



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



“Efecto de un recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad microbiológica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)”

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Viviana Elizabeth Paredes Pantoja
Tutora: Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

Ambato - Ecuador
Abril 2017

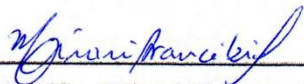
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph. D. Mirari Yosune Arancibia Soria

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 8 de febrero del 2017



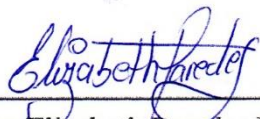
Ing. MSc. Mirari Yosune Arancibia Soria Ph.D.

C.I. 1802142461

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Viviana Elizabeth Paredes Pantoja, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



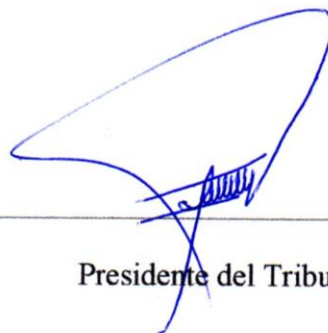
Viviana Elizabeth Paredes Pantoja

C.I. 180437396-5

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Para constancia firman:

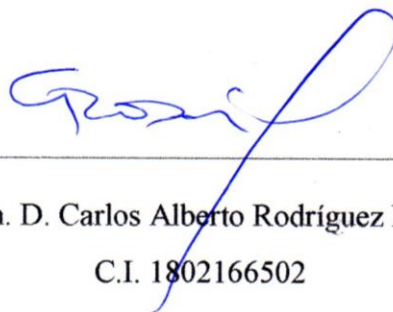


Presidente del Tribunal



Ph. D. Milton Ruben Ramos Moya

C.I. 1801119635



Ph. D. Carlos Alberto Rodríguez Meza

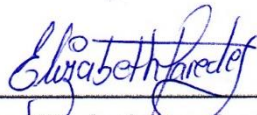
C.I. 1802166502

Ambato, 15 de marzo de 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.



Viviana Elizabeth Paredes Pantoja

C.I. 180437396-5

AUTORA

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me permitieron realizar mis estudios.

A todos los docentes que formaron parte de mi educación académica.

A Mirari Arancibia porque ha sido una guía, una maestra y un apoyo incondicional durante la realización de mi proyecto de investigación. Siempre me sentiré orgullosa por haber trabajado con usted.

A Sandra Horvitz, por sus valiosas enseñanzas tanto para el proyecto como para la vida, le agradezco haber compartido con usted.

A Milton Ramos por sus consejos y motivación, por su hermosa energía que llena los días de sus alumnos, inspirándoles a soñar alto.

A Juan de Dios Alvarado, gracias a usted descubrí la pasión por mi carrera.

A mis queridos compañeros, que se formaron junto a mí e hicieron que cada día sea único y divertido. Siempre los llevaré en mi corazón.

DEDICATORIA

Cada paso, cada victoria, cada satisfacción por haber cumplido mis metas han sido inspirados por los seres que me dieron la vida, estos años que me he formado académicamente y como persona han sido posibles solo por ustedes, mis padres.

A mi hermano Andrés, a Vanessa, a Soledad y a mis pequeños Alessandro, Isabella y Oriana quienes han llenado de amor y sonrisas cada día de mi vida.

A mis abuelitas Piedad y Bachita (+) y a Martita por su cariño incondicional, sus consejos y abrazos.

A mis queridas amigas Vanessa, Pamela, Anita, Yolita y a Angelito que son como soles en días nublados, gracias por el amor, la esperanza y por creer en mí.

A mi sugar baby, mi Romeo y mi Pochita, que solo saben dar amor.

