

PRESERVACIÓN DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS* Y *LACTOBACILLUS PLANTARUM* EN PELÍCULAS BIODEGRADABLES DE METILCELULOSA

Nelson Romano¹, María José Tavera-Quiroz¹, Nora Bertola¹, Pablo Mobili¹,
Adriana Pinotti^{1,2}, Andrea Gómez-Zavaglia¹

1. RESUMEN

La metilcelulosa (MC) es un polímero derivado de la celulosa utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria debido a su inocuidad, bajo costo y capacidad de aumentar la viscosidad de soluciones acuosas. Es capaz de formar películas con buenas propiedades mecánicas y baja permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua. Se estudiaron películas de MC como soporte de bacterias ácido lácticas con la incorporación de fructoligosacáridos (FOS) como prebiótico. Dos especies de bacterias: *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CIDCA 333 se incorporaron a matrices de MC. Se analizó la viabilidad celular hasta 105 días de almacenamiento. Las propiedades térmicas se obtuvieron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis dinámico mecánico (DMA). Se evaluó la estabilidad de las películas y la viabilidad de las cepas a distintas humedades a través de una isoterma de absorción a 4 °C. El efecto protector de los FOS se puso de manifiesto a través del aumento de la viabilidad de la cepa de mayor sensibilidad (*L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*). Las temperaturas de transición vítrea (T_g) obtenidas por DMA mostraron valores entre 160 y 180 °C, lo que confirma que los polímeros con alta T_g tienen una buena capacidad protectora de la célula bacteriana. Las isotermas se modelaron con las ecuaciones de GAB y de Iglesias –Chirife. Con el aumento de la actividad de agua se observó la disminución de la viabilidad bacteriana. A valores

CONTACTO: María José Tavera-Quiroz majotaqui83@gmail.com

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

2. Facultad de Ingeniería, UNLP, 47 y 116, La Plata (1900) Argentina.

inferiores al 33 % de humedad relativa, la cepa con mayor estabilidad durante los 105 días de almacenamiento fue el *L. plantarum*. El uso de películas de MC con la adición de FOS resultó ser una forma útil para preservar cepas de interés en la industria alimentaria.

2. INTRODUCCIÓN

La importancia de las bacterias ácido lácticas y los probióticos en la industria alimentaria y farmacéutica pone de manifiesto la necesidad de estrategias de preservación que garanticen una viabilidad adecuada hasta el final de la vida útil del producto. Por lo tanto, la incorporación de estos microorganismos en películas comestibles permitiría aumentar su resistencia a la deshidratación y almacenamiento. Las películas cargadas con probióticos se han utilizado como recubrimientos de alimentos para aprovechar los efectos beneficiosos de los microorganismos y ampliar la vida útil de diferentes productos (López de Lacey *et al.*, 2012). La metilcelulosa (MC) es un polímero de bajo costo, comestible (Li *et al.*, 2002), con buenas propiedades como agente formador de películas que ha dado lugar a aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (Bodvik *et al.*, 2010). Sin embargo, la obtención de películas de MC implica procesos de calentamiento y secado, por lo que bacterias ácido-lácticas sensibles como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* podrían resultar dañadas. El papel de los fructooligosacáridos (FOS) como protectores bacterianos en los procesos de deshidratación ha sido estudiado en los últimos años (Golowczyk *et al.*, 2011). Las propiedades estructurales y mecánicas de las películas de MC han sido analizadas, entre otros, por Tavera-Quiroz *et al.* (2013).

Sin embargo, la incorporación de FOS en películas de MC no ha sido objeto de estudio. En este trabajo, se estudiaron películas de MC cargadas con dos cepas de lactobacilos: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114. La elección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 se debe a que se trata de una cepa sensible ante cualquier proceso de conservación (Tymczyszyn *et al.*, 2012) y la de *L. plantarum* CIDCA 83114 a que inhibe el crecimiento y/o la actividad de *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* y *Salmonella* (Golowczyk *et al.*, 2011; Kakisu *et al.*, 2013). Se investigó además el efecto de los FOS agregados en las películas de MC considerando tanto la viabilidad bacteriana como las propiedades fisicoquímicas de las películas obtenidas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES FILMOGÉNICAS

