to determine the water potential of the cells. After 24, 48 and 72 h a 25-ml subsample of each treatment was placed in a 30 ml sterile plastic Universal bottle and centrifuged immediately for 15 min at 250 g in a MSE Centaur 2 centrifuge (Norwich, UK). The medium was decanted and cell paste put into the sample well. A HR-33T Dew Point Microvoltmeter coupled to a C-52 chamber was used (Wescor Inc, Logan, Utah, USA). All measurements were made in the dew point mode, after calibration with a series of NaCl solutions of known ψ_s . Two measurements of each replicate were made and the μ V reading converted to ψ .

Extraction and detection of intracellular sugars and polyols

Another 25 ml subsample of each treatment was placed in a sterile 30-ml Universal bottle and centrifuged immediately for 15 min at 250 g (MSE Centaur 2). The yeast pellets were resuspended in high performance liquid chromatography (HPLC)-grade water and centrifuged again to remove any residual liquid medium.

A known fresh weight of *C. sake* cells (10-25 mg) was mixed with 1 ml HPLC-grade water in a 2-ml Eppendorf tube and sonicated with a 4-mm sonicator probe for 2 min at an amplitude of 26 μ m (Soniprep 150, Fisons, Fisher Scientific UK, Loughborough, UK). After immersion in a boiling water bath for 5 min, the samples were left to cool

and 0.67 ml of acetonitrile was added to each sample to obtain the same ratio of acetonitrile:water as the mobile phase (40:60). The Eppendorf tubes were centrifuged for 10 min at 1150 g and the supernatant was filtered through 0.2- μm filters into HPLC vials sealed with plastic septa. Solutes were analysed and quantified by HPLC using a Hamilton HC-75 Ca^{2+} column (ANACHEM Ltd, Luton, UK) and a Gilson RI Detector, specifically for sugar/polyol separation (Teixidó *et al.* 1998b,c; Pascual *et al.* 2000). The mobile phase used was a mixture of 40:60 degassed acetonitrile:water. The peak areas were integrated and compared with calibration curves constructed with standards of 100-800 p.p.m. of each solute analysed. Polyols, trehalose and glucose content were calculated as $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight of *C. sake* cells ($\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w). In all cases four replicates of each treatments were analysed.

Statistical treatment of the results

Growth (O.D_{700}), water potential and polyol/sugar concentration were analysed by a General Linear Model (GLM) analysis with SAS software (version 6.12; SAS Institute, Cary, NC, USA). Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$. When the analysis was statistically significant, the Duncan's Multiple Range Test for separation of means was used. This enabled the statistical significance of single, two and three-way interactions to be examined for all experiments. Moreover, Pearson correlation coefficients between endogenous reserves and cell water potential were calculated using PROC CORR procedure with SAS software.

RESULTS

Effect of a_w and solute on *C. sake* growth rates

The number of days to initiation of growth (lag phase) with each solute treatment are shown in Fig. 1. The lag phase at 0.98 a_w was the same as that on unmodified medium (a_w 0.99), except for NaCl. For 0.96 a_w treatments growth was delayed for 3 d in media modified with glucose, sorbitol, glycerol and proline, and 4 d for those modified with NaCl. In the driest media ($a_w < 0.94$) at least 3 d were required to count cells because of slow growth. With the ionic solute NaCl, and glucose at 0.94 and 0.92 a_w the lag phase prior to growth was significantly longer than with the other solutes. There was no growth at 0.92 a_w in NaCl-modified media, even after 15 d.

The number of viable colonies growing on media containing different solutes varied significantly, although in all cases the numbers decreased with increasing water stress (see Fig. 1). Interestingly, the number of viable colonies on proline modified media at a_w 0.98 was higher than that on the unmodified medium. At $a_w < 0.96$ *C. sake* cells were less tolerant of solutes and the number of viable colonies was significantly reduced. At

identical a_w levels the growth of *C. sake* cells was lowest in the NaCl treatments. The response of *C. sake* cells to sorbitol and glycerol modified media were similar. The sensitivity of *C. sake* cells to $a_w < 0.96$ meant that lower water stress treatments were not included in subsequent studies.