Por su amor y enseñanzas diarias, por sus esfuerzos, por su motivación y sus palabras tan importantes, sin ustedes no sería posible ser quien hoy soy, por eso les dedico este trabajo que me llena de orgullo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
EL PROBLEMA	3
TEMA	3
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
CAPITULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	6
HIPÓTESIS	14
HIPÓTESIS NULA (H ₀):	14
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H _a):	14

SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS	15
VARIABLE INDEPENDIENTE	15
VARIABLE DEPENDIENTE.....	15
CAPITULO III	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS	16
<i>Primera parte:</i>	16
Selección de la concentración mínima inhibitoria de ϵ -polilisina.....	16
<i>Segunda parte:</i>	17
Aplicación del recubrimiento en mora de castilla y análisis	17
Cosecha y selección de la materia prima.....	17
Preparación del recubrimiento.....	17
Aplicación del recubrimiento	18
Envasado y almacenamiento	18
Análisis microbiológico.....	18
Recuento de mohos y levaduras	19
Recuento de bacterias aerobias mesófilas y bacterias aerobias psicrótrofas	19
Determinación de la tasa respiratoria	19
Análisis Sensorial	20
Procesamiento y análisis estadístico.....	20
CAPITULO IV	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Análisis microbiológico.....	23
Tasas respiratorias	27
Análisis sensorial.....	29
VERIFICACIÓN DE LAS HIPÓTESIS	33
CAPITULO V	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34

CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES	35
CAPITULO VI.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO

Figura 1. Categorías de los biopolímeros.....	8
Figura 2. Estructura química de la lisina y ϵ -polilisina (n = 23 a 33 residuos).....	10
Figura 3. Producción de ϵ -polilisina mediante el metabolismo microbiano de <i>S. albus</i>	11
Figura 4. Diferentes estados de madurez de la mora de castilla.....	17
Figura 5. Diagrama del proceso del recubrimiento, envasado y almacenamiento de moras.	18
Figura 6. Prueba in vitro: para la determinación de la concentración inhibitoria mínima. Discos de película de gelatina con diferentes concentraciones de ϵ -polilisina (A = 70, B = 150, C = 300 y D = 700 $\mu\text{g/ml}$, con réplica).....	21
Figura 7. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (G ϵ PL) a 300 $\mu\text{g/ml}$ y el control (sin recubrimiento) en el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en moras almacenadas a $\sim 6^\circ\text{C}$ durante 8 días.....	23
Figura 8. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (G ϵ PL) a 300 $\mu\text{g/ml}$ y el control (sin recubrimiento) en el crecimiento de bacterias aerobias psicrótrofas en moras almacenadas a 6°C durante 8 días.....	25
Figura 9. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (G ϵ PL) a 300 $\mu\text{g/ml}$ y el control (sin recubrimiento) en el crecimiento de mohos y levaduras en moras almacenadas a 6°C durante 8 días.....	26
Figura 10. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (300 $\mu\text{g/ml}$) y el control en las tasas de respiración (producción de CO_2) en moras almacenadas a 6°C durante 8 días.....	28
Figura 11. Intensidad de los atributos sensoriales de la mora control (sin recubrimiento), mora con recubrimiento de gelatina y mora con recubrimiento de gelatina + ϵ -polilisina (300 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados representan el promedio de 14 catadores y las barras de error representan el intervalo de confianza (95 %) de la media. Para cada atributo, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).	29

Figura 12. Color y brillo de las moras con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina (300 $\mu\text{g/ml}$) (izquierda) y del control sin tratamiento aplicado (derecha) al día 1 del almacenamiento refrigerado.....	30
Figura 13. Color y brillo de las moras con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina (300 $\mu\text{g/ml}$) (izquierda) y del control (derecha), al día 7 del almacenamiento refrigerado.....	31
Figura 14. Moras con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina.....	44
Figura 15. Inmersión de moras en la solución de recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina y secado.....	45
Figura 16. Evaluación sensorial de las muestras de moras.	46
Intensidad de cualidades y prueba triangular.....	46
Figura 17. Medición de concentración de gases.....	47

RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es un cultivo andino con propiedades nutricionales y antioxidantes, cuya ingesta potencia el sistema inmunológico y reduce el riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas y cardiovasculares. Sin embargo, la textura suave que presentan sus drupas y el mal manejo post cosecha, la vuelven susceptible al ataque microbiano y rápido deterioro, que constituye un problema para la agroindustria.

