

Optimización de la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán

Zurisadai Maldonado-Alvarado, Alfredo Vázquez-Ovando*, Gamaliel Velázquez-Ovalle, Rito Coronel-Niño

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El atrapamiento de células en matrices poliméricas es una estrategia empleada para mantener la viabilidad. El quitosán posee propiedades funcionales que lo hacen adecuado para elaborar películas conteniendo microorganismos. Mediante un diseño de Plackett Burman y de Superficie de Respuesta, se evaluaron 7 factores y se combinaron componentes de la biopelícula de quitosán para optimizar la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas a la matriz. Se mantuvo un nivel de viabilidad de 39.32% en la etapa de cribado de los factores, siendo el tipo de quitosán y el tipo de ácido orgánico los de mayor efecto. La concentración de células y el tipo de carbohidrato empleados no ejercieron ningún efecto sobre la viabilidad. Después de optimizar los factores, se incorporaron 10^6 UFC mL⁻¹ de bacterias ácido lácticas en películas con la composición de, 1.5% de quitosán de bajo peso molecular, 1.5% de ácido láctico, pH de 4.5, 0.1 M de lactosa y almacenadas bajo condiciones de 90% HR. Las películas elaboradas con éstas condiciones mantuvieron 90.75% de la viabilidad de las células después de 7 días de almacenamiento. Este estudio demuestra que el efecto antimicrobiano del quitosán no afecta en gran medida la viabilidad de las BAL en períodos cortos de almacenamiento.

Optimizing the viability of lactic acid bacteria incorporated into chitosan films

Abstract

Cells entrapment in polymeric matrices is a strategy employed to maintain viability. Chitosan has functional properties that make it suitable for making films containing microorganisms. Using a Plackett Burman and Response Surface design, seven factors were evaluated and the components of the chitosan biofilm were combined for optimizing the viability of lactic acid bacteria incorporated into the matrix. A viability of 39.32% was maintained in the factor screening stage, with the type of chitosan and the type of organic acid having the greatest effect. The concentration of cells and the type of carbohydrate used had no effect on viability. After optimizing the factors, 10^6 CFU mL⁻¹ of lactic acid bacteria were incorporated into films with the composition of 1.5% low molecular weight chitosan, 1.5% lactic acid, pH 4.5, 0.1 M lactose and stored under 90% RH conditions. Films made under these conditions maintained 90.75% of cell viability after 7 days of storage. Our results demonstrate that the antimicrobial effect of chitosan does not greatly affect the viability of BALs in short storage periods.

Palabras clave:

Lactosa
MTT
Plackett Burman
Superficie de Respuesta

Keywords:

Lactose
MTT
Plackett Burman
Response Surface

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número. Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972
Correo-electrónico:
jose.vazquez@unach.mx

1. Introducción

El uso de películas o recubrimientos comestibles es una tecnología que se ha adoptado de manera acelerada en la industria de los alimentos. Su principal uso se orienta al alargamiento de la vida de anaquel, de frutos y hortalizas, manteniendo los atributos de calidad e inocuidad que pueden ser alterados durante la etapa de almacenamiento (Monzón-Ortega et al., 2018). Las películas comestibles son matrices continuas elaboradas con distintas biomoléculas (proteínas, polisacáridos, lípidos y otras) solas o combinadas (Neetoo y Chen, 2007). Los polisacáridos (almidón, carragenanos, pectina, quitosán, celulosa) son los polímeros más empleados para formar películas comestibles, debido a que cuando se forman, las películas funcionan de manera eficiente como barreras contra la humedad y el paso de gases y debido a que tienen propiedades mecánicas deseables para ser usadas incluso como bioplásticos. Las elaboradas con quitosán han sido de las más empleadas, debido a que además de formar películas con propiedades mecánicas deseables se reporta que posee actividad antimicrobiana (Salvador-Figueroa et al., 2017).

Además, las películas elaboradas con biopolímeros también pueden ser utilizadas como vehículos para la incorporación de agentes antimicrobianos, sustancias de interés farmacéutico, entre otros. Varios estudios han demostrado la efectividad de la incorporación de conservadores naturales en películas de quitosán, tales como aceites esenciales (Salvador-Figueroa et al., 2017; Seydim y Sarikus, 2006), donde se ha demostrado que la incorporación disminuyó el crecimiento de patógenos en la superficie de alimentos, con lo cual se consiguió el aumento en la vida de anaquel (Seydim y Sarikus, 2006).

