

SECADO POR PULVERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS A ESCALA PILOTO

Slavutsky, A. M.^{a*}, Chávez, M.^b, Fávoro Trindade C. S.^c y Bertuzzi, M. A.^a

^aINIQUI-CONICET, CIUNSa, Facultad de Ingeniería, UNSa.

Av. Bolivia 5150 - 4400 Salta - Argentina

^bINTA-Cerrillos. Ruta 68, Km 172 – 4412 Cerrillos, Salta - Argentina

^cLaboratório de Produtos Funcionais, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo - Campus de Pirassununga.

Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga - Brasil.

E-mail: amslavutsky@gmail.com

Resumen. Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que al ser ingerido en cantidades suficientes ejercen beneficios para la salud. El número mínimo de bacterias necesarias para proporcionar cualquier efecto deseado, luego de su ingestión, debe ser de aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC/mL. El secado por pulverización (spray drying) ha sido investigado como método para la producción de bacterias lácticas. La exposición a elevadas temperaturas durante el proceso de secado de las bacterias, ejerce un impacto negativo sobre su viabilidad, y por lo tanto, sobre la actividad del producto obtenido. El objetivo del presente trabajo, fue obtener bacterias lácticas secadas por espray a escala piloto bajo diferentes regímenes de operación y la incorporación de matrices encapsulantes. Se trabajó con una cepa de *Lactobacillus acidophilus* novo. Se empleó un spray dryer de escala piloto y como matriz encapsulante se empleó leche deshidratada, maltodextrina y pectina en 3 concentraciones diferentes. Se estudiaron tres velocidades de alimentación del producto diferentes y el efecto de las variables: temperatura de salida y actividad de agua del producto, sobre la viabilidad del producto a 30, 60 y 90 días, almacenados a -18°C , en

* amslavutsky@gmail.com

recipientes cerrados al vacío. Los resultados muestran que a medida que aumentan el caudal de alimentación y la temperatura de salida, la viabilidad disminuye notoriamente, mientras que la incorporación de matrices encapsulantes produce un efecto benéfico en la conservación de los cultivos. A su vez, se observa una fuerte relación entre la actividad de agua del producto obtenido, y la viabilidad del mismo, durante su almacenamiento.

Palabras claves: SECADO POR ESPRAY; BACTERIA LÁCTICA; ENCAPSULADO; VIABILIDAD

1. Introducción

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que al ser ingerido en cantidades suficientes ejercen efectos beneficiosos para la salud. El número mínimo de bacterias necesarias para proporcionar cualquier efecto deseado, luego de su ingestión, debe ser de aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC/mL. Por lo tanto, la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento es importante. La liofilización es una de las principales técnicas empleadas en la obtención de cultivos iniciadores y probióticos para su posterior uso en la industria alimenticia o farmacéutica. Sin embargo esta tecnología presenta elevados costos de producción, la necesidad de mano de obra especializada y largos tiempos de procesamiento.

La técnica de secado por pulverización o spray (spray drying), se presenta como una alternativa económica y efectiva para la producción de fermentos lácticos. Se trata de una operación que consiste en convertir un alimento líquido en un producto en polvo, con mínima manipulación del material, disminuyendo su tamaño y su contenido de humedad, lo que favorece la preservación del alimento (Vinderola, 2008). Dentro de sus 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 publicados sobre el secado por pulverización de bacterias son escasos en comparación con los de liofilización (Schuck y col., 2012). Las razones por las cuales esta técnica no es muy usada son principalmente las bajas tasas de supervivencia durante el secado de los cultivos, la baja estabilidad en condiciones de almacenamiento y la dificultad de rehidratar el producto (Ananta y col., 2005). Estudios relativos a la supervivencia de diferentes cultivos lácticos obtenidos por secado, han sido reportados por algunos investigadores (Lian y col., 2002; Ananta y col., 2005). Fu y Chen (2011) resumen varios 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. Los artículos publicados, indican que los parámetros operacionales del equipo y las sustancias protectoras empleadas, juegan un rol determinante en la viabilidad microbiana final (Boza y col, 2004; Wang y col., 2004; Fu y Chen, 2011). La exposición a las elevadas temperaturas necesarias para la evaporación de agua durante el proceso de secado ejerce un impacto negativo sobre la viabilidad de las bacterias y por lo tanto, la actividad del producto obtenido. Hasta la fecha, se han realizados diferentes experimentos con el fin de mejorar la viabilidad del cultivo durante el secado y prevenir la muerte celular durante el almacenamiento, que incluyen por ejemplo, la incorporación de matrices encapsulantes y/o prebióticos y la optimización de los parámetros operacionales del equipo. La mayoría de estos estudios, se han focalizado en la producción de cultivos lácticos mediante el secado por spray a escala laboratorio, y son pocos los realizados a escala piloto. En trabajos previos, nuestro grupo de investigación ha realizado diferentes experimentos a escala laboratorio sobre la deshidratación de bacterias lácticas de origen caprino. En base a lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue obtener probióticos deshidratados con un equipo de secado por spray de escala piloto y estudiar el efecto del caudal de alimentación y el % de matriz encapsulante incorporada, durante el almacenamiento del producto por un periodo de 90 días.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cultivo

