

## Aplicación de secado espray para la obtención de cultivos lácticos iniciadores de origen caprino.

Aníbal M. Slavutsky<sup>1</sup>, Mónica Chavez<sup>2</sup>, Nancy Torres<sup>2</sup> & María A. Bertuzzi<sup>1</sup>

(1) Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI-CONICET). Facultad de Ingeniería. CIUNSa. Universidad Nacional de Salta

[amslavutsky@gmail.com](mailto:amslavutsky@gmail.com); [bertuzzi@gmail.com](mailto:bertuzzi@gmail.com)

(2) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-EEA-Cerrillos-Salta)

[chavez@inta.com.ar](mailto:chavez@inta.com.ar); [ntorres@correo.inta.gov.ar](mailto:ntorres@correo.inta.gov.ar)

**RESUMEN.** Los alimentos fermentados forman parte de la dieta integral de los humanos. Los cultivos iniciadores constituyen la base de estos alimentos. Las bacterias lácticas son los principales microorganismos empleados en los cultivos iniciadores que se emplean en la producción de quesos, yogurt, leches ácidas, etc. El secado spray (por pulverización), es una tecnología económica y efectiva para la producción de cultivos iniciadores. Se trata de una operación que consiste en convertir un alimento líquido en un producto en polvo, disminuyendo su volumen y contenido de humedad, lo que favorece la preservación del alimento. El objetivo del presente trabajo, fue obtener cultivos iniciadores en polvo a partir de *Enterococcus lactis* de origen caprino. Para esto, se trabajó con una cepa previamente seleccionada en la cuenca caprina de Amblayo (Salta). El microorganismo se desarrolló en medio de cultivo BHI, durante 24hs en condiciones de microaerofilia a 37°C. Luego, se procedió al secado, mediante spray drying, en diferentes condiciones de temperatura y caudal de biomasa de entrada. Los resultados, indican que el producto obtenido, posee una humedad inferior al 7%, con un rendimiento superior al 70% y una tasa de supervivencia de hasta un 75%, dependiendo de las condiciones operacionales del equipo.

### INTRODUCCIÓN.

Los alimentos fermentados forman parte de la dieta integral de los humanos. Los cultivos iniciadores constituyen la base de estos alimentos. Las bacterias lácticas son los principales microorganismos empleados en la obtención de cultivos iniciadores para la producción de quesos, yogurt, leches ácidas, etc. Los avances en Biotecnología, hicieron posible que estos cultivos se incorporaran de forma directa en la formulación de alimentos, utilizando para ello, diferentes métodos de concentración y conservación. El uso de cultivos iniciadores tiene varias ventajas, como por ejemplo, reduce los costos de producción, disminuye el riesgo de contaminación con bacteriófagos y estandariza la calidad de la producción a condiciones previamente seleccionadas. La liofilización es una de las principales técnicas empleadas para la conservación de estos cultivos. Sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas entre las que podemos citar el alto costo del

equipamiento y procesamiento y las bajas temperaturas de almacenamiento y de transporte requeridas para conservarlos. Esto limita el uso de esta tecnología, ya que eleva los costos de transporte cuando se recorren largas distancias (Peighambardoust et al., 2011).

La técnica de secado por pulverización (spray drying), se presenta como una alternativa económica y efectiva para la producción de cultivos iniciadores. Se trata de una operación que consiste en convertir un alimento líquido en un producto en polvo, con mínima manipulación del material, disminuyendo su volumen y su contenido de humedad, lo que favorece la preservación del alimento (Vinderola, 2008). Dentro de las ventajas, se pueden citar, el bajo costo y el corto tiempo de procesamiento. La versatilidad del proceso de secado por pulverización y los considerables progresos realizados a través de la innovación tecnológica, han llevado a una mayor flexibilidad para cumplir con los requisitos biotecnológicos, especialmente en lo referido a tratamientos

térmicos más suaves, a fin de evitar la pérdida de actividad microbiana.

Sin embargo, los trabajos obtenidos sobre el secado por pulverización de bacterias son escasos en comparación con los de liofilización (Schuck et al., 2012). Las razones de ello, son principalmente las bajas tasas de supervivencia durante el secado de los cultivos, la estabilidad bajo condiciones de almacenamiento y la dificultad de rehidratar el producto (Ananta et al., 2005). Fu y Chen (2011) resumen algunos estudios sobre la deshidratación de microorganismos por procesos térmicos que demuestran que la supervivencia de los cultivos varía dependiendo de los diferentes medios de cultivo, las matrices encapsulantes, los sistemas de secado y las características de cada microorganismo.