En el presente trabajo se desarrolló un recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina para evaluar su efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y tasas de respiración de la mora durante el almacenamiento refrigerado. El recubrimiento de gelatina con una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de ϵ -polilisina disminuyó los recuentos de bacterias aerobias mesófilas en 0,46 log ufc/g, mohos y levaduras en 1,82 log ufc/g y permitió reducir la producción de CO_2 durante la respiración. Además, mejoró la textura, el color y la aceptabilidad en general de la fruta durante la evaluación sensorial. La ϵ -polilisina puede ser utilizada, como agente antimicrobiano, en recubrimientos comestibles para frutas e incrementar su vida útil, en el caso de la mora de castilla hasta 8 días.

PALABRAS CLAVES: mora de castilla, manejo post cosecha, agentes antimicrobianos.

ABSTRACT

The blackberry (*Rubus glaucus* Benth) is an Andean crop with nutritional and antioxidant properties, which reduces the risk of developing degenerative and cardiovascular diseases and boosts the immune system. The poor postharvest management and the soft texture of the drupes, make it susceptible to microbial attack and fast deterioration, which represent a problem for agribusiness.

In the present work, an edible coating made with gelatin and ϵ -polylysine was developed to evaluate its effect on the respiration rates, microbiological and sensory quality of blackberry during refrigerated storage. The gelatin coating with a concentration of 300 $\mu\text{g/ml}$ of ϵ -polylysine decreased counts of mesophilic aerobic bacteria at 0,46 log cfu/g, molds and yeasts at 1,82 log cfu/g and allowed to reduce CO_2 production during respiration. In addition, it improved the texture, color and overall acceptance of the fruit during sensory evaluation. ϵ -polylysine can be used as an antimicrobial agent in edible fruit coatings and increase their shelf life, in blackberry for up to 8 days.

KEY WORDS: blackberry, post harvest, antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

La mora es una planta nativa del norte de los Andes Suramericanos y otras zonas tropicales. Pertenece al género *Rubus*, de la familia de las Rosáceas (*Rosaceae*) y de la especie *Rubus glaucus* Benth (Méndez, 2008). En Ecuador, las zona óptimas para la producción de mora se encuentran en los valles del Callejón Interandino, principalmente en las provincias de Pichincha y Tungurahua. La provincia con mayor producción es Tungurahua, que aporta con el 41% de la producción nacional de fruta, con un rendimiento de 4,75 TM/ha y 22,34 TM de exportaciones (MAGAP, 2014).

La cosecha es una de las partes más delicadas del cultivo de mora, no solo por la maduración no uniforme de las frutas y la presencia de espinas en la planta, sino por las inadecuadas prácticas de manejo postcosecha. La alta succulencia del tejido, incrementa el grado perezoso y los cambios en las características físicas, que definen los estándares comerciales y la apariencia externa, son los principales factores de rechazo del producto en el mercado (Méndez, 2008).

El desarrollo de tecnologías postcosecha, mediante la aplicación de recubrimientos comestibles con base en polímeros y antimicrobianos naturales permite proteger al alimento y a la vez fortalecer la textura, mantener la apariencia general y controlar las pérdidas de peso durante el periodo de conservación y almacenamiento (Méndez, 2008). La aplicación de estas técnicas puede mejorar la calidad comercial del producto fresco y extender su vida útil (Dayron Sora, Fischer, & Flórez, 2006).

Los recubrimientos son biopolímeros que se aplican en la superficie de la fruta como una delgada capa polimérica, transparente y uniforme, cuyo objetivo es prolongar el tiempo de vida de la fruta durante el almacenamiento (Arnon Hadar, 2015). Algunos de los materiales poliméricos utilizados como recubrimiento, no son efectivos frente al ataque por microorganismos y se hace necesario incluir antimicrobianos, para que en conjunto protejan al fruto de la actividad microbiana y de los factores externos.

