

Obtención de una biopelícula probiótica comestible a partir de un subproducto a base de almidón

Luz Mary Montes Ramírez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería ECBTI
Programa de Ingeniería de Alimentos
2022

**Obtención de una biopelícula probiótica comestible a partir de un
subproducto a base de almidón**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniera de Alimentos

Luz Mary Montes Ramírez

Asesora:

Sindy Johana Escobar Luján

Ph.D. Ciencias Básicas

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería ECBTI
Programa de Ingeniería de Alimentos

2022

Tabla de contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	8
Objetivos.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
Marco Teórico.....	14
Metodología.....	22
Resultados y Discusión.....	31
Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	40
Referencias Bibliográficas.....	41

Lista de Tablas

Tabla 1 Características de algunos almidones usados en la industria alimentaria.....	18
Tabla 2 Composición de la glicerina cruda.....	19
Tabla 3 Caracterización fisicoquímica del almidón en base seca.....	32
Tabla 4 Comportamiento de las variables físicoquímicas durante el almacenamiento en refrigeración de la mora de castilla con la biopelícula probiótica.....	34
Tabla 5 Parámetros fisicoquímicos de mora de Castilla con estado de madurez grado 5.....	35
Tabla 6 Comportamiento de la viabilidad de la biopelícula probiótica sobre la mora de castilla durante el almacenamiento en refrigeración.....	36
Tabla 7 Verificación de los supuestos con los modelos de normalidad y homogeneidad para la variable de respuesta: Viabilidad.....	37
Tabla 8 Prueba de ANOVA y prueba de comparación de medias: Viabilidad.....	38

Lista de Figuras

Figura 1 Proceso de obtención del almidón a partir del claro de maíz.....	31
Figura 2 Diferencia de medias a través del tiempo de almacenamiento de la Biopelícula sobre la mora de castilla.....	38

Resumen

El incremento desmedido de material plástico derivado del petróleo utilizado en el empaque de muchos alimentos para su protección es una problemática mundial, por el impacto ambiental negativo que genera su desecho. Por esta razón, el diseño y desarrollo de nuevos materiales biológicos para el envasado que permita nuevas funcionalidades, menos impacto ambiental, y además un gran beneficio económico y saludable, se plantea la posibilidad del uso de biopelículas comestibles que pueden adherirse a superficies sólidas alimenticias, como una barrera semipermeable a gases, permitiendo mejorar propiedades fisicoquímicas, mecánicas, y estructurales para prolongar la vida útil de productos perecederos como por ejemplo las frutas tipo “bayas”. De esta manera, a este tipo de productos con el recubrimiento basado en una biopelícula probiótica comestible se le otorga un valor agregado, haciendo de este un alimento funcional que impacta en la salud de los consumidores. Por lo anterior, El objetivo de esta investigación es desarrollar un prototipo de biopelícula probiótica como material de recubrimiento de carácter funcional en la mora de castilla, a partir del subproducto que queda del proceso de cocimiento del maíz a base de polímeros de almidón. Se fundamentó en una primera fase de obtención, caracterización fisicoquímica, y finalmente se evalúa el efecto de la biopelícula sobre la superficie de la mora de castilla en términos de viabilidad del microorganismo probiótico *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y estabilidad de la fruta a través del tiempo. Los resultados obtenidos indicaron que la concentración del microorganismo probiótico *Bacillus coagulans* en la biopelícula al 2.5% sobre la fruta almacenada a 8°C bajo condiciones de refrigeración, hacia los 14 días no afecta la viabilidad de este microorganismo, al obtenerse 8.81 unidades logarítmicas (UFC/g); además en este mismo tiempo de 14 días la estabilidad de la mora se mantuvo en términos de sus propiedades físicoquímicas con un pH de 3.52, acidez de

2,34 de porcentaje de ácido málico, sólidos solubles de 7,37 grados brix, lo cual contribuyó a prologar la vida útil del producto fresco, que por lo general el periodo de estabilidad de este tipo de fruta bajo estas condiciones de almacenamiento no supera los 8 días, como se logra corroborar con el testigo (fruta fresca sin recubrimiento). Se concluye con estos resultados que el uso y el aprovechamiento de este tipo de biopolímero como subproducto (claro de maíz) representa una interesante alternativa debido a su fácil procesamiento, bajo costo, contribución al medio ambiente y una opción favorable en la conservación poscosecha de la mora de castilla con carácter probiótico que incide de manera favorable en la salud del consumidor.

Palabras Clave: Almidón, biopelícula, probiótico, mora de castilla.

Abstract

The excessive increase in plastic material derived from petroleum used in the packaging of many foods for its protection is a global problem, due to the negative environmental impact generated by its disposal. For this reason, the design and development of new biological materials for packaging that allow new functionalities, less environmental impact, and also a great economic and healthy benefit, raises the possibility of using edible biofilms that can adhere to solid food surfaces, as a semi-permeable barrier to gases, allowing to improve physicochemical, mechanical, and structural properties to prolong the useful life of perishable products such as "berry" type fruits. In this way, this type of product with a coating based on an edible probiotic biofilm is given added value, making it a functional food that impacts the health of consumers. Therefore, the objective of this research is to develop a probiotic biofilm prototype as a functional coating material in the Castile blackberry, from the by-product that remains from the corn cooking process based on starch polymers. It was based on a first phase of obtaining, physicochemical characterization, and finally the effect of the biofilm on the surface of the Castile blackberry is evaluated in terms of viability of the probiotic microorganism *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and stability of the fruit over time. The results obtained indicated that the concentration of the probiotic microorganism *Bacillus coagulans* in the biofilm at 2.5% on the fruit stored at 8°C under refrigeration conditions, at 14 days does not affect the viability of this microorganism, obtaining 8.81 logarithmic units (CFU/g); In addition, in this same time of 14 days, the stability of the blackberry was maintained in terms of its physical-chemical properties with a pH of 3.52, acidity of 2.34 percentage of malic acid, soluble solids of 7.37 brix degrees, which contributed to prolong the useful life of the fresh product, that in general the period of stability of this type of fruit under these storage conditions does not exceed 8 days, as

can be corroborated with the control (fresh fruit without coating). It is concluded with these results that the use and exploitation of this type of biopolymer as a by-product (corn clear) represents an interesting alternative due to its easy processing, low cost, contribution to the environment and a favorable option in post-harvest conservation of the blackberry with a probiotic character that favorably affects the health of the consumer.

Keywords: Starch, biofilm, probiotic, blackberry.

Introducción

En la industria de los alimentos apenas se está incursionando en el empleo de películas o recubrimientos comestibles a base de biopolímeros generados a partir de polisacáridos, proteínas, lípidos, con aditivos naturales y compuestos activos de tipo funcional para el organismo humano. Estos recubrimientos han jugado un papel importante ya que han demostrado ser efectivos en la conservación de frutas y hortalizas percederos para evitar las pérdidas poscosecha, por contribuir al control de la transferencia de gases, minimizar el crecimiento microbiano no deseado, así como al mantenimiento de las características de frescura exigidas por los consumidores como, apariencia fresca, firmeza, brillo, color, calidad y valor comercial (Montes-Hernández et al., 2017). Por tal razón, es una prioridad contribuir con el desarrollo de una biopelícula que permita mantener éstas características, para la conservación de productos agrícolas muy percederos, dadas las elevadas pérdidas por deterioro que se registran en estos tipos de productos que son, en su mayoría, generadas en la etapa poscosecha que incluye todas las actividades que se realizan entre la cosecha y el consumo, así como por deficiencias de orden tecnológico, tanto en la etapa de producción para la consecución de una buena calidad (Fernández –Valdés et al., 2015). En cuanto a las pérdidas poscosecha, según cifras estimadas más del 10% de la producción mundial de frutas, vegetales y granos se pierde después de la cosecha; cifras estas que en los países tropicales y subtropicales llegan a tener valores tan alarmantes como del 25-50% y superiores. En Colombia, al año se pierden y desperdician 6,1 millones de toneladas de frutas y vegetales (58 por ciento), así como 2,4 millones de toneladas de raíces y tubérculos (49 por ciento) (DNP, 2020). Adicionalmente, el material de empaque plástico utilizado para los productos hortofrutícolas generan altos grados de contaminación debido a su prolongado tiempo de degradación, ya que los más utilizados, son los elaborados a

partir de residuos petroquímicos, por su facilidad para moldear, económicos, aislantes del calor y por su resistencia que permiten transportar diferentes materiales, sus desperdicios son muy contaminantes por lo que no se degradan fácilmente, provocando un daño ambiental permanente, afectando a la población en general. Debido a “la crisis ambiental” que sufre el planeta debido a este tipo de contaminación y deterioro que presenta, ha motivado a buscar alternativas que contribuyan a contrarrestarlo.