Para la preparación de la solución filmogénica, 1,5 g de MC A4M (Methocel, Dow Chemical Co, U.S.A) se dispersaron en 50 ml de agua destilada a 80 °C bajo agitación constante. Luego se completó hasta un volumen total de 100 ml con agua destilada fría y se mantuvo bajo agitación hasta que alcanzó temperatura ambiente. Se agregó sorbitol (ANEDRA, Francia) 0,25 % p/v como plastificante (Tavera-Quiroz *et al.*, 2013). Los FOS (Orafti Beneo p95, Alemania) se incorporaron a la solución en concentraciones de 0 (control), 1, 2, 3 y 5 % p/v. La solución se esterilizó con filtros de 0,2 micras.

CEPAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 y *L. plantarum* CIDCA 83114, aisladas de leches fermentadas (Garrote *et al.*, 2001; Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999), se inocularon en caldo MRS a 37 y 30 °C en aerobiosis, respectivamente. 100 ml de cultivo fue obtenido por centrifugación y lavado con NaCl 0,85 % p/v.

PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS CARGADAS CON BACTERIAS

Los extractos bacterianos se diluyeron en 25 ml de solución filmogénica para obtener $1,1 \times 10^{10}$ UFC/ml de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y $2,7 \times 10^{12}$ UFC/ml de *L. plantarum*. 1,5 g de las soluciones de MC con y sin agregado de FOS, se dispersaron sobre placas de Petri (5 cm de diámetro) y se secaron en estufa de convección forzada a 40 °C. El espesor de las películas se determinó con un medidor de espesor DCN-900 (Nueva York, EE.UU.).

RECuento DE BACTERIAS VIABLES EN MEDIO SÓLIDO

50 mg de las películas de MC obtenidas con las distintas concentraciones de FOS fueron rehidratados en 5 ml de NaCl 0,85 % p/v. Las suspensiones se sembraron en agar MRS. Las placas que contenían *L. plantarum* se incubaron a 30 °C durante 24 h en aerobiosis (Golowczyc *et al.*, 2011), y las placas con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a 37 °C durante 48 h en aerobiosis (Tymczyszyn *et al.*, 2012).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las películas cargadas con bacterias se congelaron en nitrógeno líquido y se fracturaron. Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico modelo Quanta 200 FEI (Holanda), sin ningún recubrimiento metálico con un voltaje de aceleración de 12,5 kV.

OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE FTIR

Los espectros de FTIR de las películas de metilcelulosa se registraron en modo transmisión en un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.). Los espectros se obtuvieron en el rango de 4000-400 cm^{-1} , promediando 64 escaneos a 4 cm^{-1} de resolución espectral.

PROPIEDADES TÉRMICAS DE LAS PELÍCULAS OBTENIDAS

Los análisis dinámico-mecánico (DMA) se realizaron en un equipo Q800 (TA Instruments, EE.UU.). El ensayo de barrido de frecuencia se realizó desde -100 a 220 °C. La temperatura de transición vítrea se determinó a través del punto de inflexión de la curva $\tan \delta$.

ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE AGUA Y ALMACENAMIENTO

Las películas con bacterias fueron equilibradas a 4 °C en atmósferas de: LiCl, MgCl₂, K₂CO₃, NaCl, KCl cuyas humedades relativas (HR) fueron 11, 33, 44, 75, 85 y 97 %, respectivamente. El contenido de humedad de las películas se determinó a 105 °C hasta peso constante. Las películas se almacenaron durante 90 días a 4 °C. La viabilidad se determinó cada 15 días.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con Systat-software (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, EE.UU.). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), regresiones lineales y pruebas de comparación de LSD Fisher. El nivel de significación utilizado fue 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTO DE LOS FOS COMO COMPUESTOS PROTECTORES

La preparación de películas con bacterias incorporadas incluye dos pasos potencialmente dañinos para los microorganismos: el efecto osmótico de la solución filmogénica y la deshidratación debido al secado. El efecto de los FOS sobre la viabilidad se analizó mediante la inclusión de diferentes concentraciones en la solución filmogénica. La deshidratación dio lugar a una disminución en la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en ausencia de FOS. El aumento de la concentración de FOS tuvo un efecto protector hasta el 3 % p/v, mientras que no se observó una mejoría a concentraciones más altas (5 % p/v) (Figura 1A). *L. plantarum* CIDCA 83114 mostró una resistencia intrínseca mayor ante el proceso de deshidratación. En la Figura 1B se observa que no hubo diferencias significativas para las diferentes concentraciones de FOS cuando se estudió su viabilidad.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS PELÍCULAS CARGADAS CON BACTERIAS