Se empleó una cepa de *Lactobacillus acidophilus novo*, donado por la empresa SAECO-Liofast. La cepa se cultivó a 37°C durante 24 horas, en condiciones de aerofilia, en 5 mL de medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS, ACUMEDIA, Brasil). Se realizaron repiques sucesivos, a fin de producir 1000 mL de biomasa. Posteriormente, se centrifugó a 7000 rpm a 5°C durante 7 min. La biomasa recuperada se lavó dos veces con solución de citrato de sodio al 2%.

2.2. Solución encapsulante y Procedimiento de Secado por Espray.

Las células lavadas, se resuspendieron en una solución que contenía las matrices empleadas como encapsulantes. Dicha solución, estaba compuesta por pectina de bajo metoxilo (CPKELKO, Brasil), maltrodextrina (Ingredion, Brasil) y leche deshidrata reconstituida (LDR, Itámbe, Brasil). Las matrices incorporadas, fueron homogeneizadas a 10.000 rpm (IKA-T25), durante 10 min y esterilizadas a 121°C. La composición del medio, puede observarse en la Tabla 1. La concentración final de la suspensión de células fue de 3.70×10^8 UFC/g ($\pm 0.4 \times 10^8$).

El secado de las muestras, se realizó mediante el empleo de un Spray Dryer piloto Lab Maqui-MSD 5.0 (Brasil). La temperatura de entrada (Te) y el flujo del aire (FA) se mantuvieron constantes y se estudió el efecto del caudal de entrada de la materia prima (CA). En la Tabla 1, figuran los valores empleados para el procedimiento de secado.

TABLA 1. Composición del medio encapsulante y variables de secado empleadas

Pectina (g/L)	8.00
	12.00
	16.00
Malto dextrina (g/L)	2.00
LDR (g/L)	30.00
Caudal Alimentación CA (mL/min)	30
	40
	50
Temperatura entrada (°C)	170
Flujo Aire (L/min)	60

2.3. Recuento de células y actividad de agua.

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 de citrato de sodio al 2% y se utilizó como medio MRS. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones anaeróbicas. El recuento se informó en UFC/g de biomasa seca. La tasa de sobrevivencia (%T), se calculó como la división entre las UFC/g finales e iniciales, luego del tratamiento de secado por spray. El resultado se expresó en porcentaje.

La actividad de agua (a_w) de los polvos obtenidos se realizó mediante el empleo de un medidor de actividad de agua medidor de actividad AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA), a 25 °C. Cada análisis se realizó por triplicado.

2.4. Microscopía Electrónica de Barrido.

La morfología de las microcápsulas se observó por microscopía electrónica de barrido. Las muestras encapsuladas fueron fijadas sobre cinta metálica de doble cara y recubiertas con una fina capa de oro usando un evaporador Balzers (modelo SCD050, Baltec, Liechtenstein, Austria) durante 120s. Las observaciones se realizaron utilizando el microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-T300, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 10 kV.

2.5. Estudios de Viabilidad Microbiana en Función del Tiempo.

Se realizó el estudio de la viabilidad microbiana de los fermentos deshidratados a los 30 y 60 días. Para esto, los polvos deshidratados se guardaron en recipientes cerrados al vacío a -18°C y al resguardo de la luz.