El creciente interés de los consumidores hacia productos sanos, nutritivos, naturales y que beneficiosos para la salud, ha orientado y motivado investigaciones hacia el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles aplicados a productos hortofrutícolas, como una alternativa para cubrir estas necesidades. Estos se aplican con el objetivo de extender la vida útil de los alimentos y proveen la posibilidad de mejorar la seguridad del producto mediante la limitación de transferencia de humedad, oxígeno y compuestos responsables del sabor, color y aroma.

Desde el punto de vista tecnológico el empleo de películas y recubrimientos comestibles a base de polímeros de almidón para frutas y hortalizas, como alternativa bioconservante, se hará uso del subproducto del proceso de cocimiento del maíz para la elaboración de productos alimenticios, donde este residuo es vertido a los efluentes sin ningún control, siendo una gran alternativa para contribuir a la huella ambiental por su aprovechamiento. Con el uso de biopolímeros para el desarrollo de nuevos materiales de envase para recubrimientos se consigue una reducción de materiales poliméricos procedentes de fuentes no renovables, como el petróleo. Por otra parte, es relevante tener en cuenta las características y propiedades de estos biopolímeros ya que se debe definir y estandarizar este tipo de empaque según su aplicación.

A partir del aprovechamiento del almidón extraído del subproducto del proceso de cocimiento del maíz, se puede obtener un material con características viscosas y plásticas para el recubrimiento de productos hortofrutícolas por procesos de inmersión y secado (Falguera, 2011). Para esta aplicación, se contribuye de manera significativa en la reducción de pérdidas y desperdicios de este sector que cada día va más en aumento; además, del valor agregado que se le aporta a este grupo de alimentos, desde el punto de vista tecnológico, para el beneficio de la salud del consumidor al podersele adicionar otros agentes conservantes naturales de tipo funcional, que a futuro incidirán en el costo de estos materiales que han sido desechados.

Finalmente, este trabajo de investigación se desarrolló por el creciente interés de los consumidores hacia productos sanos, nutritivos, naturales que benefician la salud, lo cual permitió diseñar a partir de un subproducto del maíz una biopelícula probiótica comestible sobre un producto hortofrutícola como la mora de castilla, como una alternativa para cubrir estas necesidades no sólo nutricionales y funcionales sino también con el objetivo de extender la vida útil de este alimento durante su almacenamiento ya que se provee la posibilidad de mejorar la seguridad del producto mediante la limitación de transferencia de humedad, oxígeno y deterioro microbiano, además del valor agregado como un producto funcional.

Objetivos

Objetivo General

Diseñar una biopelícula probiótica comestible a partir de un subproducto a base de almidón de maíz con *Bacillus coagulans* ATCC®7050 para el recubrimiento de una fruta perecedera como la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

Objetivos Específicos

Realizar el proceso de extracción y caracterización del almidón a partir de un subproducto a base de almidón.

Obtener una biopelícula probiótica comestible por el método de gelatinización térmica.

Evaluar el efecto de la biopelícula probiótica sobre la viabilidad del microorganismo *Bacillus coagulans* ATCC® 7050 y la estabilidad sobre la mora de castilla bajo condiciones de almacenamiento refrigerado.

Marco Teórico

Biopelículas o Películas Comestibles

Definición

Las películas comestibles o biopelículas son consideradas como productos comestibles que forman una capa fina sobre una superficie sólida y que se caracterizan por ser una barrera semipermeable a gases y al vapor de agua, permiten mejorar las propiedades mecánicas, mantener la estructura del producto que envuelven y además pueden actuar como vehículo de sustancias bioactivas (Saavedra y Algecira, 2010). Al regular transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aroma, y compuestos de sabor en alimentos, los recubrimientos y películas comestibles han demostrado la capacidad de mejorar la calidad sensorial y nutricional, generar valor agregado y prolongar su vida de anaquel (Fernandez-Valdez et al., 2015).

Una película comestible (PC) se puede definir como una matriz continua, delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento (Ramos et al., 2012). Las películas se basan en características tales como costo, disponibilidad, atributos funcionales y principalmente a sus características fisicoquímicas (Ramos et al., 2013). Estas características son influenciadas por las condiciones bajo las cuales se preforman las películas, los tipos de materiales utilizados para su elaboración y la concentración de los mismos (Mahajan et al., 2014).

Clasificación

Las películas comestibles se han clasificado con base en el material estructural, de modo que se habla de películas basadas en proteínas, lípidos, carbohidratos o compuestas. El uso de películas comestibles ha sido principalmente desarrollado en alimentos altamente perecederos como los pertenecientes a la cadena hortofrutícola (De León-Zapata et al., 2015). El desarrollo

de películas comestibles a base de polisacáridos, lípidos y ceras ha conllevado un incremento significativo en las clases de aplicaciones que pueden tener y la magnitud de productos que pueden ser tratados, ya que se logra extender la vida de anaquel de las frutas o vegetales (Kester and Fennema, 1986).

Composición

Las películas comestibles pueden ser elaborados a partir de una gran variedad de polisacáridos, proteínas y lípidos, solos o en combinaciones que logren aprovechar las ventajas de cada grupo, dichas formulaciones pueden incluir, conjuntamente plastificantes y emulsificantes que se utilizan de diversa naturaleza química con la finalidad de ayudar a mejorar las propiedades finales de la película o recubrimiento. Las mismas presentan bondades como comestibilidad, dureza, transparencia, buenas propiedades de barreras contra el oxígeno y vapor de agua (Ribeiro et al., 2007).

Los polisacáridos y las proteínas son polímeros que forman redes moleculares cohesionadas por una alta interacción entre sus moléculas, esta les confiere buenas propiedades mecánicas y de barrera a gases (O₂ y CO₂), por lo cual retardan respiración y envejecimiento de muchas frutas y hortalizas (Eric, 2009). Los polisacáridos son los hidrocoloides más utilizados en la industria alimenticia, ya que forman parte de la mayoría de las formulaciones que actualmente existen en el mercado. Sin embargo; una desventaja que presentan es que son hidrónicos y, por lo tanto, constituyen una pobre barrera a la pérdida de humedad. Los utilizados en la formación de recubrimientos comestibles son: las pectinas de alto y bajo metoxilo, la celulosa y sus derivados, el alginato, el quitosano, la dextrina, el carragenato, y la goma arábica, entre otros (Krochta y Mulder-Johnston, 1997).

Los lípidos se caracterizan por ser hidrofóbicos y no poliméricos, presentando excelentes

propiedades de barrera frente a la humedad, sin embargo, su falta de cohesividad e integridad estructural hace que presenten malas propiedades mecánicas formando recubrimientos quebradizos; sin embargo, reducen la transpiración, la deshidratación, la abrasión en la manipulación posterior y pueden mejorar el brillo y la apariencia de muchos de los alimentos. Dentro del grupo de lípidos aplicados a recubrimientos y películas comestibles se pueden mencionar las ceras (abejas, candelilla y carnauba), resinas, monoglicéridos, diglicéridos y los ácidos grasos tales como el ácido esteárico, palmítico, láurico y oleico, entre otros (Kester y Fennema, 1986).