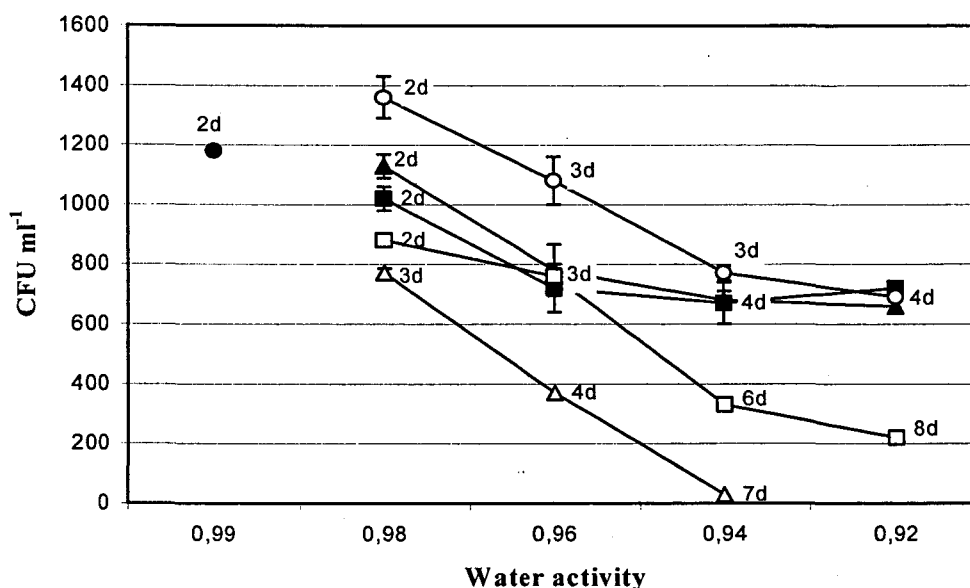


Fig. 1. Number of colonies of *Candida sake* present in unmodified molasses medium (●) and that modified with glycerol (■); sorbitol (▲); proline (○); glucose (□) and NaCl (△). The number of days (d) to initiation of growth are shown. The bars represent the standard error of the means. Where the bars are not shown they were smaller than the symbol size.

Evaluation of growth of *C. sake* cells in unstressed and water-stressed liquid media

Figure 2 shows that growth decreased as the a_w of the liquid media was reduced, and there was an increase in the lag phase under greater water stress. In unmodified molasses medium, the growth of *C. sake* cells was significantly higher than in the media modified with the five solutes tested, regardless of incubation time. For all solute treatments, growth in the 0.96 a_w media was always the slowest. There was also a marked difference in growth depending on the solute used to modify water stress. In general, after 48 h of incubation, growth in NaCl and sorbitol-modified media was the slowest, while glycerol gave the best results among the solutes tested. Proline and glycerol-modified media exerted the least water stress at 0.96. At 48 and 72 h there were significant differences between growth of *C. sake* cells in the unmodified (control) and 0.98 a_w treatments.