3. Resultados

En la Tabla 2, se presentan los resultados obtenidos para cada experimento realizado. Las variables independientes (CA y concentración de pectina), se presentan de manera codificada. En términos generales, se puede mencionar que la temperatura de salida (T_s) disminuye con el aumento del caudal de ingreso de la suspensión y aumenta a medida

que aumenta el contenido de pectina de la suspensión. En cambio, la humedad del producto aumenta con el aumento del caudal de alimentación y el contenido de pectina.

TABLA 2. Diseño experimental y resultados obtenidos

Código	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
CA (mL/min)	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	0	0
Pectina (g/L)	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1	0	0
Ts (°C)	81	71.5	68	93	87	81	98	87	76	85	90
%T	45.26	61.04	67.18	67.44	77.52	81.40	70.00	79.07	73.64	73.64	77.52

Se obtuvieron las ecuaciones de regresión para las diferentes variables dependientes. Las ecuaciones 1 y 2, corresponden a las regresiones obtenidas para cada variable dependiente. La variable “x” corresponde a CA y la variable “y” a la concentración de pectina. El coeficiente de regresión R^2 fue mayor a 0.95 en todos los casos, y de acuerdo al análisis de variancia, todas las ecuaciones obtenidas poseen un $p \leq 0.05$.

$$\%T = 75,9312 + 12,1915 \cdot x + 17,2126 \cdot y - 9,3638 \cdot x^2 - 7,93848 \cdot x \cdot y - 12752 \cdot y^2 \quad (1)$$

$$Ts = 74,7273 - 13,6667 \cdot x + 14 \cdot y \quad (2)$$

Se observan efectos lineales y cuadráticos para el %T, mientras que para la Ts, solo se observan efectos lineales. A partir de la ecuación de regresión del %T, se obtuvo el gráfico de superficie respuesta que se presenta en la Figura 1.

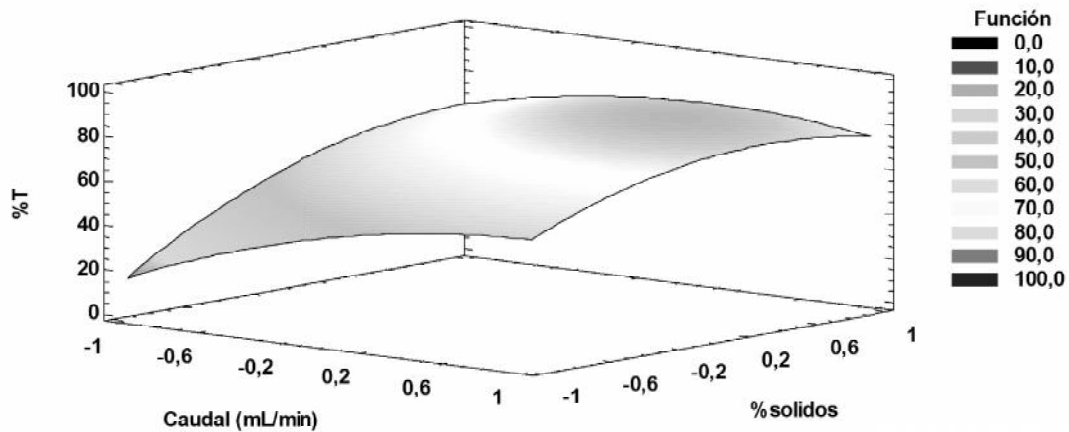


FIGURA 1. Gráfico superficie respuesta de la tasa de sobrevida.

En la gráfica, se puede observar que el aumento de sobrevida de los cultivos, aumenta a medida que aumenta el caudal y la concentración de pectina en la suspensión, alcanzándose un máximo. El efecto de la T_s y su relación con el %T, se hace evidente al analizar los resultados de la Tabla 2. Un aumento en la T_s , produce mayor daño en las estructuras de la célula microbiana, principalmente en la membrana celular y la inactivación de enzimas, produciendo una rápida caída de la viabilidad del producto obtenido (Favaro-Trindade y Grosso, 2002). Las células pueden sufrir diferentes tipos de lesiones durante el proceso de secado. Estas 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. 1983). La incorporación de matrices, favorece la viabilidad microbiana, al proteger los fosfolípidos de la membrana celular (Ananta et al., 2005).