Otros componentes de gran importancia en la elaboración de PC son los plastificantes y emulsificantes. En el caso particular de los plastificantes (moléculas pequeñas de bajo peso molecular), se adicionan con el objetivo de mejorar la flexibilidad y funcionalidad de los recubrimientos, haciéndolos menos frágiles. Dentro de los agentes plastificantes más utilizados se encuentran: el glicerol, ácidos grasos, sorbitol, aceites, ceras y otros, mientras que, los emulsificantes favorecen la dispersión del lípido en la matriz hidrocoloide y reducen la actividad de agua superficial, además también se emplea la adición de antioxidantes a fin de mejorar las propiedades y la capacidad de las cubiertas. (Aguilar, 2005).

Ventajas y Propiedades

Las propiedades funcionales que permitan controlar o aminorar las causas de alteración de los alimentos a recubrir, algunas de estas ventajas y propiedades son:

- Ser libres de tóxicos y seguros para la salud.
- Deben requerir una tecnología simple para su elaboración.
- Ser protectores de la acción física, química y mecánica.
- Presentan propiedades sensoriales: deben ser transparentes y no ser detectados durante su consumo.
- Mejoran las propiedades mecánicas y preservan la textura.
- Prolongan la vida útil de alimentos a través del control sobre el

desarrollo de microorganismos. • Pueden regular distintas condiciones de interfase o superficiales del alimento, a través del agregado de aditivos como antioxidantes, agentes antimicrobianos y nutrientes. Presentan propiedades de barrera como transferencia de distintas sustancias, adecuada permeabilidad al vapor de agua, solutos y una permeabilidad selectiva a gases y volátiles, desde el alimento hacia el exterior y viceversa.

Atributos de las Materias Primas

Material Polimérico de Recubrimiento: El Almidón de Maíz. El almidón es una materia prima en abundancia, específicamente el que proviene del maíz, tiene propiedades termoplásticas cuando se realiza la disrupción estructural a nivel molecular. La presencia de amilosa en un 70% en almidones de amilo-maíz da una estructura fuerte y más flexible a la película. La estructura ramificada de la amilopectina generalmente le da a la película pobres propiedades mecánicas. En la Tabla 1, se muestran las características de algunos almidones usados en la industria de los alimentos (Badui, 2006).

Los materiales poliméricos como los almidones, utilizados como envases primarios o material de recubrimiento, desde el punto de vista de la transferencia de masa, no constituyen con el producto que contienen sistemas totalmente estáticos, sino que forman sistemas dinámicos caracterizados por un intercambio de compuestos de bajo peso molecular entre el envase, su contenido y el entorno que los rodea. Este intercambio consiste en movimiento de moléculas relativamente pequeñas, mediante fenómenos de difusión, adsorción y desorción de gases, vapores y líquidos, que irreversiblemente conducirán a: Un cambio gradual en la composición del producto envasado que puede afectar a su calidad final y aptitud para el consumo, debido a la incorporación (migración) o pérdida de componentes (desorción o permeación), desde su producción hasta el momento de su consumo (Fernández et al., 2015).

El problema que han presentado las películas fabricadas con almidón es la sensibilidad a la humedad, la cual se ha reducido utilizando en las formulaciones polivinilalcohol (PVA), glicerina, sorbitol, bases nitrogenadas (Enríquez, et al., 2012).

Tabla 1

Características de algunos almidones usados en la industria alimentaria.

Tipo	Amilopectina (%)	Amilosa (%)	Temperatura de Gelatinización (°C)	Tamaño del Granulo (micras)
Maíz	69-74	26-31	62-72	5-25
Maíz rico en amilosa	20-45	55-80	67-80	5-25
Papa	73-77	18-27	58-67	5-100
Arroz	83	17	62-78	2-5
Tapioca	82	18	51-65	5-35
Maíz céreo	99-100	0-1	63-72	5-25
Sorgo Céreo	99-100	0-1	67-74	5-25
Trigo	76	24	58-64	11-41

Fuente: Badui (2006).

Subproducto: Claro de Maíz. El claro de maíz es el resultado del proceso de cocción del maíz blanco o amarillo ya descascarado. Durante la cocción del maíz, parte del almidón contenido en el grano se gelatiniza liberando gran cantidad de cadenas de amilosa y amilopectina, las cuales quedan en disolución en el agua caliente (Hallauer, 1994). Es así, como en el trabajo de investigación realizado por García et al. (2006) demuestran mediante la determinación del contenido de almidón en grano cocido y crudo, que gran parte del almidón contenido en el maíz crudo se libera durante el lavado y la cocción del grano. Además, el almidón superficial es inicialmente arrastrado con el agua de lavado y durante la cocción, parte del almidón se solubiliza en el agua caliente gelatinizándose y formando el "claro de maíz". El

porcentaje de almidón del grano de maíz crudo fue de 69.335% comparado con el maíz cocido de 24.883%, donde concluyen que la cantidad total de almidón liberada durante este proceso es de aproximadamente el 40% del almidón original del grano de maíz crudo.

Material Plastificante: Glicerol o Glicerina. Es un producto natural y se utiliza para suplementos y medicamentos. Debido a su dulzura puede ser utilizada como edulcorante en varios productos, incluyendo las bebidas ya que está compuesta del 60% de sacarosa, también cumple una función muy importante como retenedor de humedad, generando así una hidratación en los alimentos en los que está presente. Adicionalmente esta es muy utilizada en la industria panadera, así como en las industrias fabricantes de dulces cumpliendo la función de no dejar cristalizar el azúcar; en los licores tiene la función de ser espesante. Su uso en general es de ser estabilizante muy parecido al CMC (Carboximetil celulosa). De acuerdo a Schröder y Südekum (1999) la glicerina cruda es usada en la alimentación animal y puede clasificarse en tres categorías (Tabla 2).

Tabla 2

Composición de la glicerina cruda.

Característica	Calidad		
	Baja	Media	Alta
Humedad (%)	26.8	1.1	2.5
Composición de la materia seca (%)			
Glicerol	63.3	85.3	99.8
Extracto etéreo	0.7	0.44	n.a
Fósforo	1.05	2.36	n.a
Sodio	0.11	0.093	n.a
Potasio	2.20	2.33	n.a
Plomo	26.7	0.04	n.a
Metanol			

Fuente: Schröder y Südekum (1999).

En general las películas formuladas con glicerol presentan mayor flexibilidad y elongación, mientras que las que se formulan con etilenglicol presentan mayor fuerza de tensión. Por ejemplo, en estudios realizados, donde aumentan la concentración de glicerol de 25 a 75% la fuerza tensil disminuye de 46.87 a 11.72 MPa, mientras que el porcentaje de elongación aumenta de 10.87 a 98.14% (Jongjareonrak et al., 2006).

Agente Bioactivo: *Bacillus coagulans* (Microorganismo Probiótico). Desde el punto de vista morfológico microscópico se trata de una bacteria Gram-positivas. Es el único microorganismo probiótico formador de esporas, que produce una estructura no reproductiva temporal con información hereditaria, envuelta por un revestimiento exterior resistente. Las esporas pueden sobrevivir sin nutrientes y son extremadamente resistentes a los factores adversos, como la radiación ultravioleta, la desecación, temperatura alta, la congelación y los productos químicos (Jimenez-Pranteda, 2010).

El *Bacillus coagulans* es una bacteria capaz de producir esporas, ácido láctico, bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta. Su ingesta no muestra efectos adversos o signos de toxicidad. Se le considera como un probiótico con la capacidad de sobrevivir al medio ácido del estómago y de generar beneficios en la digestión, sistema inmune, reducción de colesterol total a nivel sanguíneo y en la prevención de la caries dental en niños. En cuanto a su uso para el sistema digestivo, esta bacteria puede reducir los episodios de diarrea asociada al uso de antibióticos y puede reducir los síntomas vinculados con el síndrome del colon irritable. Adicionalmente, se ha observado una reducción en las concentraciones de proteína C reactiva en personas con artritis reumatoide (Gómez, 2018).