La Figura 2 muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido. Ambas cepas bacterianas se ven completamente embebidas en la película de MC. La homogeneidad de las películas indica su integridad estructural, que no se ve afectada por la presencia de los microorganismos. Por otro lado, la morfología bacteriana no se alteró tras la incorporación en las películas de MC.

En la Figura 3 se muestran los espectros de FTIR de las películas de MC con y sin microorganismos. Se observó una banda a 3380 cm^{-1} en los tres espectros. Esta banda se puede atribuir al modo vibracional de todos los compuestos que tienen grupos OH (MC, sorbitol, FOS). Los grupos OH de los polisacáridos de las bacterias también contribuyen a la absorción de esta banda. En la región espectral correspondiente a 1750-1540 cm^{-1} , se observaron dos bandas débiles en el espectro de las películas de MC sin bacterias (Figura 3a). Estas bandas se pueden atribuir a pequeñas cantidades de agua atrapadas en la película. En la misma región, las películas cargadas con ambas bacterias mostraron dos bandas fuertes, en 1651 y 1547 cm^{-1} , correspondientes a las bandas amida I y II de proteínas (Figura 3b y c) (Gerbin *et al.*, 2011). En la región 1200-900 cm^{-1} las películas de MC absorben debido a la contribución de los enlaces glicosídicos C-O-C (en particular los de MC y FOS)

(Figura 3a) (Kizi *et al.*, 2002). Por otra parte, los puentes di-sulfuro (P-S-P) de las cadenas de ADN también absorben en esta región.

Las isotermas se modelaron con las ecuaciones de GAB y de Iglesias–Chirife (Tabla 1). Con el aumento de la actividad de agua se observó la disminución de la viabilidad bacteriana. A valores inferiores al 33 % de humedad relativa, la cepa con mayor estabilidad durante los 105 días de almacenamiento fue el *L. plantarum* (Figura 4a y b). Las películas con MC fueron analizadas por DMA con el fin de estudiar el efecto de los diferentes componentes en las propiedades térmicas. En la curva de $\tan \delta$ (Figura 5) se observan dos relajaciones, β y α . La relajación β en torno $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ es característica de polisacáridos. Otros autores consideran esta relajación β como una relajación típica del agua (Fernández-Carretero *et al.*, 2010). El segundo pico, relajación α , corresponde a la temperatura de transición vítrea (T_g). La incorporación de microorganismos en las películas de MC no tuvo efecto sobre la ubicación de la relajación β y T_g . En las muestras con FOS se observaron menores valores de T_g , tendencia que fue más evidente en presencia de FOS y bacterias simultáneamente. Estos resultados pueden ser explicados en relación con el mayor contenido de humedad de las muestras con FOS. De acuerdo a Park y Ruckenstein (2001) el cambio de la T_g demostraría la compatibilidad entre ambos FOS y MC, así como el efecto de plastificación de FOS.

ALMACENAMIENTO DE LAS PELÍCULAS CARGADAS CON BACTERIAS

Teniendo en cuenta que los FOS son buenos protectores bacterianos pero en altas concentraciones afectan la calidad de las películas de MC debido a su carácter higroscópico, la concentración de FOS fue seleccionada ponderando el efecto protector y la calidad de las películas. Por lo tanto, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se incorporó a películas que contenían 3 % de FOS y *L. plantarum* a películas con 1 % de FOS. Aún cuando los FOS al 1 % p/v no tuvieron efectos sobre la supervivencia de la última cepa, se los incluyó considerando posibles aplicaciones en alimentos funcionales (efecto prebiótico). La Figura 6 muestra la evolución de $\log N/N^0$ durante el almacenamiento de las películas con bacterias a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ equilibradas a diferentes HR. *L. plantarum* mostró un mejor rendimiento tras el almacenamiento a 11, 33 y 44 % de humedad relativa (Figura 6b). A 33 y 44 % de HR, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pudo ser almacenado hasta 15 días (Figura 6a). Al 75 % de HR, no se detectó viabilidad luego del tiempo de equilibrio. *L. plantarum* mostró viabilidad