Del mismo modo que se incorporan sustancias activas, en las películas se pueden incorporar enzimas o microorganismos que realicen una función específica, tal como bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales, se ha demostrado producen sustancias como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, etc.) que inhiben el crecimiento de agentes que causan la descomposición de los alimentos. La incorporación de BAL en películas permite obtener películas con capacidad de controlar microorganismos indeseables en alimentos tales como bacterias (Cálix y Rajendran, 2014) y hongos (Marín et al., 2019).

Sin embargo, cuando estos microorganismos requieren ser atrapados o inmovilizados en matrices poliméricas, debe tomarse en cuenta que varios factores pueden afectar su viabilidad. Se ha reportado que el pH más adecuado para mantener la viabilidad de bacterias ácido lácticas oscila entre 3.5 y 4.5 (Adamberg et al., 2003). Igualmente, se reporta que cuando las células no son deshidratadas (por liofilización, pulverización otro método) previo a la incorporación en la matriz, resulta altamente favorable mantener condiciones de humedad alta, tal como se reporta en películas elaboradas con alginato de calcio (Concha et

al., 2011). En otros reportes se ha demostrado que los oligosacáridos (Romano et al., 2014) o el gel de *Aloe vera* (Barragán-Menéndez et al., 2020) pueden ser empleados como fuente de nutrimentos para mantener la viabilidad e incluso la funcionalidad de las bacterias incorporadas como controladoras de *Listeria monocytogenes* (Concha et al., 2011, Hartmann et al., 2011).

Algunas de las características requeridas por las bacterias atrapadas pueden ser proporcionadas el quitosán, sin embargo, los estudios reportados se enfocan principalmente en el uso de otros polímeros como alginato o almidón (Cálix y Rajendran, 2014; Marín et al., 2019) o usan quitosán en combinación con otros polímeros (Barragán-Menéndez et al., 2020), suponiendo que el efecto antimicrobiano del quitosán puede ser un factor adverso en la viabilidad de las BAL. Con base en nuestra experiencia previa, planteamos la hipótesis que el quitosán puede mantener la viabilidad de las BAL, por lo que el objetivo del presente trabajo fue optimizar la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán modificando los componentes de la misma.

2. Materiales y métodos

2.1. Bacterias ácido lácticas

Dos cepas de bacterias codificadas como BAL5 y BAL11 fueron proporcionadas por el cepario del Instituto de Biociencias (IBC) de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), las cuales fueron sometidas a pruebas bioquímicas y morfológicas y han sido caracterizadas como bacterias ácido lácticas. Las BAL fueron reactivadas en caldo MRS y mantenidas en agitación para su crecimiento. Para estimar el tiempo requerido para obtener la máxima concentración de BAL en los cultivos puros se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento para cada una de las cepas. El pre-inóculo de BAL se creció en tubos de 13x100 conteniendo 3 mL de medio durante 48 h, luego el contenido se inoculó en matraces de Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo MRS fresco y a partir del tiempo de la inoculación cada 5 h se tomaron 3 mL con los cuales se midió la absorbancia a 560 nm (usando medio de cultivo como blanco) además se inocularon diluciones seriadas en medio MRS para determinar la concentración celular (Barragán-Menéndez et al., 2020). Las lecturas fueron seguidas hasta que no se observó cambio en las unidades (UFC y absorbancia). Se graficó la absorbancia como una función de la concentración y por interpolación se calculó la DO correspondiente a la máxima concentración de bacterias (10^9 UFC mL⁻¹). De manera similar, se estimó el tiempo para alcanzar esta DO. Se establecieron los tiempos para alcanzar una DO de $1 \pm 0.05 = 10^9$ UFC mL⁻¹, siendo 24 h para la cepa BAL5 y 48 h para la cepa BAL11.

2.2. Optimización de la viabilidad de las BAL

Primeramente, para determinar los factores de la composición de la película de quitosán que mayor

influencia ejercen sobre la viabilidad de bacterias ácido lácticas (BAL), se condujo un diseño experimental de cribado del tipo Plackett- Burman mediante un arreglo de 8 tratamientos o combinaciones, 7 factores (Tipo de quitosán, tipo de ácido orgánico, pH final, humedad relativa del ambiente, tipo de sustrato, concentración de BAL y contenido de humedad de la película) (Cuadro 1). Los niveles de cada factor fueron codificados con 1, -1 y

corresponden, dependiendo del factor a: Tipo de quitosán (1=quitosán de alto peso molecular, -1=quitosán de bajo peso molecular); tipo de ácido orgánico (1=ácido acético, -1=ácido láctico); pH (1=4.5, -1=3.5); humedad relativa del ambiente (1=90%, -1=70%); tipo de carbohidrato (1=glucosa, -1=lactosa); concentración de BAL (1= 10^6 UFC mL^{-1} , -1= 10^9 UFC mL^{-1}); humedad de la biopelícula (1=>25% de humedad, -1=20% de humedad).