Probióticos. Son microorganismos que cuando son administrados en cantidades

adecuadas a un hospedero ejerce un efecto benéfico sobre su salud (FAO/WHO, 2001). Estas bacterias tienen varias características interesantes, entre ellas, que resisten el ambiente ácido del estómago. Asimismo, colonizan el lumen intestinal y forman una comunidad al interactuar simbióticamente con otros microorganismos comensales que habitan el intestino. Dicha comunidad debe mantener un equilibrio en términos de número y función, para que la absorción de los nutrientes consumidos por el hospedador se mantenga. Los probióticos ejercen múltiples roles que van desde el simple bloqueo físico para microorganismos patógenos, hasta la modulación de respuestas inmunitarias para controlar la presencia de otros microorganismos como bacterias y virus (Sanders, 2008).

Asimismo, los probióticos pueden ser una fuente importante de sustancias bioactivas (proteínas, ácidos grasos, polisacáridos, vitaminas, antioxidantes, etc.) que, hoy en día, son motivo de interés científico e industrial. Es por esto que en la actualidad se ofrecen múltiples productos terapéuticos, alimentos funcionales (nutracéuticos) y suplementos que incluyen probióticos vivos o metabióticos para prevenir o tratar enfermedades agudas y crónicas como diarrea, inflamación intestinal, arteriosclerosis, cáncer, hipertensión, caries, etc. (Iqbal et al., 2014).

Metodología

Este es un proyecto de investigación aplicada de tipo cuantitativo experimental en el desarrollo de un proceso biotecnológico para la elaboración de una biopelícula probiótica con *Bacillus coagulans* ®-7050 a base de almidón obtenido y recuperado del claro de maíz como material de recubrimiento para un producto frutícola como la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). El proceso se fundamentó en una primera fase de extracción del almidón mediante centrifugación, tamizado, decantación, secado y finalmente, su caracterización en términos fisicoquímicos y de rendimiento; una segunda fase consistente en la producción de la biopelícula probiótica por el método de gelatinización térmica y, posteriormente, en una tercera fase se evalúa el efecto de la biopelícula sobre la superficie de la fruta antes mencionada, en términos de viabilidad del microorganismo probiótico y estabilidad de la fruta a través del tiempo.

Material y Equipo Experimental

Material de Recubrimiento Comestible

Subproducto a base de almidón obtenido del claro de maíz, como material polimérico comestible biodegradable y funcional.

Material Plastificante

Glicerol grado alimenticio.

Material Bioactivo

Cepa probiótica *Bacillus coagulans* ATCC®-7050.

Fase 1. Obtención y Caracterización del Almidón del Claro de Maíz

Proceso de Obtención

En esta fase se realizó un proceso de extracción de almidón a partir del subproducto del claro de maíz, mediante la aplicación de las siguientes operaciones unitarias:

Se aplicó el método de tamizado o separación manual, el cual se empleó con el fin de separar las partículas de diferentes tamaños presentes en el claro de maíz. Para ejecutar el tamizaje, se pasó la mezcla por un tamiz o colador casero, separando las partículas gruesas y pequeñas presentes. La operación de tamizado, finalmente se realiza lavando con agua hasta que el líquido de salida no llevará partículas de almidón hasta la obtención de un color transparente. Esta solución se dejó reposar por 24 horas en refrigeración a temperatura de $8^{\circ}\text{C}\pm 2$. Posteriormente, después de la refrigeración del material por 24 horas se sometió a un proceso de centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos y se realizó la separación de la fase sólida (más densa) que quedó en el fondo del recipiente y la fase líquida en la superficie (sobrenadante), la cual fue retirada con facilidad (decantación). Una vez, se eliminó el sobrenadante de la solución se obtuvo en el fondo del recipiente una pasta blanca que corresponde al almidón. Esta pasta fue llevada a un proceso de secado a una temperatura de 40°C por 24 horas. El material obtenido se muele para obtener un polvo fino y finalmente, el material se pesa para la determinación de la cantidad de almidón y el rendimiento del proceso. Se empacó en bolsas plásticas al vacío para evitar la hidratación del producto al atrapar la humedad del ambiente.

Caracterización Fisicoquímica del Almidón

A continuación, se describen las determinaciones realizadas:

Determinación de pH. Se preparó una suspensión pesando 10g de almidón o pasta blanca obtenida en un vaso de precipitado de 100mL y se adicionan 50 mL de agua, se agitó continuamente por 5 min. Se determina el pH potenciométricamente con un peachimetro previamente calibrado marca Velp.

Determinación de Humedad. El contenido de humedad se determinó por pérdida de peso, para esto, se pesaron aproximadamente 2,5 gramos del material y se sometió a secado durante un periodo de 12 horas a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en un horno convectivo marca Binder.

Determinación de Sólidos Solubles. El contenido de sólidos solubles se determinó por refractometría colocando una gota de la muestra sobre el lente del refractómetro Marca Atago. Los resultados se expresaron en grados Brix.

Tamaño de Partícula. El tamaño medio de partícula se determinó de acuerdo a la metodología de Edmundson citada por Sinko (2006) donde se describe el tamaño representativo de una muestra de material en estudio, para lo cual se utilizó un estéreomicroscopio Marca Olympus (Lente de 5X). Para la determinación se colocó una muestra muy pequeña del material a cuantificar (almidón) sobre un portaobjeto puesto en la cuadrícula del equipo, se observó la morfología, tamaño y bordes de las partículas de almidón. En total se tomaron 20 partículas para ser analizadas y medidas. Finalmente, se saca un promedio de la medida del tamaño expresado en micras (μm).

Determinación de la Temperatura de Gelatinización. Se aplicó la técnica propuesta por Grace, 1977, donde los gránulos de almidón se calientan en solución a temperaturas altas alcanzando una temperatura específica en la cual se inicia el hinchamiento de los gránulos. El procedimiento para determinar la temperatura de gelatinización fue el siguiente:

A partir del almidón seco obtenido a partir del claro de maíz se preparó una concentración de 3% p/v y se disolvió en agua destilada hasta completar a 100 ml.

Se calentó agua en un vaso de precipitado de 250 mL a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por separado se tomaron 50 mL de la suspensión al 3% en otro vaso de precipitado de 100 mL.

El vaso de precipitado con la muestra se introdujo dentro del vaso de precipitado en el agua a 85 °C.

Se agitó con el termómetro constantemente la suspensión de almidón hasta formarse una pasta viscosa y hasta que la temperatura permaneciera estable por unos segundos y se registró la temperatura de gelatinización directamente en el termómetro.

Finalmente, se determinaron los cálculos del valor promedio de los resultados de la temperatura de gelatinización basados en cinco repeticiones más o menos la desviación estándar.

Rendimiento del almidón obtenido. Se determinan a partir del volumen del claro de maíz hasta la obtención del almidón seco y molido. Se expresa en porcentaje en base seca.

Fase 2. Producción de la Biopelícula Probiótica

Esta fase se desarrolló en tres actividades para la producción de la biopelícula en el siguiente orden: preparación de la suspensión plastificante con glicerol, producción de la biomasa microbiana con *Bacillus coagulans* ATCC®-7050 (agente bioactivo) y elaboración de la biopelícula (incorporación de la suspensión plastificante + agente bioactivo).

Preparación de la Sustancia Plastificante

Se utilizó el glicerol en una concentración de 30% (v/v) en 100 ml de la solución de almidón al 3%.

Producción de la Biomasa Microbiana

Cepas de *Bacillus coagulans* ATCC®-7050 fueron conservadas en crioviales (pelets con glicerol al 1%), y luego reconstituidas en caldo MRS (De Man et al., 1960) incubadas a 37°C por 24 horas en condiciones microaerofílicas. La biomasa posteriormente es recuperada por centrifugación (5000 rpm) a 4°C. Para el escalamiento de la biomasa inicial, esta fue transferida

a 500 mL de caldo MRS e incubada bajo agitación lenta (50 rpm) en las mismas condiciones anteriores para la obtención de una concentración final de células no menor a 10^6 UFCg-1.