hasta 75 % HR ($\log N/N_0: -2,05 \pm 0,25$), pero fue indetectable después de 15 días de almacenamiento. Por lo tanto, la incorporación de microorganismos en películas de MC que contienen FOS aparece como una buena estrategia para preservar y transportar bacterias lácticas, incluyendo aquellas que son altamente sensibles a la deshidratación y al almacenamiento. La capacidad de *L. plantarum* para sobrevivir en ambientes con mayor humedad relativa, juntos con sus propiedades inhibitorias permitiría la aplicación de películas con esta bacteria incorporada para la formulación de alimentos funcionales.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la capacidad de las películas de MC con FOS como vehículo para dos cepas de lactobacilos. Los resultados obtenidos mostraron que el desarrollo de este tipo de productos es una estrategia óptima para inmovilizar y almacenar probióticos en concentraciones compatibles con los requerimientos fijados por los organismos internacionales como la EFSA y la FDA. Además, esta estrategia permitiría potenciales aplicaciones de los microorganismos inmovilizados en el desarrollo de productos funcionales que contengan probióticos y prebióticos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BODVIK, R., Dedinaite, A., Karlson, L., Bergström, M., Bäverbäck, P., Pedersen, J. S., Edwards, K., Karlsson, G., Varga, I., & Claesson, P. M. (2010). Aggregation and network formation of aqueous methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 354, 162–171.
- CROWE, J. W., Hoekstra, F. A., & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54, 570–599.
- FERNANDEZ-CARRETERO, F. J., Riande, E., del Río, C., Sanchez, F., Acosta, J. L., & Compan, V. (2010). Preparation and characterization of hybrid membranes based on Nafion® using partially sulfonated inorganic fillers. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, 13, 83–93.
- GARROTE, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68, 639–652.

- GERBINO, E., Mobili, P., Tymczyszyn, E., Fausto, R., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987, 186–192.
- GOŁOWCZYK, M., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G., & Abraham, A. (2011). Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 556–560.
- GÓMEZ-ZAVAGLIA, A., Abraham, A., Giorgieri, S., & De Antoni, G. (1999). Application of polyacrylamide gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis to the analysis of *Lactobacillus delbrueckii* whole-cell proteins. *Journal of Dairy Science*, 82, 870–877.
- IGLESIAS, H. A., & Chirife, J. (1981). An equation for fitting uncommon water sorption isotherms in foods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 14, 105–106.
- KAKISU, E., Bolla, P., Abraham, A. G., de Urraza, P., & De Antoni, G. L. (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International Dairy Journal*, 33, 22–26.
- KIZIL, R., Irudayaraj, J., & Seetharaman, K. (2002). Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3912–3918.
- LÓPEZ DE LACEY, A. M., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2012). Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 277–282.
- PARK, J. S., & Ruckenstein, E. (2001). Viscoelastic properties of plasticized methylcellulose and chemically crosslinked methylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 46, 373–381.
- TAVERA-QUIROZ, M. J., Lecot, J., Bertola, N., & Pinotti, A. (2013). Stability of methylcellulose-based films after being subjected to different conservation and processing temperatures. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2918–2925.
- TYMCZYSZYN, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., & Schebor, C. (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 217–221.