Cuadro 1. Arreglo de Plackett- Burman de ocho tratamientos para evaluar la interacción de siete factores de la composición del medio en la viabilidad de bacterias ácido lácticas.

Combinación/ Tratamiento	Factores						
	Tipo de quitosán	Tipo de ácido	pH	HR del ambiente	Tipo de carbohidrato	Concentración de BAL	Humedad de la biopelícula
1	1	-1	-1	1	-1	1	1
2	1	1	-1	-1	1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	1	-1
4	-1	1	1	1	-1	-1	1
5	1	-1	1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	1	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Dependiendo del factor, los números (1, -1) representan; Tipo de quitosán: 1=quitosán de alto peso molecular, -1=quitosán de bajo peso molecular; tipo de ácido: 1=ácido acético, -1=ácido láctico; pH 1=4.5, -1=3.5; HR: 1=90%, -1=70%; tipo de sustrato: 1= glucosa, -1=lactosa; concentración de BAL 1= 10^6 UFC mL^{-1} , -1= 10^9 UFC mL^{-1} ; humedad de la biopelícula: 1=>25% de humedad, -1=20% de humedad. HR: humedad relativa.

Posteriormente, los dos factores cuyo efecto resultó altamente significativo ($\alpha=0.000059$) sobre la viabilidad de las BAL, fueron usados como parámetros para optimizar la composición de las películas mediante el diseño de superficie de respuesta. Se estableció una matriz factorial de nueve tratamientos en tres niveles para cada factor (Cuadro 3). Las películas para estos tratamientos, tuvieron la siguiente composición base: pH 4.5, >25% de humedad de la biopelícula, 0.1 M de lactosa como carbohidrato, concentración de 10^6 UFC mL^{-1} y una humedad relativa del ambiente mayor del 90%.

2.3. Elaboración de mezcla de soluciones para películas

Las soluciones para formar las películas fueron elaboradas siguiendo el procedimiento descrito por Binsi et al. (2013), empleando como polímero base quitosán al 1.5% p/v (alto o bajo peso molecular, según el tratamiento). Para lograr >25% de humedad de la matriz en los tratamientos correspondientes, primeramente se preparó una solución de almidón al 3% (p/v), la cual se sometió a calentamiento (85 °C) y agitación, hasta la gelatinización completa del almidón. Posteriormente la solución de almidón se mezcló en una proporción 1:1 (v/v) con la solución de quitosán. A partir de aquí se siguió el mismo procedimiento para los demás tratamientos. Según el tratamiento correspondiente, se ajustó el pH (4.5 o 3.5) con un ácido orgánico (acético o láctico). Las soluciones se agitaron hasta disolución completa del quitosán. Posteriormente, se adicionaron a las soluciones 100 mM de glucosa o, 100 mM de lactosa (según el tratamiento).

2.4. Incorporación de bacterias y formación de películas

El volumen de solución (medio de cultivo agotado) requerido para obtener las BAL (en función del tratamiento) fue centrifugado a 2500 $\times g$ durante 20 min y el paquete celular lavado dos veces con buffer PBS de pH 7. Posteriormente, las células fueron incorporadas a las soluciones de quitosán, las cuales se agitaron mecánicamente hasta lograr la homogenización completa. Para la elaboración de las películas, siguiendo el método de *casting*, se vertieron 3 mL de la solución en cajas de Petri de 60 mm x 15 mm. Se dejó secar por 24 h a 28 ± 2 °C; posteriormente fueron almacenados en un espacio común con condiciones de 28 ± 2 °C, 70% de HR, 12 h luz y 12 h oscuridad y, exclusivamente para los tratamientos que requerían una humedad relativa de 90%, las películas se colocaron en recipientes cerrados conteniendo una solución saturada de sulfato de potasio. Por cada tratamiento se elaboraron 32 unidades experimentales (una unidad experimental fue una caja de Petri conteniendo una película).