La velocidad de secado del medio de cultivo depende de dos factores; el caudal de alimentación y la temperatura de entrada del aire. Por lo tanto, en las condiciones experimentales empleadas, la velocidad de evaporación del agua del caldo de células, depende de estas variables. 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 producirá 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.

En la Tabla 3, se observan los resultados del recuento microbiano (expresado como la relación del logaritmo de UFC/g tiempo t /UFC/g_{iniciales}), en función del tiempo y la actividad de agua obtenida para cada ensayo realizado. Se observa una disminución importante de la viabilidad microbiana, a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento de los cultivos. Silva et al. (2011) sugieren que la sobrevida de los cultivos microbiológicos obtenidos por secado, está fuertemente relacionado con la T_s y no con la temperatura de entrada del aire. Como se observa, las muestras con mayor estabilidad en el tiempo, son las que presentan menor T_s y por lo tanto, mayor concentración de células viables, finalizado el proceso de secado (Tabla 2).

La actividad de agua es un parámetro importante de calidad en la evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento de productos alimenticios secos (Skanderby et al. 2009). Se observa que la actividad de agua aumenta con la concentración de pectina empleada y el aumento del CA de la biomasa.

Tabla 3. Sobrevida de los cultivos en función del tiempo y actividad de agua

(Log N/Log No)	Tiempo			a_w
	30	60	90	
I	-0.516	-1.233	-1.816	0.309
II	-0.435	-1.040	-1.531	0.336
III	-0.449	-0.876	-1.317	0.352
IV	-0.468	-0.722	-1.119	0.361
V	-0.541	-0.796	-1.241	0.368
VI	-0.497	-0.783	-1.210	0.373
VII	-0.512	-0.830	-1.277	0.385
VIII	-0.478	-0.892	-1.349	0.391
IX	-0.484	-1.007	-1.504	0.394
X	-0.536	-0.805	-1.208	0.368
XI	-0.542	-0.835	-1.246	0.361

Meng et al. (2008), consideran que aunque el agua es un componente esencial de la vida, la retención de la viabilidad durante el almacenamiento es a menudo mayor cuando la actividad de agua es muy baja. Según Kearney et al. (2009), para que los cultivos en polvo pueden permanecer estables en alimentos deshidratados deben tener valores de a_w de aproximadamente 0,3 a fin de controlar no sólo el crecimiento microbiano sino también otras reacciones fisicoquímicas y bioquímicas perjudiciales que afectan al color, la textura, el sabor y el valor nutritivo de los alimentos.

En la Figura 2 se observa claramente que a medida que aumenta la a_w de los polvos, disminuye la pérdida de viabilidad microbiana, durante el almacenamiento, en el transcurso del tiempo. A su vez, se observa que una a_w menor de 0.355 y mayor 0.380, la viabilidad disminuye notoriamente.