7. TABLA Y FIGURAS

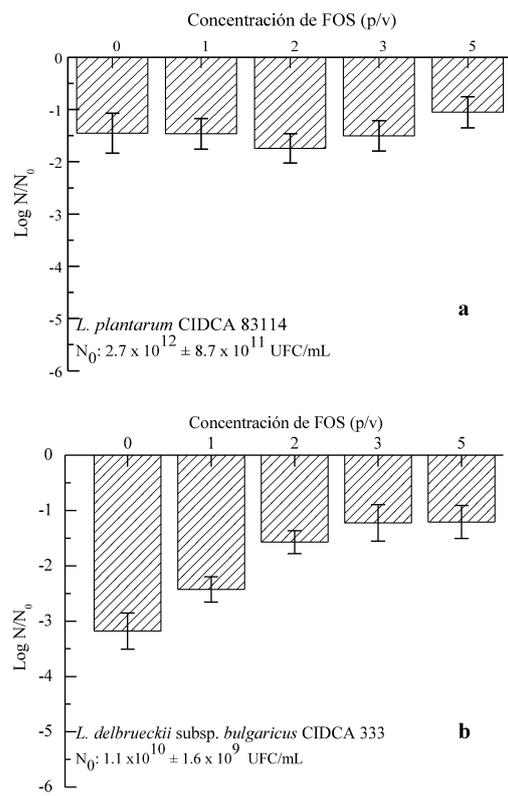


FIGURA 1. Log N/N₀ de microorganismos en películas de MC con distintas concentraciones de FOS. **a:** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333; **b:** *L. plantarum* CIDCA 83114

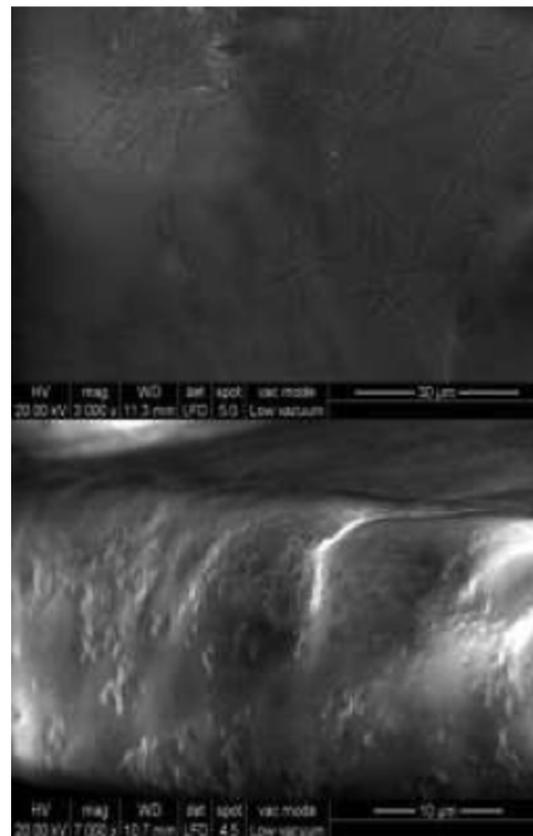


FIGURA 2. SEM de películas con: **a:** *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333; **b:** *L. plantarum* CIDCA 83114

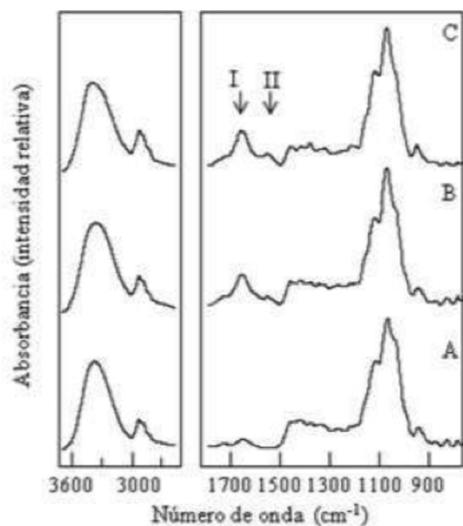


FIGURA 3. Espectro FTIR of: A: películas de MC ; B: con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333; C: con *L. plantarum* CIDCA 83114. I y II corresponden a las bandas de amida I y II.