2.5. Evaluación de la viabilidad celular

A partir del día de secado de las películas (día cero), cada 24 h y durante siete días se evaluó la viabilidad de las BAL siguiendo la metodología descrita por Hegyi et al. (2012), basado en la prueba de reducción del tetrazolio, conocida como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para esto, se pesaron 0.03 g (b.s.) de película (por cuadruplicado), y se colocaron en tubos viales de 2 mL, se les agregó 1 mL de caldo MRS (fresco y estéril) para lavado, posteriormente se centrifugó a 6000 $\times g$ durante

10 min, se retiró el sobrenadante y se le agregó 1 mL de buffer PBS pH 7, luego se agitó durante 10 min. Del contenido obtenido, se tomaron 50 µL y se colocaron en viales, se le adicionaron 50 µL de solución MTT (0.3% disuelto en buffer PBS y 0.2% de dimetilsulfóxido), se dejó incubar 4 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 1500 xg durante 20 min, posteriormente se le agregaron 150 µL de DMSO para disolver los cristales formados y se agitó durante 10 min (en vortex). A esta solución, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 492-630 en un lector de microplacas Microplate Reader®, empleando como blanco de calibración buffer PBS. Este mismo procedimiento fue seguido tomando 1 mL del cultivo de células de BAL para obtener la DO de las células control. La viabilidad (%) se calculó a partir de la fórmula = (DO células tratadas/DO células control) x 100.

2.6. Análisis estadístico

Para definir y evaluar el diseño experimental se empleó el software Statgraphic Centurion XV v. 15.2.06. Estableciendo un límite de confianza de 5%, se probó la significancia de los diseños experimentales de Plackett Burman y factorial, así como las interacciones entre los factores. También se obtuvo el modelo de regresión que mostró el mejor ajuste para la relación entre la variable independiente (viabilidad) y las independientes que explicaron el óptimo.

3. Resultados

En la Figura 1 se muestran los valores de viabilidad de las BAL (%) contenidas en las películas durante los 7 días en que fueron evaluados. Para el día 7, los tratamientos con mayor porcentaje de viabilidad fueron los tratamientos 4 (39.32%), 6 (27.64%), 7 (27.44%) y 8 (21.51%). Adicionalmente, las películas de estos tratamientos fueron visualmente menos quebradizas, más manejables y de mejor aspecto táctil que las del resto de los tratamientos. Lo

común en estos cuatro tratamientos fue que las películas fueron elaboradas con quitosán de bajo peso molecular (-1, Cuadro 1). Para verificar el efecto aparente de este factor, se analizó estadísticamente la contribución de cada factor tomando como referencia los datos solamente del día 4 de almacenamiento, como un punto medio del comportamiento de la viabilidad (Cuadro 2).

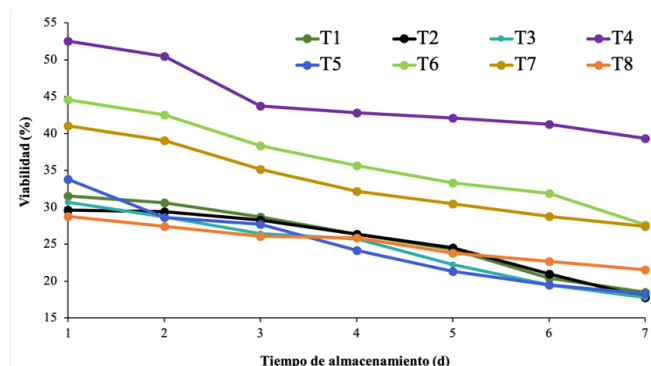


Figura 1. Tendencia de la viabilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) incorporadas en películas de quitosán durante 7 d de almacenamiento a temperatura ambiente. Los tratamientos (1-8) corresponden a la combinación de factores según el diseño de Plackett- Burman (ver Cuadro 1).

En el Cuadro 2 se puede observar como los factores tipo de quitosán y tipo de ácido tienen los valores absolutos más grandes, lo cual está denotando la mayor contribución a la viabilidad de las células. Sin embargo cuando los efectos fueron estandarizados, cinco de los siete factores resultaron significativos ($P < 0.05$). Solamente el tipo de carbohidrato empleado como sustrato y la concentración de células incorporadas a la película no tuvieron efecto sobre la variable de respuesta ($P > 0.05$). La magnitud y sentido de estos efectos puede dimensionarse con la visualización de la Figura 2.

Cuadro 2. Determinación efecto de los factores evaluados sobre la viabilidad de las bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán.