Finalmente, las células fueron recuperadas por centrifugación y lavadas para la preparación de una concentración al 5.0% p/v para adicionar a la biopelícula. (Rodríguez-Barona y Montes, 2012).

Procedimiento para la Elaboración de la Biopelícula (Incorporación de Material Plastificante + Agente Bioactivo)

Para la obtención de la biopelícula, una vez se conoce la temperatura de gelatinización térmica del almidón se incorpora el material plastificante en una concentración del 30% (v/v) con el fin de obtener un material con características plásticas adecuadas. Una vez se llega a la temperatura de gelatinización junto con el glicerol (material plastificante), y con agitación constante se deja enfriar la mezcla bajando la temperatura para la adición del microorganismo (agente bioactivo) a una temperatura de 40°C (temperatura óptima para el manejo del microorganismo probiótico). Una vez incorporado el microorganismo a la suspensión se agita mediante movimientos circulares leves con varilla de vidrio esteril para evitar una posible contaminación. Esta suspensión se siembra en medio selectivo agar MRS y se incuba bajo condiciones microaerófilas a una temperatura de 40°C por 24 horas, para la determinación de la concentración inicial y la viabilidad del microorganismo en la suspensión que se utilizaría para el recubrimiento de la mora de castilla (Fritzen-Freire et al., 2012). Se realizaron tres repeticiones para la obtención de un valor promedio expresado en LogUFC/mL. Es importante que la concentración del probiótico en la biopelícula alcanzara un valor promedio por encima de 8 unidades exponenciales para proceder al recubrimiento de la fruta en estudio.

Fase 3. Recubrimiento de la Biopelícula sobre la Mora de Castilla

Esta fase fue con el objetivo de evaluar el efecto de la biopelícula probiótica sobre la viabilidad del microorganismo *Bacillus coagulans* ATCC® 7050 y la estabilidad de la mora de castilla bajo condiciones de almacenamiento refrigerado a 8°C.

Posterior a la obtención de la biopelícula con viabilidad probiótica comprobada por encima de 8 unidades logarítmicas exponenciales de UFC/ml, se procedió a seleccionar, clasificar y acondicionar la fruta en términos de limpieza y desinfección para el proceso de recubrimiento con la biopelícula probiótica, de la siguiente manera:

- Las frutas utilizadas completamente sanas con un grado de madurez 5 de acuerdo a la clasificación de la Norma Técnica Colombiana (NTC 4108).
- Se realizó el despitonado de las moras y de inmediato son lavadas y desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio al 5% por inmersión durante 5 minutos, para garantizar la ausencia de microorganismos contaminantes. El exceso de humedad se retira con toallas absorbentes estériles y se procedió a pesar cada una de las frutas para dar inicio al proceso de recubrimiento con la solución almidonada.
- A las moras se les insertó en la parte superior un palillo estéril para facilitar la inmersión en la solución almidonada y así obtener un recubrimiento uniforme. Se retiró el exceso de solución hasta que esta dejara de gotear.
- Luego del proceso de inmersión en la solución almidonada se llevó a secado en horno conectivo a 30°C durante 15 minutos. Una vez seca la biopelícula sobre la mora se pesó nuevamente y se almacenaron en cajas plásticas termoformadas en acetato con orificios para facilitar el proceso respiratorio de la fruta frente al intercambio de gases.

- Las moras ya recubiertas con la biopelícula se llevaron a unas condiciones de almacenamiento en refrigeración a 8°C.
- Finalmente, se realizaron evaluaciones fisicoquímicas (pH, acidez, sólidos solubles y pérdida de peso) y estudio de viabilidad del microorganismo probiótico a través del tiempo cada 7 días iniciando en tiempo cero (0) de inicio hasta evidenciar la pérdida de la estabilidad de la fruta, entendida como alteraciones fisicoquímicas y pérdida de la viabilidad del microorganismo probiótico en la biopelícula que no fuera menor a 6 unidades logarítmicas porque estaría perdiendo su carácter de alimento funcional.

Se aplicó un diseño experimental de dos factores de 2 X 5, en un primer factor con dos niveles de concentraciones de microorganismo *B. coagulans* al 2.0% y 2.5% en la biopelícula y el segundo factor con cinco niveles para tiempo de almacenamiento a los 0, 7, 14 y 21 días. Es un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Los resultados son presentados como la media±desviación estándar de las repeticiones determinadas. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) con significancia estadística de p valor<0.05. Se aplica prueba de comparación de medias mediante Tukey al 5% para ver si hay diferencias entre los tratamientos. Se usó el software R Core Team (2022).

Variables de Respuesta

- pH
- Acidez (% de ácido málico)
- Sólidos solubles (Grados Brix)
- Viabilidad (Log UFC/ g)
- Pérdida de peso (g)

Modelo propuesto para el experimento

En la ecuación (1) se presenta el modelo para el experimento de dos (2) factores:

$$Y_{ijI} = \mu + \alpha_j + \beta_i + (\alpha\beta)_{jl} + e_{ijI} \quad (1)$$

Donde:

- Y_{ijI} : = La observación i-esima, para el tratamiento donde el factor A esta en el nivel j y el B en el nivel I.
- μ : = Indica el efecto promedio del experimento.
- α_j : = Indica el efecto promedio del j-esimo nivel del factor A.
- β_i : = Indica el efecto promedio del I-esimo nivel del factor B.
- e_{ijI} : = Error experimental.

Hipótesis planteadas

Para el análisis y la expresión de los resultados en este proyecto de investigación se plantearon las siguientes hipótesis, teniendo en cuenta de manera importante la variable de respuesta la estabilidad y la viabilidad del microorganismo probiótico sobre la mora de castilla en almacenamiento refrigerado a $8^{\circ}\text{C}\pm 2$.

Donde:

α = Concentración de la biopelícula (2% y 2.5%)

β = Tiempo de almacenamiento (0, 7, 14, 21 días)

Hipótesis A

H_0 : La concentración de la biopelícula no afecta la viabilidad de la biomasa celular y la estabilidad en la mora de castilla en almacenamiento refrigerado a $8^{\circ}\text{C}\pm 2$. Vs. H_1 : la

concentración de la biopelícula afecta la viabilidad de la biomasa celular y la estabilidad en la mora de castilla en almacenamiento refrigerado a $8^{\circ}\text{C}\pm 2$.

Hipótesis B

H_0 : El tiempo de almacenamiento no afecta la viabilidad de la biomasa celular y la estabilidad en la mora de castilla en almacenamiento refrigerado a $8^{\circ}\text{C}\pm 2$. Vs. H_1 : El tiempo de almacenamiento afecta la viabilidad de la biomasa celular y la estabilidad en la mora de castilla en almacenamiento refrigerado a $8^{\circ}\text{C}\pm 2$.

Hipótesis C

H_0 : No hay interacción entre la concentración de la biopelícula y el tiempo de almacenamiento. Vs. H_1 : hay interacción entre la concentración de la biopelícula y el tiempo de almacenamiento.