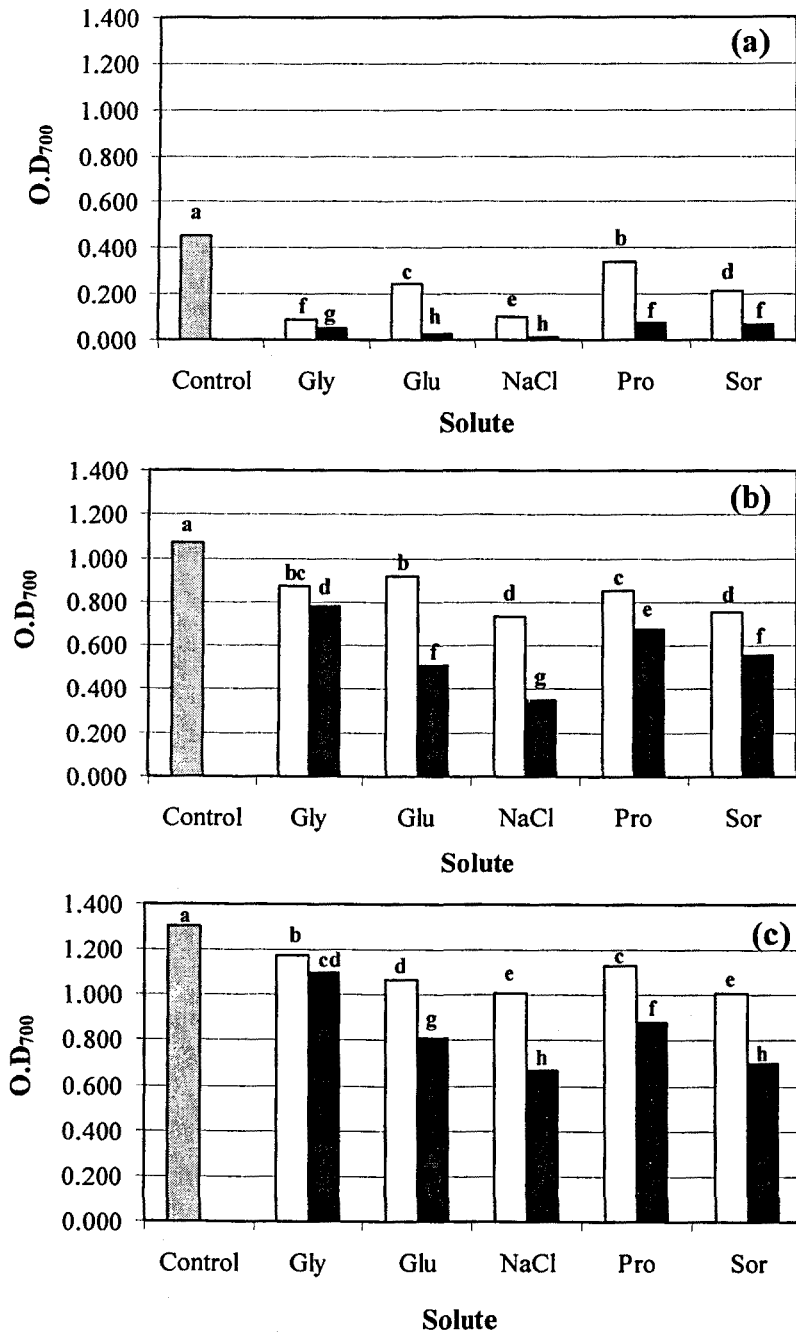


Fig. 2. Comparison of growth (O.D₇₀₀) of *Candida sake* cells at different times; (a) 24 h, (b) 48 h and (c) 72 h; in relation to the solute used to adjust the a_w . Treatments are: control, 0.996 a_w (▨); 0.98 a_w (□) and 0.96 a_w (■). The separation of means for each time was conducted according to Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$). Columns with different letters indicate significant differences between treatments.

Water potential measurements of *C. sake* cells

Results of Ψ_c are shown in Table 2. Yeast cells grown in unmodified molasses medium had the highest Ψ_c value (>-0.41 MPa), while NaCl treatments gave the lowest value at both a_w levels tested (<-2.85 MPa for Na98, and <-5.15 MPa for Na96). For each solute tested, a decrease in a_w of the media caused a decrease in Ψ_c . Among the solutes tested, cells grown in glucose-modified media had the highest Ψ_c value followed by those grown in proline and glycerol. In this study there were statistically significant differences due to all single factors, and two and three-way interactions, with the exception of $a_w \times$ time for all tested treatments (Table 3).

Table 2. Means of cell water potential, ψ_c (MPa) of *C. sake* cells after incubation for 24, 48 and 72 h at 25°C in modified and non-modified molasses media. Within columns, values with different letters indicate significant differences between treatments according to a Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

a_w	SOLUTE	24 h	48 h	72 h
0.996	Control	-0.28 ^a	-0.31 ^a	-0.41 ^a
	Glycerol	-2.61 ^d	-2.30 ^c	-2.51 ^c
	Glucose	-1.37 ^b	-1.04 ^b	-0.94 ^b
0.98	NaCl	-3.07 ^e	-2.86 ^d	-2.85 ^d
	Sorbitol	-2.94 ^e	-2.97 ^d	-2.73 ^{cd}
	Proline	-2.22 ^c	-2.42 ^c	-2.65 ^{cd}
0.96	Glycerol	-3.30 ^f	-3.24 ^e	-3.19 ^e
	Glucose	*	-2.39 ^c	-2.65 ^{cd}
	NaCl	*	-5.15 ^h	-5.25 ^h
0.96	Sorbitol	-4.27 ^g	-4.11 ^f	-3.99 ^f
	Proline	-4.64 ^h	-4.61 ^g	-4.65 ^g

*: There were not enough cells for ψ_c measurements

Table 3. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), solute (sol), and time (t) two and three-way interactions on water potential of *C. sake* grown in non-modified and modified molasses medium.