Las etapas del proceso se pueden resumir de la siguiente manera: i) Preparación del inóculo, que comprende todo lo relativo a la producción de la biomasa (composición del medio de cultivo, pH, fase de crecimiento, etc.), ii) Formulación de las suspensiones de los microorganismos con las matrices protectoras, donde se debe tener en cuenta las condiciones de procesamiento y almacenamiento posteriores (comportamiento reológico, estabilidad térmica, rehidratación, etc.), iii) Deshidratación, que comprende todo lo referido a las condiciones operacionales del equipo de secado (temperatura y flujos de las corrientes, tiempo de exposición, etc.), iv) Almacenamiento y envasado del producto deshidratado obtenido, se refiere a las diferentes condiciones de almacenamiento (humedad, temperatura, tiempo, etc.) y v) Rehidratación del polvo y estudio de la viabilidad de los microorganismos, donde se evalúa la calidad del producto obtenido.

El estudio de cada una de estas etapas, es determinante para la calidad del producto final, no obstante, los estudios realizados hasta el momento, indican que los parámetros operacionales del equipo y las sustancias protectoras empleadas, juegan un rol determinante en la viabilidad microbiana final (Boza et al., 2004; Wang et al., 2004; Fu y Chen, 2011).

Por otro lado, los sistemas caprinos de los Valles y Quebradas del Noroeste Argentino, presentan muy buenas condiciones ambientales para el desarrollo de bacterias lácticas con potenciales tecnológicos y diferentes a las existentes hoy en el mercado. En efecto, en estos ecosistemas, la producción lechera de cabras está radicada desde hace mucho tiempo, posiblemente desde la época de la conquista española; estos productores han sostenido

prácticas productivas acordes con los recursos de la zona. Estudios realizados sobre estos sistemas, han demostrado un muy buen perfil de calidad de leche para elaboración de quesos (Chavez et al., 2011).

La importancia del estudio que se plantea, radica en la aplicación de una tecnología simple, económica, efectiva, fácilmente escalable y transferible para la conservación de cepas de bacterias lácticas de origen caprino para su aplicación posterior en alimentos fermentados.

Este trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto de dos parámetros del proceso de secado por spray para la obtención de cultivos lácticos iniciadores. Se evaluó el efecto sobre la viabilidad de una cepa de *Enterococcus lactis* aislada a partir de leche de cabras de cuencas lecheras caprinas de la provincia de Salta, a través del estudio de las siguientes variables del proceso de secado: Temperatura de entrada del aire y caudal de entrada del medio de cultivo.

## MATERIALES Y METODOS

1. *Cultivo: Enterococcus lactis* perteneciente al cepario del INTA-Cerrillos (Salta). La misma fue aislada a partir de muestras de leche caprina provenientes de los ecosistemas de Amblayo y del Valle de Lerma, ambos de la provincia de Salta. La cepa se cultivó en 15 mL a 37°C durante 24hr, en condiciones de microaerofilia, en medio infusión-cerebro-corazón (BHI, Britania, Argentina). El cultivo se repicó en 40 mL de BHI y se llevó a estufa durante 24 hr a 37°C. Se realizó un último repique a un 1 litro de caldo BHI, bajo las mismas condiciones. Este cultivo presentó un recuento de  $1.04 \times 10^{10}$  UFC/g<sub>b,s</sub> que se tomó como valor inicial.

2. *Procedimiento de secado por spray*. Finalizada la etapa de producción de biomasa, se procedió al secado de las muestras, mediante el empleo de un Mini Spray Dryer B-290 (BUCHI, Suiza). En la Figura 1, se presenta un esquema del equipo de secado empleado. Se estudió el efecto de la temperatura del aire de entrada (Te) y del caudal de entrada de la materia prima (C<sub>alim</sub>) y el efecto que tienen estas variables sobre el rendimiento de biomasa recuperada, la humedad del producto y la viabilidad microbiana del producto. Las variables estudiadas pueden observarse en la Tabla 1.

3. *Rendimiento (R) y humedad de las muestras obtenidas (H)*. El rendimiento se determinó a partir de la biomasa seca presente en el medio de cultivo y la biomasa recuperada luego de

finalizada la etapa de secado. La biomasa seca se determinó a partir del secado de una alícuota del cultivo bacteriano, en estufa a 104°C durante 24hs. La humedad del producto se determinó empleando el método propuesto por la AOAC (AOAC, 1984).