La ϵ -polilisina, un antimicrobiano natural ha sido efectivo frente a bacterias patógenas, mohos y levaduras, es por ello que es usada como conservante de alimentos, especialmente de productos cárnicos y lácteos (Anuj Chheda, 2014). Es biodegradable, comestible y no

tóxico, compatible con algunos polímeros e ideal para su aplicación como ingrediente en la formulación de recubrimientos para alimentos. Sin embargo, poco se conoce sobre su aplicación en frutas.

El objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto de un recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad microbiológica, sensorial y en las tasas de respiración de moras de castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante el almacenamiento refrigerado.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

TEMA

Efecto de un recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad microbiológica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)

JUSTIFICACIÓN

La mora de castilla es un cultivo andino altamente perecedero por su estructura frágil y alta susceptibilidad al daño mecánico, además de la inadecuada manipulación postcosecha. El rápido deterioro en la fruta dificulta su comercialización y genera pérdidas económicas al agricultor (Freire Salazar, 2012). En Tungurahua, provincia que genera alrededor del 41% de la producción total de la fruta, las pérdidas post cosecha ascienden a 200 Tm, lo que representa 62 hectáreas de terreno de siembra perdidas (INEC, 2000).

En la última década, la industria procesadora y de envasado de alimentos aúnan esfuerzos para extender la vida útil de productos frescos como la mora. En este sentido queda mucho por hacer ya que las pérdidas postcosecha son cuantiosas. Una forma de paliar este problema es la aplicación de envases o recubrimientos con base a polímeros biodegradables que no solo ofrezcan buenas características organolépticas, de manejo, y que mejoren la conservación, sino que además permitan la incorporación de compuestos bioactivos sin comprometer al alimento.

La adición de compuestos con actividad biológica a los recubrimientos los convierte en un tipo de envasado activo; si el compuesto es antimicrobiano, se consigue controlar la proliferación de microorganismos durante el transporte y almacenamiento de las frutas (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, & Ibarz, 2011). La ϵ -polilisina, agente antimicrobiano formado por unidades del aminoácido lisina, puede ser usada como alternativa natural a los conservantes artificiales. Si bien ha sido ampliamente utilizada como aditivo para el control microbiológico en alimentos como carne y pescado (Zhang et al., 2015), arroz para sushi y

leche condensada (Pandey & Kumar, 2014), poco se ha documentado sobre su aplicación como ingrediente en un recubrimiento para frutas. Con base en lo anterior, la presente investigación pretende evaluar el efecto de un recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina sobre la calidad microbiológica de la mora de castilla durante su almacenamiento refrigerado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de un recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad microbiológica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración inhibitoria mínima de ϵ -polilisina frente a *Escherichia coli*.
- Determinar el efecto del recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad microbiológica de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante almacenamiento refrigerado.
- Determinar el efecto del recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad sensorial de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una baya dura formada por pequeñas drupas de color rojo a negro brillante y de sabor agridulce (INEN, 2010). Posee antocianos y carotenoides además de un alto contenido en vitamina C por lo que se la considera como antioxidante (Bernal-Roa, Melo, & Díaz-Moreno, 2011). La ingesta de esta fruta potencia el sistema inmunológico y reduce el riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Stoner, Wang, & Casto, 2008). Además, es apreciada por la agroindustria y el mercado de productos frescos debido a cualidades sensoriales como: acidez, jugosidad, sabor y propiedades biológicas (Garzón, Riedl, & Schwartz, 2009).