Source	DF	MS	F	Pr>F
sol	5	13.79064702	673.92	0.0001**
a_w	1	63.08086366	3082.61	0.0001**
t	2	0.11231411	5.49	0.0056*
sol \times a_w	4	2.33106653	113.91	0.0001**
sol \times t	8	0.11174611	5.46	0.0001**
a_w \times t	2	0.02824889	1.38	0.2566 NS
sol \times a_w \times t	6	0.06462537	3.16	0.0073*

Note: MS, mean square; ** significant $P < 0.001$; * significant $P < 0.05$; NS, not significant.

Intracellular sugar and polyol accumulation

The quantities of individual sugars and sugar alcohols accumulated in *C. sake* cells after 48 h incubation at 25°C are shown in Fig. 3. For each solute used to adjust a_w , intracellular glucose and mannitol concentrations were not statistically significantly different in the a_w treatments studied. In the unmodified molasses medium, glycerol was found to be the predominant intracellular compatible solute (23.7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w). In glycerol treatments (Fig. 3a) glycerol was also the highest polyol accumulated (about 118 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w for both glycerol treatments used). However, trehalose, erythritol and mannitol were not detected. Glycerol and arabitol were the main solutes accumulated in *C. sake* cells which were grown in glucose, and NaCl stressed media (Fig. 3b, c, respectively). When the molasses medium was modified with sorbitol (Fig. 3d), glycerol was also the highest intracellular solute synthesized in the cells. However, it was detected at significantly lower concentration than in the glycerol treatment (Sor98, 50.1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w; Sor96, 82.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w). Cells from the Pro96 treatment (Fig. 3e) accumulated the highest amount of arabitol (about 70 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w). Small quantities of trehalose were detected in Na96, Sor98, Sor96 and Pro98 treatments. Erythritol was only found in cells harvested from unmodified molasses medium (13.7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w) and from the Glu96 treatment (1.92 $\mu\text{mol g}^{-1}$ f.w).