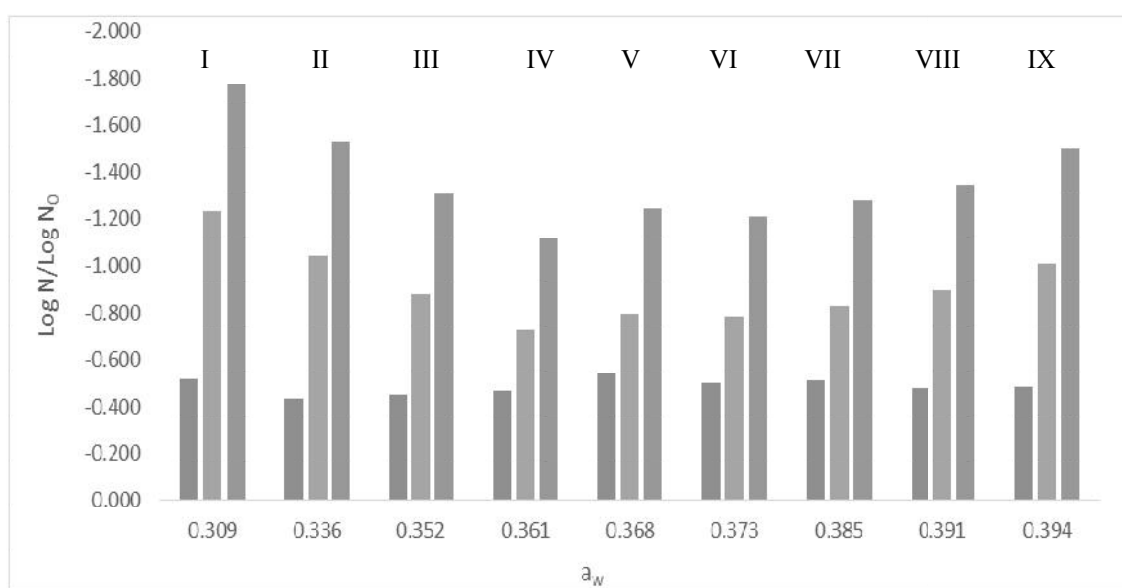


Figura 2. Viabilidad microbiana, en función del tiempo (30, 60 y 90 días) y la actividad de agua de los productos obtenidos

Al cabo de 90 días de almacenamiento, se observa que la pérdida la viabilidad microbiana es lineal, y depende fuertemente de la concentración inicial de bacterias al inicio del almacenamiento y de la actividad de agua del producto. A su vez, la viabilidad inicial del polvo obtenido, depende de la concentración de pectina empleada y del caudal de la suspensión alimentada. Todo esto, recae en la temperatura de salida del producto. Como se puede observar, todas las variables están relacionadas entre sí,

por lo que es necesario analizarlas en conjunto, a fin de obtener una mayor comprensión de como se ve afectada la estabilidad del producto obtenido.

En la Figura 3, se observan las microfotografías obtenidas por SEM, para los diferentes tratamientos realizados. Las partículas obtenidas, presentan diferentes tamaños, con forma redondeada y la presencia de concavidades típicas de productos obtenidos por spray drying. Saézn et al. (2009) informan que la formación de concavidades en la superficie de partículas atomizadas se puede atribuir a la contracción de las partículas durante el proceso de secado debido a la rápida evaporación de las gotas de líquido. Las superficies externas de las cápsulas formadas por los diferentes tratamientos mostraron paredes libres de fisuras o interrupciones, lo cual es fundamental para garantizar una mayor protección y menor permeabilidad a los gases.