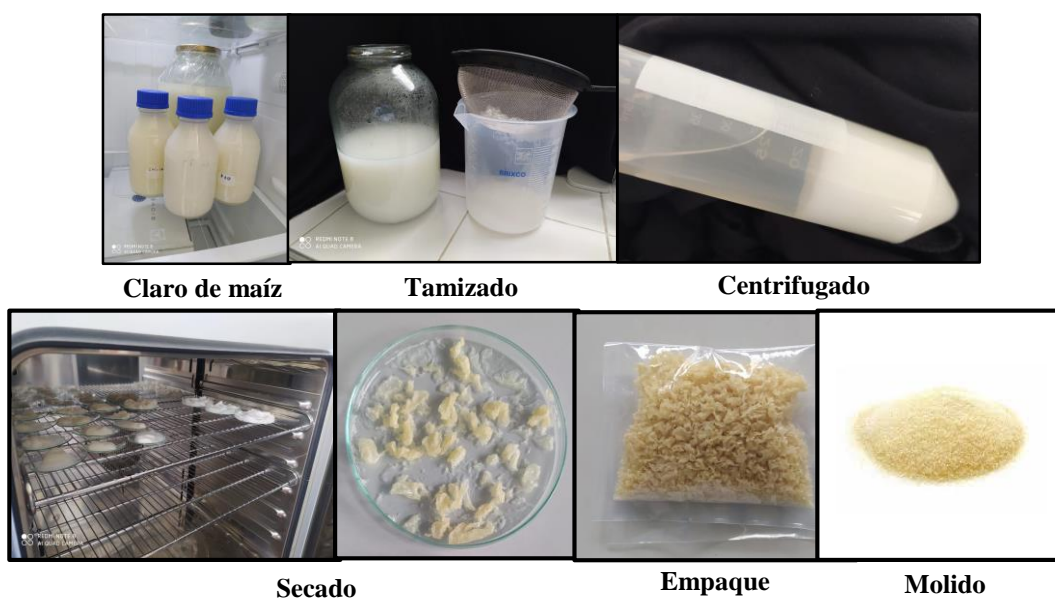
Resultados y Discusión

Obtención y Caracterización del Almidón del Claro de Maíz

Se realizó el proceso de extracción de almidón a partir del claro de maíz por centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos. Se procedió a la decantación y el producto sedimentado correspondiente al almidón fue llevado a secado a una temperatura de 40°C durante 48 horas. Pasado este tiempo de secado se obtuvo un material en forma de pellets, y finalmente, este material fue pulverizado en un molido Marca ILKA. Los rendimientos obtenidos fueron del 38% aproximadamente. En la Figura 1, se presenta paso a paso el proceso de obtención del almidón.

Figura 1

Proceso de obtención del almidón a partir del claro de maíz.



Fuente: Autoría propia

Caracterización del Almidón

Posterior al molido, se determinaron algunas características fisicoquímicas, como se muestran en las Tabla 3.

Tabla 3

Caracterización fisicoquímica del almidón en base seca.

Parámetro	Resultado
pH	6.0 ± 0.03
Humedad (%)	7.8 ± 0.0.5
Tamaño de partícula (µm)	30 ± 0.15
Temperatura de gelatinización (°C)	80 ± 0.18

Promedio de tres repeticiones± la DE

La literatura reporta que el valor del pH en un almidón nativo debe estar entre 6,0-6,5. El resultado presentado en la Tabla 3, muestra un valor dentro del rango normal, lo cual indica que el producto no ha sufrido un proceso fermentativo de tipo ácido, el cual es generado por presencia de hongos que liberan amoniacado e incrementa este parámetro.

La humedad obtenida, es comparable con Acosta y Blanco, (2013) en su trabajo de investigación de caracterización de almidones nativos, donde reportan un porcentaje de humedad de almidón de maíz muy cercano (7.44%) al obtenido en este estudio (7,8%).

En cuanto al tamaño de partícula el 99 por ciento de los gránulos de almidón deben pasar a través de un tamiz de malla 100 o el 95 por ciento pasar a través de un tamiz de malla 140 (106 µm). El valor que se reporta en este estudio es de 30 µm, valor por debajo de lo reportado en la literatura en almidones de maíz nativos (Acosta y Blanco, 2013), esto se explica probablemente por su obtención y extracción de un medio como el claro de maíz donde se encuentra disuelto, bajo en sólidos y que ya ha pasado por un proceso de calentamiento durante la cocción.

La gelatinización o hidratación del almidón es importante recordar que consiste en un proceso que se da debido a las propiedades hidrofílicas que este tiene por la presencia de grupos

hidroxilos que tienen los polímeros de glucosa, atrayendo moléculas de agua y formando puentes de hidrógeno entre ellas. Dicho de otra forma, la temperatura de empaste o de gelatinización es un índice del ordenamiento (asociación) intragranular, por lo que mientras mayor sea este valor, mayor será el grado de asociación entre las macromoléculas en el interior del gránulo de almidón (Lisi, 2012). La baja temperatura de gelatinización puede verse afectada por el bajo contenido de sólidos de la suspensión utilizada. Autores como Lisi (2012) en sus investigaciones obtienen una temperatura de gelificación en almidón nativo de maíz de 83.5°C a pH de 5.5; Tester (2004) afirma que las temperaturas de gelatinización se encuentran en un rango de 60 a 85 ° C dependiendo de varios factores, incluyendo la fuente de almidón, las cantidades relativas de amilosa y amilopectina, y la cantidad de humedad disponible para la hidratación, significa que las moléculas de almidón se separan mientras los granos absorben agua. A medida que absorbe agua, la viscosidad de la lechada de almidón se incrementa hasta un punto donde el estado granular del almidón se pierde. Esto ocurre porque los granos de almidón se dispersan hasta formar una masa amorfa y junto con el agua termina formando un gel. Este proceso de gelatinización es irreversible. El grado de gelatinización es muy importante porque produce cambios en sus propiedades reológicas, las cuales son determinantes desde el punto de vista del proceso y funcionalidad del almidón y dan las características del producto final (Alavi, 2003).

Cada almidón tiene un diferente grado de cristalización y por lo tanto se hincha y gelatiniza en distintas condiciones de temperatura. Una mayor temperatura de gelatinización en almidones nativos, refleja una mayor estabilidad interna del gránulo de almidón, normalmente asociada a una mayor presencia de zonas semicristalinas (amilosa) y a un menor contenido de amilopectina (Lamberti M, 2004). De acuerdo a lo anterior, la temperatura de gelatinización obtenida del almidón extraído del claro de maíz fue de 80 °C, lo cual indica que está dentro del

rango establecido en la literatura científica de 60 a 85 ° C (Tester,2004), demostrando que aún el grano no ha perdido su estabilidad.

De otro lado, los resultados indican que la cantidad de agua influye significativamente sobre la entalpía de gelatinización del proceso, es decir, el valor de la entalpía disminuye a medida que la cantidad de agua aumenta. Las variaciones también son dependientes de la rapidez con que se efectúa la transformación del almidón cuando alcanza la temperatura de gelificación. Finalmente, los análisis permitieron corroborar, que esta transición en el almidón es dependiente de factores extrínsecos durante el proceso. Este conocimiento sobre la gelatinización del almidón es útil para optimizar procesos industriales derivados de éste (Pineda-Gómez et al., 2010).

Evaluación del Efecto de la Biopelícula Probiótica sobre la Viabilidad del Microorganismo *Bacillus coagulans* ATCC® 7050 y la Estabilidad de la Mora de Castilla bajo Condiciones de Almacenamiento Refrigerado

A continuación, en la Tabla 4 se muestra el comportamiento de las propiedades fisicoquímicas de la mora recubierta con la biopelícula probiótica en dos concentraciones del microorganismo *Bacillus coagulans* ATCC 7040 de 2.0% y 2.5%.

Tabla 4

Comportamiento de las variables físicoquímicas durante el almacenamiento en refrigeración de la mora de castilla con la biopelícula probiótica.

Variable	Biopelícula al 2%				Biopelícula al 2.5%			
	0	7	14	21	0	7	14	21
pH	3.31±0.01	3.38±0.02	3.48±0.04	3.71±0.04	3.21±0.04	3.43±0.08	3.52±0.07	3.76±0.09
Acidez titulable (% ácido málico)	2.70±0.13	2.72±0.04	2.34±0.12	2.16±0.04	2.72±0.02	2.72±0.02	2.34±0.12	2.16±0.05
Sólidos solubles (°Brix)	8.23±0.25	8.1±0.10	7.70±0.26	5.4±0.46	8.04±0.17	8.1±0.10	7.37±0.25	5.6±0.26
Pérdida de peso (%)	0.00±0.00	5.84±0.62	21.82±0.91	25.78±0.69	0.00±0.00	6.33±0.43	21.81±0.25	25.54±0.27

Promedio de tres repeticiones± la DE

Es importante mencionar que los parámetros iniciales, es decir, en el tiempo 0 (cero) se ajustan a la Norma Técnica Colombiana para un estado de madurez grado 5, lo cual indica que el producto cumple con un estándar de calidad como producto fresco al inicio del proceso de almacenamiento Tabla 5.