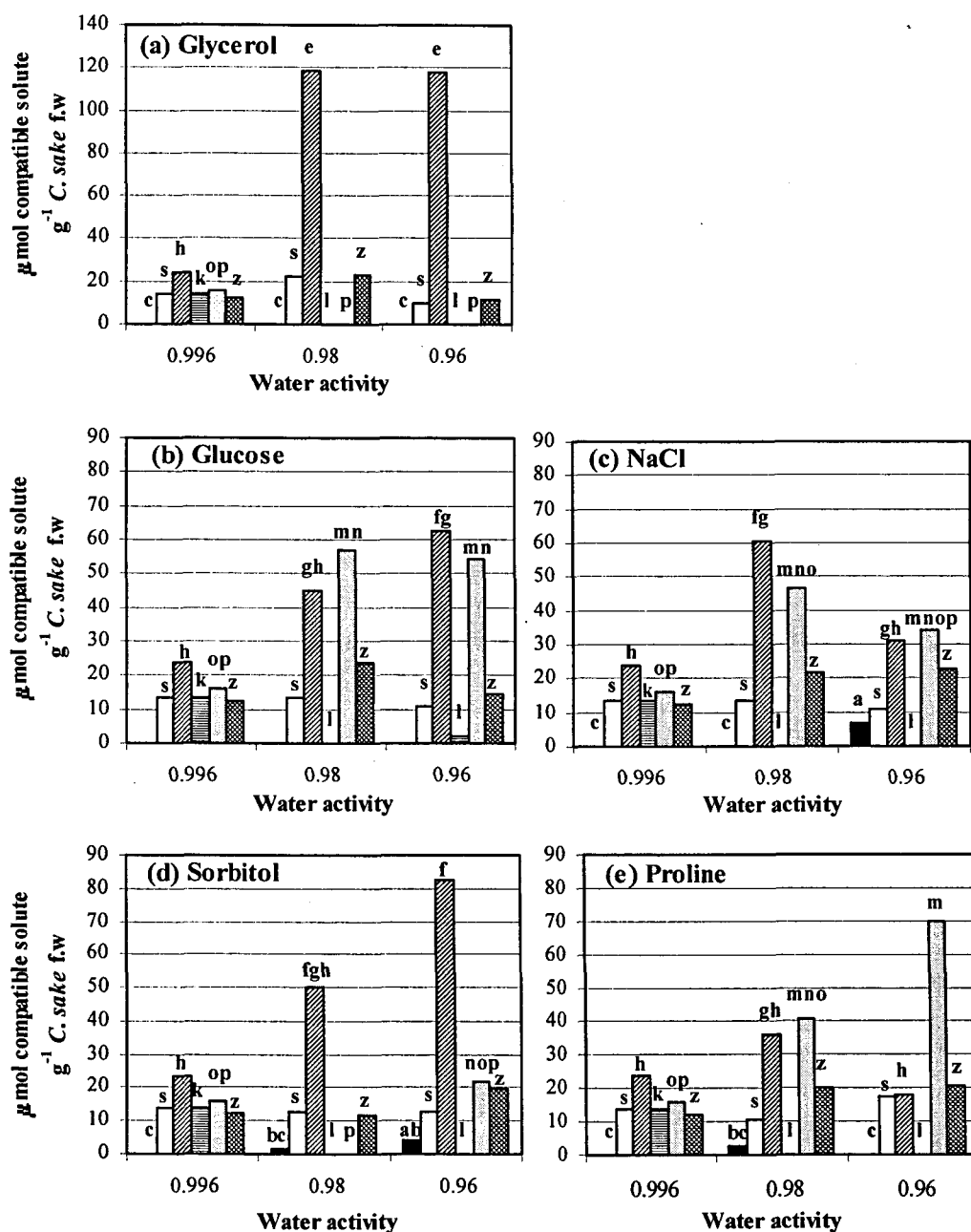


Fig. 3. Endogenous concentration of sugars (trehalose (■) and glucose (□)) and sugar alcohols (glycerol (▨), erythritol (▩), arabinol (▧) and mannitol (▦)) expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ of *C. sake* fresh weight after 48 h the a_w , and solute used. Solute treatments are: (a) glycerol; (b) glucose; (c) NaCl; (d) sorbitol and (e) incubation at 25°C in relation to proline. For each individual sugar/sugar alcohol, treatments with different letters show statistical differences ($P < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range Test (a, b and c are for separation of menas of trehalose; s for glucose; e, f, g and h for glycerol; k and l for erythritol; m, n, o and p for arabinol, and z is for mannitol).

The results of correlations between sugar/polyols concentrations and ψ_c for each individual a_w modifying solute are shown in Table 4. In each treatment, except for sorbitol, there was a good correlation between ψ and the total polyols. On glycerol-amended media, a positive strong-moderate association between glycerol and ψ_c was found (Pearson coefficient 0.71). In glucose-modified treatments, a weaker positive correlation between glycerol, glucose or arabitol and ψ_c was found (Pearson coefficients 0.54, 0.46 and 0.45, respectively). Arabitol was found to be a solute which had a weak correlation with ψ_c in the NaCl treatments (Pearson coefficient 0.51). In yeast cells grown in proline-amended media, the highest correlation was found with the total amount of solutes analysed (Pearson coefficient 0.54).

DISCUSSION

This study is the first investigation of the impact that changes in solute stress has on growth of the yeast *C. sake*, endogenous sugar/polyol accumulation and cell water potentials in cheap by-products from the sugar processing industry. It has clearly been shown that a_w and solute type have a significant effect on lag phase prior to growth, growth rates, ψ_c and the endogenous accumulation of sugars and polyols.