Viabilidad (%) al día 4	Tipo de quitosán	Tipo de ácido	pH	HR del ambiente	Tipo de carbohidrato	Concentración de BAL	Humedad de la biopelícula
26.34964747	1	1	-1	1	1	1	1
26.34964747	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
25.68061345	1	-1	1	-1	1	1	-1
42.81817714	-1	-1	1	1	1	-1	1
24.13668880	1	1	1	1	-1	-1	-1
35.61319541	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
32.16509701	-1	1	1	-1	-1	1	1
25.88647007	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
1	25.62915	27.13448	31.20014	32.22943	30.18373	29.95214	31.92064
-1	34.12073	32.61541	28.54974	27.52046	27.99650	29.79775	27.82924
Efecto estimado	-8.49159	-5.48093	2.650404	4.70897	2.18723	0.15439	4.09140

Dependiendo del factor, los números (1, -1) representan; Tipo de quitosán: 1=quitosán de alto peso molecular, -1=quitosán de bajo peso molecular; tipo de ácido: 1=ácido acético, -1=ácido láctico; pH 1=4.5, -1=3.5; humedad relativa ambiente: 1=90%, -1=70%; tipo de sustrato: 1=glucosa, -1=lactosa; concentración de BAL 1=10⁶ UFC mL⁻¹, -1=10⁹ UFC mL⁻¹; humedad de la biopelícula: 1=>25% de humedad, -1=20% de humedad.

Pese a lo anterior, para investigar solo los dos factores que más influencia ejercen sobre la viabilidad celular, se redujo el valor alfa a 0.00005 y se encontró congruente con el análisis previo que los factores tipo de ácido y tipo de quitosán fueron los de efectos principales. En este análisis ninguna interacción resultó significativa. Ambos factores presentaron la mayor viabilidad de células en su nivel -1 que correspondió a quitosán de bajo peso molecular y ácido láctico (barras de color azul, Figura 2).

En el Cuadro 3 se presentan los valores de viabilidad observada y los valores ajustados predichos por el modelo de regresión. Los valores de viabilidad observados se encontraron en un rango amplio, pues van desde 33.05% (tratamiento 2) hasta 90.75% (tratamiento 8). Se puede observar que los valores más altos de viabilidad (77.78%, 86.91% y 90.75%), se obtuvieron cuando las películas fueron elaboradas con concentraciones de ácido láctico de 1.5%. La mayor viabilidad observada se obtuvo cuando las películas se elaboraron con 1.5% de quitosán de bajo peso molecular y 1.5%, de ácido láctico, no obstante el valor predicho muestra la mayor viabilidad cuando las películas contienen 1.5% de ácido láctico y 1% de quitosán (tratamiento 1, Cuadro 3).

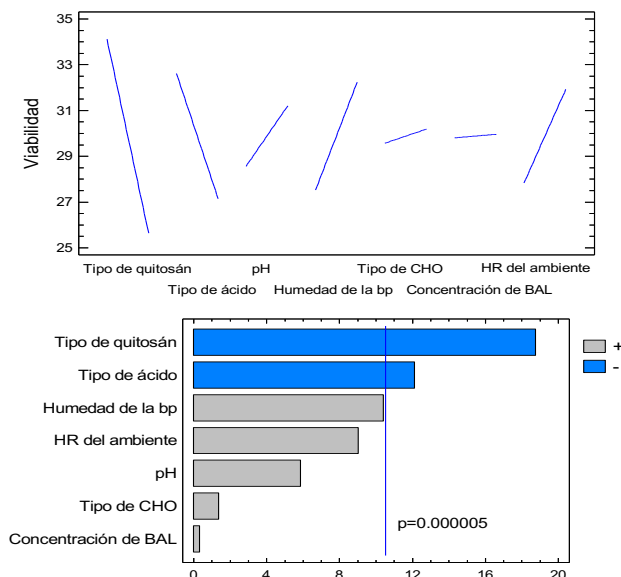


Figura 2. Gráfica de efectos principales (arriba) y diagrama de Pareto de los efectos estandarizados (abajo) para la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán.

Cuadro 3. Viabilidad de bacterias ácido lácticas y valores predichos ajustados por el modelo de regresión.				
Tratamiento	Concentración de quitosán de bajo PM (%)	Concentración de ácido láctico (%)	Viabilidad observada (%)	Valores predichos ajustados
1	1.0	1.5	86.91±3.7172	91.5106
2	1.5	0.5	33.05±0.6201	48.3556
3	2.0	1.0	52.64±2.8128	54.1022
4	2.0	0.5	67.86±4.9345	60.7372
5	1.0	0.5	58.33±4.4939	50.1472
6	1.0	1.0	49.16±2.2983	52.7422
7	1.5	1.0	51.38±5.3468	46.3356
8	1.5	1.5	90.75±0.3194	80.4889
9	2.0	1.5	77.98±5.4554	83.6406

Los valores observados son el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones.