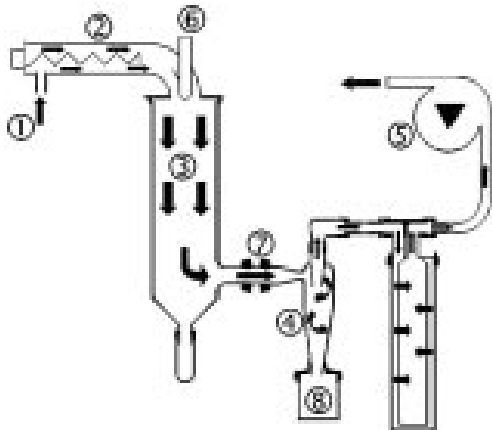


Figura 1. Esquema del equipo de secado. 1) aire de entrada; 2) calentador; 3) cámara de secado; 4) ciclón; 5) aspirador; 6) sensor de temperatura (Te); 7) sensor de temperatura (Ts); 8) contenedor del producto. Las flechas indican la trayectoria del aire y del polvo obtenido.

4. *Estudios de viabilidad microbiana:* la viabilidad de los fermentos frescos y deshidratados se estudió mediante el siguiente análisis microbiológico: se determinó el número de células viables de cada fermento, antes y después de los diferentes tratamientos, por recuento en placa. Para ello, se realizaron diluciones decimales en solución fisiológica y se utilizó como medio BHI. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia. El recuento se informa en UFC/g de biomasa seca. La tasa de sobrevida, se calculó como la división entre las UFC/g iniciales y finales, luego del tratamiento de secado por spray.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

La viabilidad celular depende de la combinación de los parámetros operacionales del proceso de secado. Aunque en la bibliografía se informa que un aumento de la temperatura del aire de entrada (Te) disminuye la viabilidad celular, la misma, no está directamente correlacionada con la inactivación y sólo tiene un ligero efecto (Kim & Bhowmik, 1990). Algunos autores, sostienen que la temperatura del aire de salida

(Ts) es el parámetro de secado que más afecta a la viabilidad de los cultivos iniciadores obtenidos por spray. Este parámetro depende de la temperatura de entrada del aire, el caudal de aire (F<sub>aire</sub>) y la velocidad de alimentación del producto (C<sub>alim</sub>). En la Tabla 1, se muestran los parámetros operacionales empleados en este estudio.

Muestra	Te (°C)	C <sub>alim</sub> (mL/hr)	F <sub>aire</sub> (L/hr)	Ts (°C)
A	150	365	538	80
B	170	365	538	93
C	170	440	538	90

Tabla 1. Parámetros operacionales

Como se observa, la temperatura de salida del aire es función de la temperatura de entrada y el caudal de entrada de la muestra. En la Tabla 2, se observan los resultados obtenidos de la tasa de sobrevida de los microorganismos, R y H, del polvo obtenido.

Muestra	H	R	UFC/gr <sub>b.s.</sub>	Tasa sobrevida
A	5.10	71.59	6.00x10 <sup>9</sup>	57%
B	2.35	82.14	7.20x10 <sup>9</sup>	69%
C	6.45	76.37	9.85x10 <sup>9</sup>	75%

Tabla 2. % de humedad, % de rendimiento, viabilidad y tasa de sobrevida de las muestras deshidratadas.

Como se observa en la Tabla 2, la viabilidad microbiana y el rendimiento dependen de las condiciones operacionales del equipo. Se observa que el grado de inactivación de las bacterias durante el secado por pulverización depende de la combinación temperatura-tiempo empleados y por lo tanto, del grado de estrés térmico sufrido por las bacterias. Varios investigadores han informado también que el aumento de temperatura del aire de salida reduce la supervivencia de microorganismos después de secado por pulverización (Kim & Bhowmik, 1990; Lian et al, 2002). Sin embargo, debe tenerse en cuenta también el tiempo de residencia a esa temperatura, a mayor caudal, menor tiempo de estrés térmico sufrirán las bacterias. Como se observa, para las muestras B y C, donde la Te es de 170°C y la Ts es de aproximadamente 90°C, se observa la mayor tasa de sobrevida, en el caso C donde el flujo es mayor y por lo tanto menor el tiempo de residencia del material en el equipo.

Las células pueden sufrir diferentes tipos de lesiones durante el proceso de secado. Las lesiones y la muerte celular son probablemente

causadas por una pérdida de proteínas de la pared celular, así como también, por la pérdida de agua, siendo ambos factores extremadamente importantes para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las macromoléculas biológicas (Brennan et al. 1986). La velocidad de secado del medio de cultivo depende de dos factores; el caudal de alimentación y la temperatura de entrada del aire. Se mencionan solo estos dos parámetros, ya que el resto de las variables permanecieron constante en el experimento. La velocidad de evaporación del agua del medio de cultivo, depende de estas variables. El aumento en la  $T_e$  de 150 a 170°C, produce un polvo con menor H y mayor tasa de sobrevida. Al aumentar el caudal de alimentación, disminuye el tiempo de residencia, y en definitiva, de contacto entre el aire caliente y la suspensión de bacterias, lo que produce un polvo con mayor contenido de humedad y un aumento de la tasa de sobrevida, debido a que se produce una menor desnaturalización de las proteínas en las células. Es importante mencionar, que el contenido de humedad impacta en la tasa de sobrevida del producto y en la facilidad de almacenamiento e incorporación del producto en el alimento. De acuerdo con Wang et al. (2004), el contenido de humedad del producto, es la variable más importante a tener en cuenta, para garantizar un buen almacenamiento del producto. Un producto con bajo contenido de humedad, previene el crecimiento de otros microorganismos patógenos o contaminantes (bacterias, hongos y levaduras), que puedan perjudicar la aplicación del polvo en productos alimenticios.