The initial studies on solid molasses media demonstrated that the amino acid proline could stimulate growth at low concentrations, while the ionic solute NaCl was toxic at high concentrations ($>1.78 \text{ mol l}^{-1}$). Even at 0.98 and 0.96 a_w cells were less tolerant of NaCl than with non-ionic solutes, and no growth was observed at 0.92 a_w in NaCl-modified molasses media. Similar results were obtained by Teixidó *et al.* (1998c), who pointed out that the $a_w \times$ temperature range for growth of *C. sake* in defined NYDB medium with the ionic solute NaCl was more limited than with the non-ionic solute glycerol. High concentrations of glucose ($a_w < 0.94$) also reduced the growth of *C. sake* and increased the lag phase prior to growth. In our studies, we demonstrated that growth rates of *C. sake* were very slow at $a_w < 0.96$. Only a minor proportion of exponentially growing cells of *C. sake* taken from cultures in NYDA medium and plated onto low a_w (< 0.96) molasses media had the capacity to form colonies. This phenomenon was quantitatively described by Mackenzie *et al.* (1986) and termed "water stress plating hypersensitivity". Previous studies of the effect of a_w , solute type and temperature on *C. sake* growth showed that, at the optimum temperature (25°C), 0.92 and 0.90 were the minimum a_w for growth in NYDB media modified with NaCl or glycerol, respectively (Teixidó *et al.* 1998c). Other *Candida* spp. demonstrated higher tolerance to low a_w in the presence of NaCl or glucose than *C. sake*: *C. cacaoui*, 0.84/0.83; *C. magnoliae*, 0.88/0.82; *C. tropicalis*, 0.89/0.88; *C. homilentoma*, 0.92/0.87; *C. silvicultrix*, 0.91/0.89, respectively (Van Eck *et al.* 1993).

Table 4. Correlation between compatible solutes analysed and cell water potential for each individual modifying water activity solute.

Solute used to modify a_w of growth media	Compatible solute correlated with ψ	Pearson coefficient	P^a
Glycerol	Glycerol	0.71	0.0001
	Total sugars ^b	0.71	0.0001
	Total polyols ^c	0.68	0.0001
	Total accumulated ^d	0.70	0.0001
Glucose	Glycerol	0.50	0.0045
	Glucose	0.46	0.0099
	Arabitol	0.45	0.0138
	Total sugars ^b	0.59	0.0007
	Total polyols ^c	0.59	0.0006
	Total accumulated ^d	0.62	0.0002
NaCl	Arabitol	0.51	0.0044
	Total polyols ^c	0.39	0.0348
	Total accumulated ^d	0.36	0.0476
Sorbitol	Glycerol	0.39	0.0216
Proline	Glucose	0.45	0.0083
	Glycerol	0.36	0.0378
	Arabitol	0.39	0.0259
	Mannitol	0.38	0.0295
	Total sugars ^b	0.43	0.0130
	Total polyols ^c	0.52	0.0025
	Total accumulated ^d	0.54	0.0295

^a: Prob > |R| under $H_0: R_h = 0$

^b: Sum of trehalose and glucose

^c: Sum of glycerol, erythritol, arabitol and mannitol

^d: Sum of all sugars/polyols analysed.

In the experiments with modified liquid molasses media, the growth of *C. sake* at 0.96 a_w was significantly lower than that obtained at 0.996 and 0.98. *C. sake* cells were found to be less sensitive to glycerol as a water stress treatment, while NaCl was toxic at high concentrations. However, glycerol-amended media showed, in general, a longer lag time than the other solutes examined at 0.98 a_w . These results on a heterogeneous undefined molasses-based medium are similar to those of Teixidó *et al.* (1998c) who demonstrated that the growth of *C. sake* in a rich NYDB-amended medium was inhibited more by NaCl than by glycerol-amended media. However, detailed studies on a_w minima for a range of other *Candida* spp. demonstrated lower tolerances in the presence of glucose than NaCl (Van Eck *et al.* 1993). The effect of using proline and sorbitol as a_w -modifying solutes has not been previously studied. Proline gave particularly good growth results, and *C. sake* cells were more tolerant at 0.96 a_w when compared to other solutes examined.