En congruencia con lo anterior, en el Figura 3 se puede observar que tanto la variable de respuesta (superior) como la región óptima (inferior) se obtienen cuando la concentración de ácido láctico va de 1.3 a 1.5%. En la misma figura se puede apreciar la poca contribución de la concentración de quitosán, mismo que no resultó significativa en el análisis estadístico (P>0.05).

Excluyendo en el análisis la contribución de la concentración de quitosán, se detectó significancia solo para la variable concentración de ácido láctico (P=0.03) y, a partir de ahí se estableció la relación empírica entre las variables independientes (ácido láctico y quitosán de bajo peso molecular) y la respuesta, quedando descrita por la siguiente ecuación: Viabilidad (%) = 122.639 - 66.58*A - 84.87*B + 28.3467*(A)² - 18.46*AB + 72.3467*(B)², donde A=concentración de quitosán de bajo peso molecular; B=concentración de ácido láctico.

La adecuación del modelo para predecir la respuesta, fue verificada obteniendo el valor R²=0.811838; mismo que indica que el 81% de la viabilidad estaría explicada por la concentración de ácido y la concentración de quitosán de bajo peso molecular interactuando en el modelo de segundo orden descrito. Sin embargo, cuando la ecuación se ajusta al modelo de primer orden, la R² ajustada se reduce hasta 0.623675.

4. Discusión

De los siete factores que inicialmente se evaluaron por su influencia en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas, dos la afectaron de manera altamente significativa (P=0.000005, tipo de ácido y tipo de quitosán) tres lo hicieron de manera significativa (P<0.05), humedad de la película, humedad del ambiente y pH) y dos no mostraron ejercer efecto sobre la variable de respuesta (tipo de

carbohidrato y cantidad de células adicionadas). Estos resultados fueron reveladores, puesto que no existe mucha información respecto de cómo el tipo de ácido orgánico y tipo de quitosán afectan la viabilidad celular y en el análisis de optimización de respuesta se pudo ver como los valores más altos de viabilidad están condicionados sobre todo por la concentración de ácido láctico. El quitosán de bajo peso molecular es comúnmente empleado en la elaboración de películas debido a que ofrece mejores propiedades de manejabilidad en las mismas (Beverly y Janes, 2008). Dado que posee mayor grado de desacetilación, expone mayor número de grupos funcionales (glucosaminas), lo cual le confiere mayor naturaleza catiónica, que en determinadas condiciones puede tener gran afinidad a las envolturas o membranas de las bacterias que tienen carga negativa y promover su desestabilización (Li et al., 2010). Sin embargo, cuando interactúa con ácido láctico en solución, se ha demostrado que se forman grupos amida y existe policondensación del ácido láctico (Bhattarai et al., 2006), lo cual de algún modo en nuestro estudio aumentó notablemente la viabilidad de las BAL.

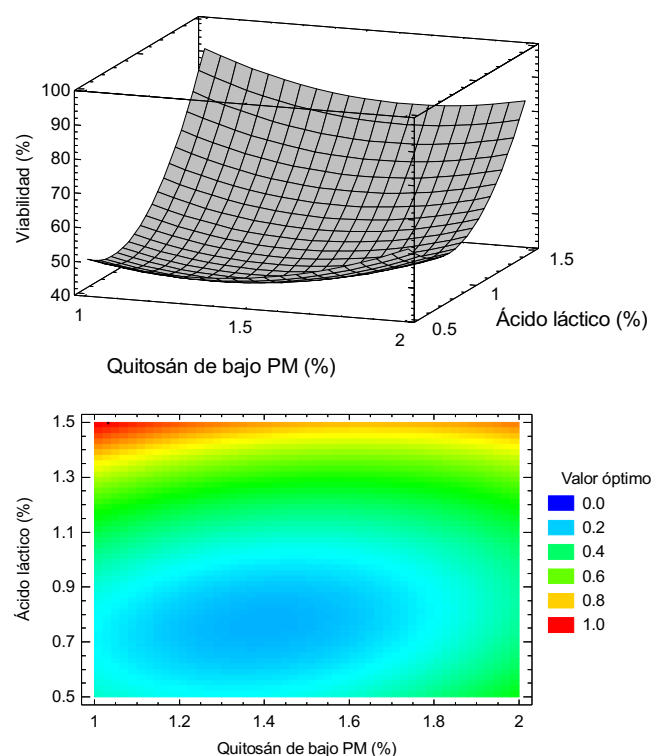


Figura 3. Superficie de respuesta (arriba) y contornos de la superficie de respuesta estimada mostrando el área del óptimo (abajo) para la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán con a diferentes concentraciones de ácido láctico y quitosán de bajo peso molecular.