Tabla 5

Parámetros fisicoquímicos de mora de Castilla con estado de madurez grado 5.

Norma Técnica Colombiana –NTC 4108		
pH	Acidez titulable (% ácido málico)	Sólidos solubles (°Brix)
2.5 – 2.8	2.8 máximo	7.2 a 7.9*

*Los sólidos solubles pueden ser mayores según la procedencia climática de la fruta que al estar un poco por encima no significa índice de deterioro.

Los cambios fisicoquímicos a través del tiempo para cada variable con el material de recubrimiento biológico en ambas concentraciones muestra un proceso lento de deterioro que comienza a evidenciarse a partir de los 14 días de almacenamiento a $8^{\circ}\text{C}\pm 2$, siendo más marcados hacia los 21 días; en general, el pH se incrementa y la acidez y los sólidos solubles van disminuyendo, lo cual indica un proceso normal de senescencia que se ratifica con una pérdida de peso mayor al 20%, donde la fruta muestra una deshidratación. No obstante, este tipo de fruta sin ningún tratamiento, bajo condiciones de refrigeración similares a los 8 días de almacenamiento el proceso de deterioro es más rápido y significativo, de acuerdo a estudios de poscosecha realizados por algunos investigadores (Reina, et al., 1998).

Con respecto a la viabilidad del microorganismo en el material de recubrimiento de la fruta en ambas concentraciones de 2.0 y 2.5%, en la Tabla 6, se muestra hacia los 14 días una concentración de células viables de 7 y 8 unidades logarítmicas expresadas en UFC/g, respectivamente. Este resultado se considera favorable porque hacia los 14 días de almacenamiento, se puede decir que es el momento máximo de estabilidad de la mora de castilla

con carácter funcional por sus propiedades probióticas que se cumplen por encima de 6 unidades logarítmicas expresadas en UFC/g de acuerdo a la resolución 810 de 2021 y que puede categorizarse como un alimento funcional.

Tabla 6

Comportamiento de la viabilidad de la biopelícula probiótica sobre la mora de castilla durante el almacenamiento en refrigeración.

Variable	Biopelícula al 2%				Biopelícula al 2.5%			
	0	7	14	21	0	7	14	21
Viabilidad (Log UFC/g)	8.47±0.24	8.23±0.11	7.60±0.32	6.28±0.19	9.42±0.04	9.25±0.01	8.81±0.26	6.54±0.32

Promedio de tres repeticiones± la DE

Efecto de la Biopelícula Probióticas sobre la Estabilidad y la Viabilidad del Microorganismo

***Bacillus coagulans* ®7050 sobre la Mora de Castilla**

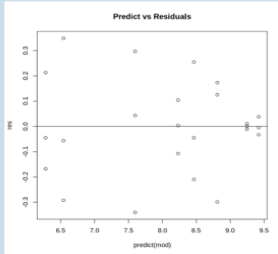
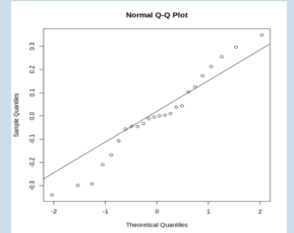
A los factores y cada variable de respuesta, previamente se le han aplicado y verificado los supuestos de los modelos de normalidad de Shapiro-Wilk y el test de Bartlett de homogeneidad de varianzas, donde para ambas pruebas debe resultar un p-valor > al 0.05, no se rechaza H_0 , por lo tanto, los datos se distribuyen de manera normal.

Una vez cumplidos los supuestos, de acuerdo a las hipótesis planteadas para su afirmación se realizó análisis de varianza con un nivel de significancia del 95%, para un p-valor de 0.05.

En la Tabla 7, se presenta la información del análisis de los modelos de normalidad y homogeneidad para la variable de viabilidad, donde se indica el cumplimiento de todos los supuestos.

Tabla 7

Verificación de los supuestos con los modelos de normalidad y homogeneidad para la variable de respuesta: Viabilidad.

Variable de respuesta	P-VALUE		
	Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)	Test de Homogeneidad	Test de Bartlett de homogeneidad de varianzas
Viabilidad (Log UFC/g)	0.6418		Bartlett's K-squared = 0.080504, df = 1 Bio p-value= 0.7766
			Bartlett's K-squared = 7.6868, df = 3 Tiempo p-value= 0.05295

En la Tabla 8, se presenta el análisis de varianza para la variable viabilidad expresada en Log UFC/g, muestra para el factor concentración de la biopelícula 2.0 y 2.5% una diferencia estadísticamente significativa con un p-valor de $4.41e-08$. Con respecto a la interacción entre la concentración de la biopelícula y el tiempo de almacenamiento se reporta una diferencia significativa con un p-valor de de 0.009 para el establecimiento de un nivel de significancia al 95%. Finalmente, al aplicar la prueba Tukey al 5% para la comparación de cada una de las medias con respecto al tiempo de almacenamiento, se determina que entre los 0 y 7 días de almacenamiento no se evidencia una diferencia significativa, sin embargo, de manera importante en los demás tiempos si se evidencia una diferencia estadísticamente significativa. (Figura 2). Con este análisis se logra concluir que el mejor tratamiento obtenido fue a una concentración de la biopelícula de 2.5% hacia los 14 días de almacenamiento, reportando el valor de viabilidad del microorganismo probiótico (*Bacillus coagulans*) más alto de 8.81 ± 0.26 unidades logarítmicas expresados en UFC/g.

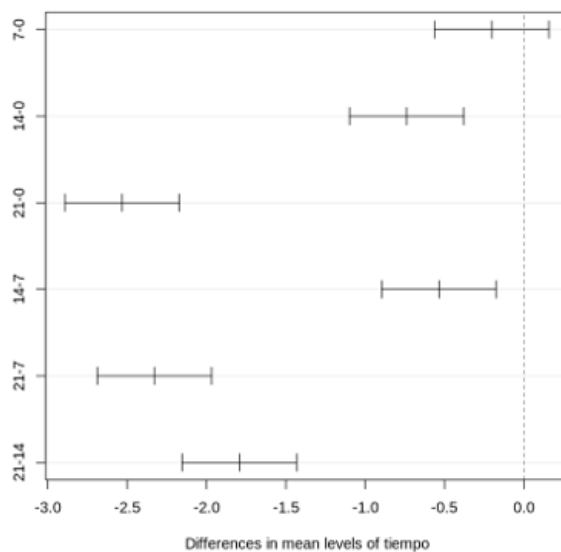
Tabla 8

Prueba de ANOVA y prueba de comparación de medias: Viabilidad.

Variable de respuesta	P-VALUE					Test de Tukey al 5%		
	ANOVA con nivel de significancia del 95%					Bio 2,5-Bio 2,0 P-value = 0.000		
Viabilidad (Log UFC/g)	FV	gl	SC	CM	F	p-Valor	Tiempo	p-value
	Biopelícula	1	4.45	4.45	93.38	4.41e-08	7-0	0.4006626
	Tiempo	3	23.87	7.95	166.98	2.77e-12	14-0	0.0001290
	Bio:Tiempo	3	0.76	0.25	5.38	9.36e-03	21-0	0.0000000
	Error	16	0.76	0.04			14-7	0.0030868
	Total	23	29.84	12.69			21-7	0.0000000
						21-14	0.0000000	

Figura 2

Diferencia de medias a través del tiempo de almacenamiento de la Biopelícula sobre la mora de castilla.



Fuente: Autoría propia

Conclusiones

En cuanto a la caracterización del almidón obtenido a partir del claro de maíz resulta tener características fisicoquímicas muy similares a los almidones obtenidos directamente a partir del grano seco, ya que se ha demostrado en los análisis de caracterización valores muy cercanos a los almidones en grano nativos.