This study is the first detailed investigation and measurement of the ψ_c levels of *C. sake* cells. Our results have shown that cell ψ_c decreased with decreasing medium ψ_w , with ψ_c almost always equivalent to that of the medium. These results are in accordance with Magan (1997) who pointed out that this equilibrium between cell and environment is critical to prevent swelling of the cytoplasm. However, when glucose was used as a stress solute, ψ_c differed significantly from the ψ_w of the external medium.

In our studies we found that *C. sake* cells responded to water potential stress by increasing the intracellular proportion of glycerol or arabitol depending on the stress solute used and the a_w of the medium. In glycerol-amended media, glycerol was the main solute accumulated in the cells and was significantly higher than with the other treatments, probably because it was directly taken up from the media. In glucose, NaCl and proline treatments, arabitol was also accumulated at similar molalities as glycerol. In the sorbitol treatments, glycerol was also the most important compatible solute found. Glycerol and arabitol were also the main intracellular polyols accumulated in *C. sake* cells grown in defined modified NYDB (Teixidó *et al.* 1998b, c).

Glycerol was also accumulated by *Zygosaccharomyces rouxii* (Brown 1978; Edgley and Brown 1978) and *Hansenula anomala* (Van Eck *et al.* 1989) when grown at reduced a_w . Similarly, Van Zyl and Prior (1990) found that the a_w , growth rate and solute used to adjust the a_w of the medium affected the relative concentrations of glycerol and arabitol accumulated in *Z. rouxii*, and demonstrated that glycerol was the principal compatible solute in cells grown in media adjusted with NaCl. The intracellular levels of polyols in *Debaryomyces hansenii* were markedly enhanced by

high salinity, the dominant solutes being glycerol in the log phase (André *et al.* 1988) and arabitol in the stationary-phase cells (Adler and Gustafsson 1980).

In glycerol-modified treatments, glycerol had a good correlation with ψ_c . This could indicate that *C. sake* cells osmoregulated with glycerol, which also functions as a compatible solute under relative extreme conditions of water stress. However, when cells were grown in modified media with other solutes, although glycerol was also accumulated its correlation with ψ was not as strong as in glycerol-amended media. Nevertheless, a good correlation with total accumulation of the solutes analysed was found. In some cases, up to 50% of ψ_c could be explained by the analysed solutes. Ions, amino acids, other metabolites and sugars not analysed could also contribute to the total osmotic potential. Beever and Laracy (1986) reported that approximately 32% of the intracellular a_w of *Aspergillus nidulans* could be accounted for by cations, principally K^+ when the a_w was reduced by NaCl. However, in general, inorganic solutes are thought to play only a minor role in the osmoregulation of yeasts (Hobot and Jennings 1981). Glycerol is more important relative to the other polyols because it produces a lower a_w than the other polyols at the same molar concentration, followed by arabitol, erythritol, and then the higher molecular weight polyol mannitol (Magan 1997). With regard to carbon energy, glycerol production represents an effective method of osmoregulation (Hocking 1993).

Recent physiological studies with *C. sake* CPA-1 demonstrated that growth conditions can be modified so that specific endogenous compounds such as sugar alcohols and trehalose accumulated in cells, resulted in improved viability over a wider range of relative humidities with retained biocontrol efficacy (Teixidó *et al.* 1998b, c). This was used as a method for improving consistency and efficacy of such biocontrol agent for testing under field conditions (Teixidó *et al.* 1998a). The present studies have demonstrated that compatible solutes, principally glycerol and arabitol are also accumulated in a_w -modified molasses media, which is more economical. Further work is now required to examine whether such physiological manipulations of *C. sake* cells in molasses media can result in improved environmental stress tolerance and ecological competence for the production, and formulation of this biocontrol agent.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Government (MEC, Ministerio de Educación y Cultura and CICYT, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología grant ALI99-0652-C02-01) for their financial support.