Este marcado efecto del ácido orgánico (láctico) fue verificado en el experimento de optimización, pues puede verse que a la concentración más alta evaluada (1.5%) se

logró la mayor viabilidad, producida por la mayor sustitución de grupos aminos del quitosán (Bhattarai et al., 2006). El ácido láctico es el principal producto final del metabolismo de carbohidratos que realizan las BAL, y al estar presente en la películas desde el inicio del almacenamiento pudo proporcionar a las bacterias un ambiente favorable en la conservación de la viabilidad celular (Xio et al., 2013). El ácido láctico se ha usado con anterioridad en películas de glicerol, en donde se demostró que su uso aumentó la flexibilidad y la capacidad de retención de humedad de la película (Manab et al., 2011). Si lo anterior ocurrió en el presente estudio, pudo haber favorecido la viabilidad de las BAL. También se ha reportado que el uso de ácido láctico como disolvente de quitosán podría aumentar la solubilidad de la película (Lin y Zhao, 2007), lo cual en algunos casos puede resultar deseable (liberación de metabolitos) pero en otros puede ser indeseable (películas). Conveniente resulta evaluar las propiedades texturales y fisicoquímicas de las membranas aquí optimizadas.

Las películas elaboradas en el proceso de optimización de este trabajo presentaron mejores características táctiles (no determinadas), esto puede deberse a que la interacción de los factores que se combinaron influyeron directamente sobre las propiedades de manejabilidad, toda vez que se ha reportado que la adición de ácido láctico incrementa la manejabilidad de las películas de quitosán (Lin y Zhao, 2007).

El valor óptimo (deseable) para la viabilidad celular se encontró en el límite superior de la concentración de ácido láctico evaluada (1.5%). Lo anterior puede estar relacionado con el argumento antes planteado acerca de la cantidad de grupos amino libres interactuando con el ácido láctico. Esta hipótesis solo se cumple hasta cierta relación molar, pues se ha demostrado que con relaciones molares ácido:grupo amino superiores a 2.9 el quitosán se vuelve insoluble y no interactúa con el ácido orgánico (Bhattarai et al., 2006). Esto, aunado a los altos valores observados de viabilidad, lleva a pensar que el óptimo de viabilidad (deseabilidad de 1.0) encontrado en nuestro estudio está altamente correlacionado con los valores explorados. La validación empírica del modelo ajustado propuesto resolverá esta pregunta.

De los factores con menor significancia en el análisis de cribado (pH, humedad de la biopelícula y humedad relativa del ambiente, Figura 2), y que fueron empleados como fijos en la etapa de optimización, se ha reportado también su efecto en la viabilidad de las bacterias. Cuando el pH es elevado, las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico y otros ácidos orgánicos de cadena corta como resultado del metabolismo de carbohidratos, con lo cual disminuyen el pH como su principal mecanismo de antagonismo. Por lo anterior se ha determinado que algunos géneros como el *Lactobacillus* y bifidobacterias crecen con mayor facilidad a pH de 4.5 (Adamberg et al., 2003). En nuestro estudio encontramos que ese mismo pH (4.5) logró mantener la

viabilidad de las BAL incorporadas en las películas por siete días.

Después de las dos variables que mayor significancia tuvieron, los niveles de humedad, tanto de la película como del ambiente (humedad relativa) mostraron efecto sobre la viabilidad. Ambas variables mostraron una relación directa con la viabilidad, lo cual es un indicio de que las células empleadas en el presente estudio toleran poco la disminución en el contenido de humedad o requieren, bajo esas condiciones la adición de un osmoprotectante o crioprotectante, como ocurre en tratamientos donde se aplica liofilización o *spray-drying* para conservar células (Fonseca et al., 2015; Zamora et al., 2006). Por el contrario, los altos valores de viabilidad en el experimento de optimización son un indicio de que ambas condiciones de humedad interactuando con los factores en optimización, están proporcionando los valores de actividad de agua idóneos. Esto es congruente con las condiciones de humedad de donde estos microorganismos son aislados que oscila en valores de humedad arriba del 70% (Wenjun et al., 2012). Los carbohidratos son esenciales para la supervivencia de las bacterias ácido lácticas ya que son la base principal del metabolismo (Gänzle et al., 2007), sin embargo en nuestro estudio el tipo de carbohidrato no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad.