La cinética de la evolución de la temperatura es tan importante como el de la evaporación de la humedad. La cinética de transferencia de masa y el contenido de humedad final también dependen de la relación de  $T_e/C_{alim}$  (Konavalov, Gatapova, y Kudra, 2010). El caudal de entrada y la temperatura son parámetros controlados por el equipo que influyen en la inactivación de microorganismos. En el secado por pulverización, la eliminación de la humedad se lleva a cabo de forma rápida y por lo tanto, el cambio de temperatura, y el cambio de concentración de humedad y el proceso de inactivación también son rápidos (Chen y Patel, 2007). Se observa que la inactivación microbiana es mayor cuando es mayor la velocidad de secado (menor caudal y mayor temperatura) (Muestras A y B).

El R se ve influenciado también por las variables estudiadas. El polvo puede quedar retenido en diferentes zonas del equipo,

principalmente entre la unión de la cámara de secado y el ciclón (Figura 1, pto. 7). La cantidad de polvo que queda retenido, dentro del equipo está relacionada a la humedad del producto obtenido. Como se observa en la Tabla 2, a medida que aumenta el H, disminuye el R obtenido finalmente. Esto se debe a que, al aumentar la humedad del polvo, aumenta la pegajosidad del mismo, ocasionando que se aglomere y adhiera a la superficie del secadero.

## CONCLUSIÓN

El secado por *espray* se presenta como una alternativa viable para la obtención de cultivos iniciadores de bacterias lácticas de origen caprino. Este proceso permite controlar las variables de operación de manera de optimizar las condiciones de secado para estos cultivos. La temperatura de entrada del aire caliente y el flujo de la suspensión de células constituyen los parámetros operacionales claves del proceso y cuya manipulación permitió alcanzar rendimientos cercanos al 80% y la tasa de sobrevida bacteriana del 75%. Además, este proceso se presenta como una tecnología económica, fácilmente escalable y con bajos costos operativos que hace posible su transferencia a la pequeña industria local del sector lácteo caprino.

## BIBLIOGRAFIA

- Ananta E., M. Volkert & D. Knorr. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 399-409, 2005.
- AOAC. Official Methods of Analysis, 14th edn. AOAC, Arlington, VA, USA. 1984.
- Boza Y., D. Barbin & A. R. P. Scamparini. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. *Process Biochemistry*, 39, 1275–1284, 2004.
- Brennan M., R. Wanismail & B. Ray. Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. *Journal of Food Protection* 46 (10), 887–892, 1983.
- Chavez M., S. Orosco, V. Sanchez, M. Martinez, N. Torres & J. Candotti. Sistema de producción de leche caprina: Valles Áridos y Quebradas del NOA como caso de estudio. I<sup>er</sup> Taller Nacional sobre Tecnologías Productivas disponibles para el

- sector de los Pequeños Rumiantes en la República Argentina (Mendoza). CD pag. 10, 2011.
- Chen X. D. & K. C. Patel. Micro-organism inactivation during drying of small droplets or thin-layer slabs - A critical review of existing kinetics models and an appraisal of the drying rate dependent model. *Journal of Food Engineering*, 82, 1e10, 2007.
- Fu N. & X. D. Chen. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying process. *Food Research International*, 44, 1127-1149, 2011.
- Kim S.S., & S. R. Bhowmik. Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. *Journal of Food Science* 55 (4), 1008–1010, 1990.
- Konavalov V. I., N. Z. Gatapova & T. Kudra. *Drying of liquid dispersions - Unified approach to kinetics and modeling*. Varennes, Canada: Natural Resources Canada, 2010.
- Lian W. C., H. J. Hsiao & C. C. Chou. Survival of bifidobacteria after spraydrying. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 79–86, 2002.
- Peighambardoust S. H., A. Golshan Tafti & J. Hesari. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 215-224, 2011.
- Schuck P., A. Dolivet, S. Méjean, C. Hervé & R. Jeantet. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. *International Dairy Journal*, 1-6, 2012.
- Vinderola G. Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 19, 40-46, 2008.
- Wang Y. C., R. Yu, & C. C. Chou. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 209–217, 2004.