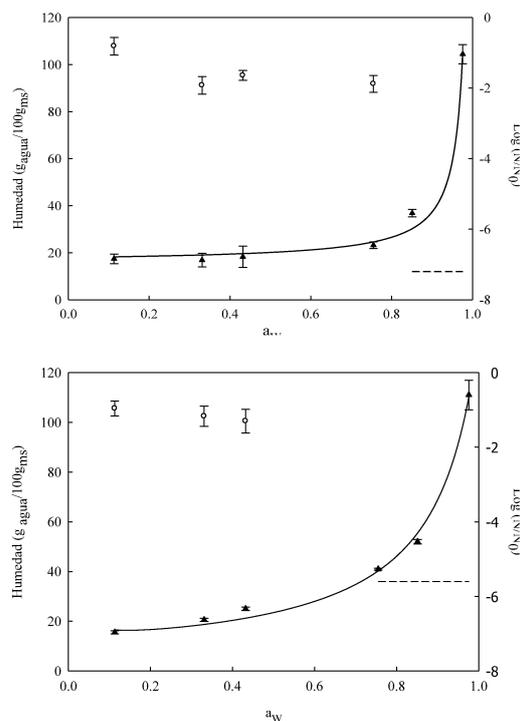


FIGURA 4. Humedad a 4 °C (\blacktriangle) y $\log N/N_0$ (\circ) en función de a_w . a: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333; b: *L. plantarum* CIDCA 83114. N corresponde a CFU/g película a cada a_w y N_0 , a CFU/g película después de la deshidratación. La línea punteada indica que $\log N/N_0 \leq -5$

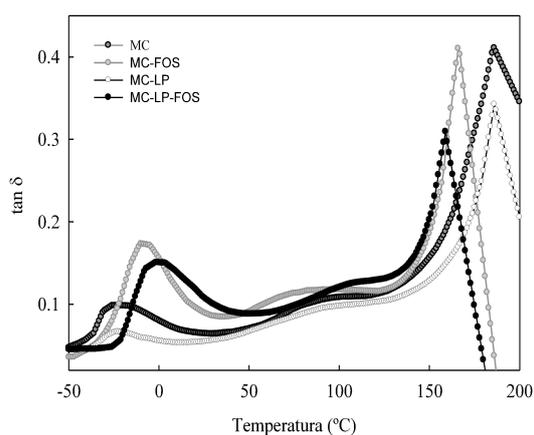


FIGURA 5. Efecto de la incorporación de FOS y/o bacterias sobre el espectro DMA de películas de MC

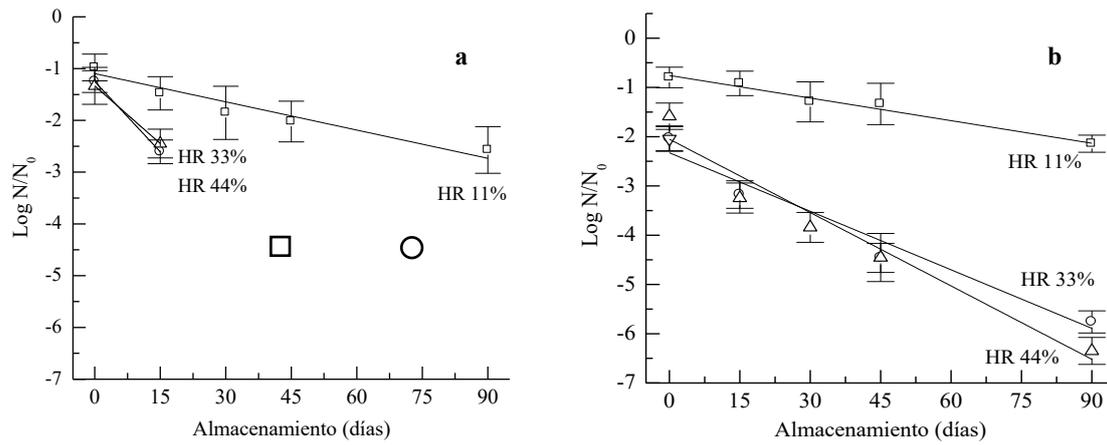


FIGURA 6. Log N/N_0 de microorganismos en películas de MC y almacenadas 90 días a 4 °C a distintas HR: 11 % (\square), 33 % (\circ), 44 % (Δ). Las líneas sólidas muestran la regresión para cada condición. **a:** *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en MC con 3 % FOS p/v; **b:** *L. plantarum* CIDCA 83114 en MC con 1 % FOS p/v

TABLA 1. Parámetros de las ecuaciones de GAB e Iglesias

PARÁMETROS DEL MODELO DE GAB			
M_0	C	K_{aw}	R^2
12,56	-56,53	0,908	0,992
PARÁMETROS DEL MODELO DE IGLESIAS Y CHIRIFE			
A	B	R^2	
2,17	17,98	0,991	