REFERENCES

- Adler, L. and Gustafsson, L. (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology* **124**, 123-130.
- André, L., Nilsson, A. and Adler, L. (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of General Microbiology* **134**, 669-677.
- Beever, R.E. and Laracy, E.P. (1986) Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* **168**, 1358-1365.
- Blomberg, A. and Adler, L. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. In *Advances in microbial physiology*, Vol. 33, ed. Rose, A. H. pp. 145-212. London: Academic Press.
- Brown, A.D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* **17**, 181-242.
- Chirife, J., Ferro-Fontán, C. and Scorza, O.C. (1980) A study of water activity lowering behavior of some amino acids. *Journal of Food Technology* **15**, 383-387.
- Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* **53**, 121-147.
- Dallyn, H. and Fox, A. (1980) Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. Society of Applied Bacteriology, Technical Series **15**, 129-139.
- Edgley, M. and Brown, A.D. (1978) Response of xerotolerant and non-tolerant yeasts to water stress. *Journal of General Microbiology* **104**, 343-345.
- Hobot, J. and Jennings, D.H. (1981) Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Experimental Mycology* **5**, 217-228.
- Hocking, A.D. (1993) Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. In *Stress Tolerance of Fungi* ed. Jennings, D.H. pp. 233-256. New York: Marcel Deker.
- Janisiewicz, W.J. (1988) Biological control of disease fruits. In *Biocontrol of plant diseases*, vol. 2 ed. Mukerji, K.G. and Garg, K. L. pp. 153-165. Boca Raton: CRC Press.
- Janisiewicz, W. J. (1990) Biological control of postharvest fruit diseases. In *Handbook of Applied Mycology*, Vol 1. Soils and Plants ed. Arora, D.K. pp. 301-326. New York: Marcel Deker
- Lang, A.R.G. (1967) Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride solutions from 0 to 40°C. *Australian Journal of Chemistry* **20**, 2017-2023.
- Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochemical and Biophysical Acta* **1192**, 7-13.
- Mackenzie, K.F., Blomberg, A. and Brown, A.D. (1986) Water stress plating hypersensitivity of yeasts. *Journal of General Microbiology* **132**, 2053-2056.

- Magan, N. (1997) Fungi in extreme environments. In *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*. eds. Wicklow, D.T. and Söderström, B. pp. 99-114. Berlin: Springer-Verlag.
- Marechal, P.A. and Gervais, P. (1994) Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **42**, 617-622.
- Nobre, M.F. and Da Costa, M.S. (1985) Factors favouring the accumulation of arabitol in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Canadian Journal of Microbiology* **31**, 467-471.
- Pascual, S., Melgarejo, P. and Magan, N. (2000) Accumulation of compatible solutes in *Penicillium frequentans* grown at reduced water activity and biocontrol *Monilinia laxa*. *Biocontrol Science and Technology* **10**, 71-80.
- Rudolph, A.S., Cliff, R.O. and Spargo, B.J. (1993) The use of compatible solutes in the long-term preservation of lipid microstructure. *Cryobiology* **30**, 236-237.
- Sancisi-Frey, S. (2000) Ecophysiology, mass production and quality improvement of *Ulocladium atrum* for enhanced biological control of foliar pathogens. PhD Thesis, Cranfield: Cranfield University.
- Scott, W.J. (1957) Water relations of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research* **7**, 83-127.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1978) Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. In *Economic Microbiology*, Vol. 2, ed. Rose, A.H. pp. 393-425. London: Academic Press.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J. and Magan, N. (1998a) Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* **88**, 960-964.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J. and Magan, N. (1998b) Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycological Research* **102**, 1409-1417.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Sanchis, V. and Magan, N. (1998c) Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 192-200.
- Usall, J. (1995) Control biològic de *Penicillium expansum* en postcollita de fruita de llavor. PhD Thesis. Spain: Universitat de Lleida.
- Van Eck, J.H., Prior, B.A. and Brandt, E.V. (1989) Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress. *Journal of General Microbiology* **135**, 3505-3513.
- Van Eck, J.H., Prior, B.A. and Brandt, E.V. (1993) The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *Journal of General Microbiology* **139**, 1047-1054.

- Van Zyl, P.J. and Prior, B.A. (1990) Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 12-17.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E. and Ochoa de Erbe, J. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples with a new strain of *Candida sake*. *British Crop Protection Conference, Pests and Diseases* **6C**, 603-608.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N. and Sanchis, V. (1998) Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 9-16.
- Wilson, C.L. and Pusey, P.L. (1985) Potential for biological control of post-harvest plant diseases. *Plant Disease* **69**, 375-378.
- Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. (1989) Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 425-441.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.d. and Somero, G.N. (1982) Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.