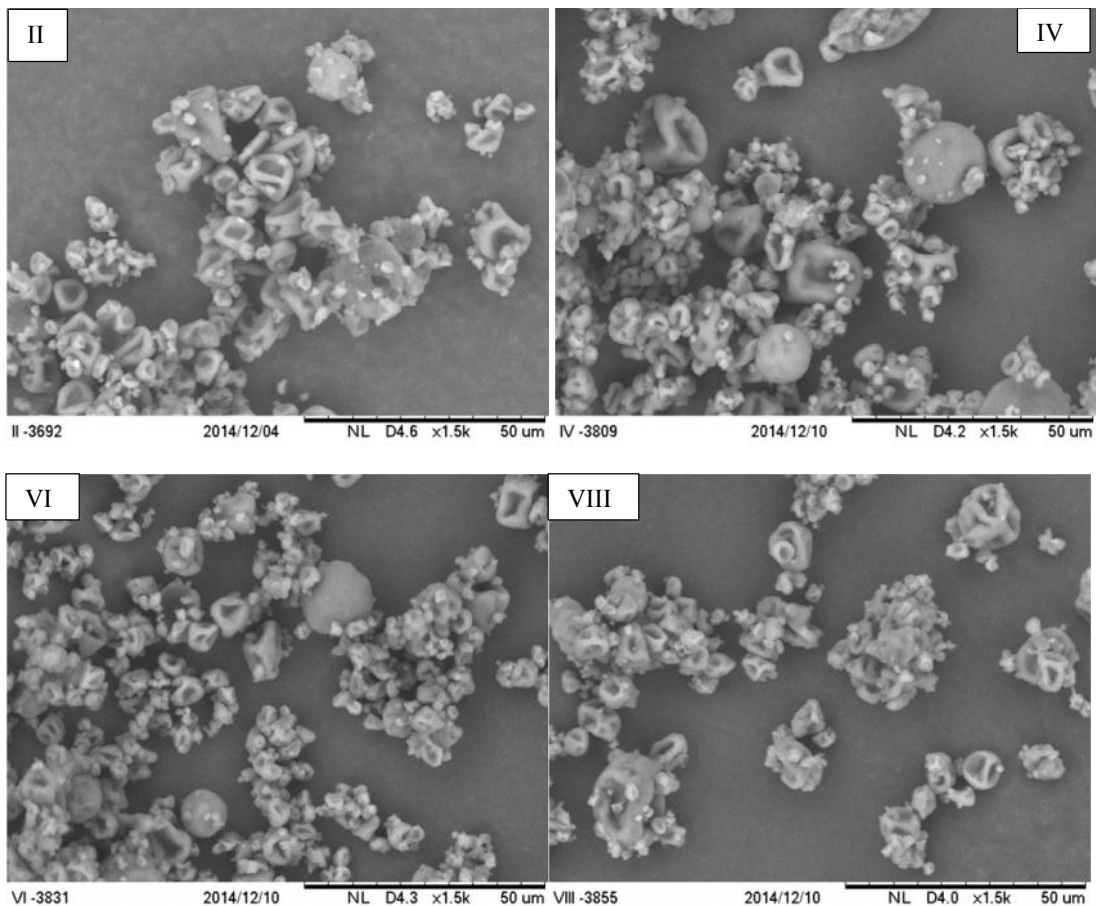


Figura 3. Microfotografías electrónicas de barrido de los polvos obtenidos, para los tratamientos II, IV, VI y VIII.

4. Conclusión.

La obtención de cultivos microbianos mediante secado por spray es un proceso complejo, que depende de muchas variables que afectan la calidad del producto obtenido. Mediante este estudio se analizó el efecto de la concentración de sólidos encapsulantes y el caudal de alimentación de la suspensión de microorganismos, sobre la viabilidad microbiana, la T_s , a_w y la estabilidad durante el almacenamiento del producto obtenido. Se observó una fuerte correlación entre las variables dependientes y las variables independientes seleccionadas. Un aumento de CA y de la concentración de material encapsulante ejerce un efecto protector de la viabilidad microbiana tanto al tiempo cero como durante el almacenamiento. La a_w del producto también resulta importante en su estabilidad y viabilidad estando sus valores óptimos entre 0.35 y 0.38.

Reconocimientos

Los autores, desean agradecer la financiación recibida por parte del CIUNSa (Proyecto: Encapsulados y películas comestibles basados en biopolímeros para aplicaciones específicas en la conservación de alimentos), al INTA (Proyecto PNAIyAV-1130032. Tecnologías de transformación de Alimentos) y al MINCyT (Proyecto Red para el Fortalecimiento de la Aplicación de Nuevas y Tradicionales Tecnologías de Microencapsulación por Spray para el Desarrollo de Cultivos Probióticos) y al personal de investigaciones de la Facultad de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos del Campus de Pirassununga de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Referencias

- Ananta, E., Volkert, M. & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15: 399-409.
- Boza, Y., Barbin, D., & Scamparini, R. P. (2004). Effect of Spray-Drying on the Quality of Encapsulated Cells of *Beijerinckia* Sp. *Process Biochemistry*, 39(10): 1275–1284.
- Brennan, M., Wanismail, R., & Ray, B.; (1983). Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. *Journal of Food Protection*, 46 (10): 887–892.
- Favaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19: 485-494.
- Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127–1149.
- Kearney, N., Meng, X. C., Stanton, C., Kelly, J., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2009) Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *International Dairy Journal*, 19, 684–689.
- Lian, W. C., & Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 79–86.

- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., & Ross, R. P. (2008) Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106, 1406–1416.
- Peighambardoust, S. H., Golshan Tafti, A., & Hesari, J. (2011). “Application of Spray Drying for Preservation of Lactic Acid Starter Cultures: A Review.” *Trends in Food Science & Technology*, 22(5): 215–224.
- Priya, A., Vijayalakshmi, S. P., & Raichur, A. M. (2011) Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59: 11838–11845.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616–622.
- Schuck, P., Dolivet, A., Méjean, S., Hervé, C., & Jeantet, R. (2012). Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. *International Dairy Journal*, 1–6.
- Scott, W. J. (1958). The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage. *Journal of General Microbiology* 19, 624–633.
- Silva, J., Freixo, R., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2011). Spray-drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 321-335
- Skanderby, M., Westergaard, V., Partridge, A., & Muir, D. D. (2009) Dried Milk Products. In *Dairy Powders and Concentrated*, pp. 180–234. Tamime A Y, ed. Ayr, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Vinderola G. (2008). Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 19: 40-46.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 209–217.