5. Conclusión

Durante la primera etapa del trabajo de investigación se obtuvo una viabilidad máxima de 39.32%, siendo los factores más influyentes el tipo de ácido orgánico (ácido láctico) y el tipo de quitosán (de bajo peso molecular). Mediante la optimización de estos dos factores, en la segunda etapa de este trabajo se logró incrementar la viabilidad de bacterias ácido lácticas hasta 90.75% encontrándose que la concentración de 1.5% de ácido láctico produce los valores más altos de viabilidad, sin efecto significativo del contenido de quitosán de bajo peso molecular. Los resultados de este estudio demuestran que las películas elaboradas a base de quitosán son funcionales como medio para conservar la viabilidad de bacterias ácido lácticas por un periodo de siete días.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

Adamberg K, Kaska S, Laht TM, Paalme T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology* 85: 171–183.

Barragán-Menéndez C, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Ovando-Medina I, Vázquez-Ovando A. 2020. Films of chitosan and *Aloe vera* for maintaining the viability and antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* TEP6. *Coatings* 10: 259.

Beverly R, Janes M. 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 25: 534–537.

Bhattarai N, Ramay HR, Chou S, Zhang M. 2006. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 1: 181–187.

Binsi PK, Ravishankar CN, Srinivasa-Gopal TK. 2013. Development and characterization of an edible composite film based on chitosan and virgin coconut oil with improved moisture sorption properties. *Journal of Food Science* 78: E526–534.

Cálix T, Rajendran M. 2014. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food Microbiology* 38: 192–200.

Concha M, Renate S, Brito C. 2011. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control* 22: 485–489.

Fonseca F, Cenard S, Passot S. 2015. Freeze-drying of Lactic Acid Bacteria. En: Willem F, Harriette W. (eds). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 2nd edn. Humana Press. New York, USA. Pp. 477–488.

Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel R. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24: 128–138.

Hartmann A, Wilke T, Erdmann R. 2011. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology* 146: 192–199.

Hegyí F, Zalán Z, Halasz A. 2012. Improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay for measuring the viability of lactic acid bacteria. *Acta Alimentaria* 41: 506–512.

Li X, Xiao GF, Yang S, Guo F, Ting-pu W, Zhong-xing S. 2010. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers* 79: 493–499.

Lin D, Zhao Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 60–75.

Manab A, Sawitri ME, Awwaly KU, Purnomo H. 2011. Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. *African Journal of Food Science* 5: 6–11.

Marín A, Plotto A, Atarés L, Chiralt A. 2019. Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience* 54: 337–343.

Monzón-Ortega K, Salvador-Figueroa M, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Ovando-Medina I, Vázquez-Ovando A. 2018. Characterization of *Aloe vera*-chitosan composite films and their use for reducing the disease caused by fungi in papaya Maradol. *Journal of Food Science and Technology* 55: 4747–4757.

Neetoo H, Chen H. 2007. Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 70: 1267–1271.

-
- Romano N, Tavera-Quiroz MJ, Bertola N, Mobili P, Pinotti A, Gómez-Zavaglia A. 2014. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International* 64: 560–566.
- Salvador-Figueroa M, Castillo-López D, Adriano-Anaya L, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Vázquez-Ovando A. 2017. Chitosan composite films: physicochemical characterization and their use as coating in papaya Maradol stored at room temperature. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29: 779–791.
- Seydim AC, Sarikus G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* 39: 639–644.
- Xio F, Lai Z, Lai C, Zhu M, Li S, Wang J, Wang X. 2013. Efficient production of L-lactic acid by an engineered *Thermoanaerobacterium aotearoense* with broad substrate specificity. *Biotechnology for Biofuels* 6: 124.
- Wenjum L, Qiuhua B, Jirimutu, Qing M, Siriguleng, Chen X, Sun T, Li M, Zhang J, Yua J, Bilige M. 2012. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research* 167: 110–115.
- Zamora LM, Carretero C, Parés D. 2006. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International* 12: 77–84.