La concentración de la biopelícula al 2.5% no afecta la viabilidad al obtenerse 8.81 unidades logarítmicas (UFC/g), hacia los 14 días de almacenamiento en refrigeración de la mora a través del tiempo; además la estabilidad de la mora se mantiene en términos de sus propiedades fisicoquímicas con un pH de 3.52, acidez de 2,34 de porcentaje de ácido málico, sólidos solubles de 7,37 grados brix.

Se concluye con estos resultados que el uso de este tipo de biopolímero como subproducto representa una interesante alternativa debido a su fácil procesamiento, bajo costo, contribución al medio ambiente y una opción favorable en la conservación poscosecha de este tipo de frutas perecederas como la mora de castilla y además convirtiéndola en un producto con un valor agregado de carácter funcional por la presencia de microorganismos probióticos que pueden impactar de manera positiva en la salud del consumidor.

Recomendaciones

Se recomienda aplicar esta metodología a otros tipos de frutas tan perecederas como la mora de castilla, para proporcionar un tiempo de vida útil más prolongado en almacenamiento refrigerado ente 4 y 8°C equivalente a los parámetros comerciales.

Para próximos estudios se sugiere medir propiedades como la solubilidad del material por efecto del vapor de agua, pérdida de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) y el aumento de la permeabilidad al oxígeno según la presión atmosférica del sistema como un factor extrínseco.

Finalmente, se podría experimentar un componente más en la biopelícula como un agente antimicrobiano que a su vez pueda potenciar el sabor de la fruta, dando características sensoriales más agradables para el consumidor.

Referencias Bibliográficas

- Acosta- Delgado, A.P.; Blanco-Santander, C. (2013). Almidones nativos colombianos. Obtención y caracterización de almidones nativos colombianos para su evaluación como posibles alternativas en la industria alimentaria. Universidad De Cartagena Facultad De Ingeniería Programa De Ingeniería De Alimentos Cartagena De Indias D.T Y C.
- Aguilar, M.A. (2005). Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate, 69pp., Tesis (en opción al Título de Maestro en Tecnología Avanzada), Instituto Politécnico Nacional, México.
- Alavi S. (2013). Starch research over the years. Food research international.36(4):307-8
- Badui Dergal S, 2006. Química de los alimentos, (4ta edición); Pearson Education.
- Barajas, L. A. (2012). <http://www.udi.edu.co/>. Recuperado de http://www.udi.edu.co/congreso/historial/congreso_2012/ponencias/comunicacion/BIOPOLIMEROS_Una_alternativa_para_el_desarrollo_de_empaques_agroindustriales.pdf
- De León-Zapata, M. A., Sáenz-Galindo, A., Rojas-Molina, R., Rodríguez-Herrera, R., Jasso-Cantú, D., and Aguilar, C. N. (2015). Edible candelilla wax coating with fermented extract of tarbush improves the shelf life and quality of apples. Food packaging and shelf life 3, 70-75.
- Departamento Nacional de Planeación-DNP- (2020). Colombianos botan 9,76 millones de toneladas de comida al año (28 de Marzo de 2016 10:00 am). Recuperado de: <https://www.dnp.gov.co/Paginas/Colombianos-botan-9,76-millones-de-toneladas-de-comida-al-a%C3%B1o.aspx>

- Enríquez C, M; Velasco M, R; Ortiz G, V. (2012). Composition and processing of starch-based biodegradable films. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 10 No. 1 (182 - 192) Enero - junio 2012.
- Eric, D. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers", *Food Technology*, ISSN: 0015-6639, 23(6): 13.
- Falguera, V.; Quintero, P.; Jiménez, A.; Muñoz, J.A.; Ibarz, A. (2011) "Edible films and coatings: Structures, active function and trends in their use", *Trends in Food Science & Technology*, DOI-doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004., 22(10): 7.
- Fernández -Valdés, D; Bautista Baños, S; Ocampo R, A. García P, A; Falcón Rodríguez, A (2015). Eatable films and coverings: a favorable alternative in the postharvest. conservation of fruits and vegetables. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, ISSN - 1010-2760, Diseases, 46 (2), S58-S6. RNPS-0111, Vol. 24, No. 3 (julio-agosto-septiembre, pp. 52-57).
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization-FAO- (2001). Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba.
- Fritzen-Freire, C.B., Prudencio, E.S., Amboni, R D.M.C., Pinto, S.S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics.*Food Research International*, 45(1): 306-312.
- García, J., Pérez, A., Acosta, H. A., & Castillo, H. S. V. (2006). Reología de masas de maíz reforzadas con manitol y cmc. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 4(1), 51-57.

- Gómez, J. M. R. (2008). “*Lactococcus lactis*” productores de pediocina pa-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Hallauer, A. (1994). Specialty corns. Department of Agronomy, Iowa State University, Ames, Iowa.
- Iqbal, M. Z., Qadir, M. I., Hussain, T., Janbaz, K. H., Khan, Y. H. y Ahmad, B. (2014). “Review: probiotics and their beneficial effects against various diseases”. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27 (2), 405-415.
- Jiménez-Pranteda, M.L., (2010). Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: Evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Tesis doctoral. Facultad de farmacia, Departamento de microbiología. Universidad de Granada- España. DL: GR 791-2011
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. Y Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*. 222(3-4):229-235.
- Kester, J., and Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*.
- Krochta, J.; Mulder-Johnston, C. (1997). “Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities”, *Food Technology*, ISSN: 0015-6639, 51: 61-74.
- Lamberti M, Geiselman A, Conde-Petit B, Escher F. (2004). Starch transformation and structure development in production and reconstitution of potato flakes. *LWT-Food Science and Technology*. 37(4):417-27.

- Lisi, M. S. (2012). Caracterización de almidones de maíz: nativo y modificados (Doctoral dissertation, Universidad Católica de Córdoba).
- L. Bello, S. Contreras, R. Romero, J. Solorza, A. Jiménez. (2002). Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. Macho), *Agrociencia*, 36(2), 169-180.
- Mahajan, P. V., Caleb, O., Singh, Z., Watkins, C., and Geyer, M. (2014). Postharvest treatments of fresh produce. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 372, 20130309.
- Miller, K., and Krochta, J. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology* 8, 228-237.
- Montes-Hernández, A.I., Oropeza G, R.A., Padrón P, C.A., Araya Q, Y., Wexler G, L., Cubero C, E. (2017). Películas biodegradables con propiedades bioactivas. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 8 (1): 057-089.
- Pineda-Gómez, P., Coral, D. F., Arciniegas, M. L., Rorales-Rivera, A., & Rodríguez García, M. E. (2010). Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. *Ingeniería y ciencia*, 6(11), 129-141.
- Rached L, de Vizcarrondo C, Rincón A. (2006). Evaluación de harinas y almidones de mapuey (*Dioscorea trifida*), variedades blanco y morado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*; 56 (4): 375-383.
- Reina, C., Rincón Silva, M. D. C., & Rubiano Erazo, D. (1998). Manejo poscosecha y evaluación de la calidad de la mora de Castilla *Rubus glaucus*.

- Ribeiro, C.; Vicente, A.; Teixeira, J.; Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence, *Postharvest Biology and Technology*, doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.11.015, 44: 7.
- Rodríguez-Barona, S., Montes, L.M., Ramírez, D de J. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersion en presencia de prebiótico. *Revista VITAE*, 19(Supl 1): S186-188.
- Schröder, A., & Südekum, K. H. (1999). Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. *International rapeseed congress*, Gosford: Regional Institute, 122-241
- Sinko, P.J (2006). *Martin's Physical pharmacy and pharmaceutical sciences*, Lippincott, Williams and Wilkinson, Baltimore.
- Saavedra, N., y Algecira, N. A. (2010). Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas. *Nova*, 8(14), 171-182. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.448>
- Sanders, M. E. (2008). "Probiotics: definition, sources, selection, and uses". *Clinical Infectious*.
- Singh Sodhi N, Singh S. (2005). Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars, *Journal of Food Engineering*; 70: 117–127.
- Software R Core Team (2022). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Tester RF, Karkalas J, Qi X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 2004; 39(2):151-65.