Las características morfológicas de la mora y las malas condiciones pre y post cosecha, (riego, manipulación, transporte, envasado), provocan pérdidas de peso, cambios de color, disminución del contenido de compuestos bioactivos, ablandamiento y pudrición (Bernal, Melo, & Díaz Moreno, 2014). Si bien, el uso de temperaturas bajas durante el almacenamiento (entre -0,5 a 0 °C con más del 90 % de humedad relativa), permite reducir el porcentaje de respiración de la mora; un almacenamiento prolongado puede producir pérdida de agua y, si las frutas están heridas, se vuelven más susceptibles al deterioro microbiano, causado principalmente por hongos como: *Penicillium*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Rhizopus stolonifer* y bacterias como *Erwinia*, *Pseudomonas* (Castillo et al., 2010), además de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes*, microorganismos ubicuos, capaces de encontrarse de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación (Kenneth Gross, 2016).

La creciente demanda por alimentos frescos, de calidad y de vida útil extendida, ha fomentado la investigación y el desarrollo de recubrimientos comestibles (Tharanathan, 2003). Los recubrimientos son finas capas de un material comestible capaz de ser aplicados a frutas y vegetales frescos como parte de un tratamiento postcosecha o como método de protección ya que previenen la deshidratación y el deterioro, además pueden mejorar la apariencia ofreciendo un brillo atractivo (CPM, 2014). La combinación del recubrimiento con la temperatura de almacenamiento adecuada, es capaz de prolongar la

vida útil postosecha de las frutas y mantener su calidad sensorial y nutricional (Almenar, Samsudin, Auras, & Harte, 2010).

Se ha documentado que los recubrimientos comestibles pueden controlar la transferencia de masa, humedad y difusión de gases (O_2 , CO_2), pérdida de sabor y olor, y mantener las características reológicas, mecánicas y organolépticas de los alimentos por más tiempo (Lacroix & Vu, 2014), además de reducir la actividad metabólica (Conforti & Zinck, 2002). El mecanismo de acción es a través de la producción de una atmósfera modificada que reduce la disponibilidad de O_2 e incrementa la concentración de CO_2 (De Jesús Avena-Bustillos, Krochta, Saltveit, de Jesús Rojas-Villegas, & Saucedo-Pérez, 1994).

Entre las características que un recubrimiento debe cumplir se encuentran 1) ser imperceptible o mejorar la calidad sensorial, propiedades mecánicas y de barrera a los gases; 2) estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiológica; 3) ausencia de materiales tóxicos y uso de materiales seguros para el consumo humano; 4) tecnología de fabricación simple; 5) sin características contaminantes; 6) disponibilidad y bajo costo de la materia prima y del proceso de elaboración (Fakhouri et al., 2013).

Los recubrimientos pueden ser aplicados en forma líquida por inmersión o rociado, o como películas (Falguera et al., 2011). El material estructural, puede estar conformado por polímeros naturales como proteínas (gelatina, gluten, colágeno, suero de leche), lípidos (cera, ácidos grasos), polisacáridos (alginato, almidón, celulosa, quitosano) o una mezcla de ellos (A. Gennadios, Hanna, & Kurth, 1997), o biopolímeros sintéticos como ácido poliláctico (APL), alcohol de polivinilo (PVA), ácido poliglicólico (APG), etc., (Othman, 2014) (Fig. 1). Estos materiales tienen importante aplicación industrial, especialmente para el desarrollo de envases, ya que son económicos, producidos por fuentes renovables, biodegradables y su uso en aplicaciones a gran escala puede contribuir a una economía sustentable (Martucci & Ruseckaite, 2010).

En el desarrollo de recubrimientos, las proteínas son una alternativa interesante por sus excelentes propiedades de barrera al intercambio de gases (O_2 , CO_2) y lípidos entre el alimento y la atmósfera, evitan la migración del sabor de los alimentos particularmente a bajas humedades relativas (Fakhouri et al., 2013), y por sus propiedades mecánicas (Kester & Fennema, 1986). En este sentido, la gelatina, producto resultante de la hidrólisis del colágeno por vía ácida o alcalina de los huesos, piel, tendones y cartílagos (Martucci & Ruseckaite, 2010), ha sido utilizada exitosamente como agente gelificante en

alimentos, encapsulación de medicamentos, productos cosméticos y farmacéuticos; además en el desarrollo de envases biodegradables (Rivero, García, & Pinotti, 2010).

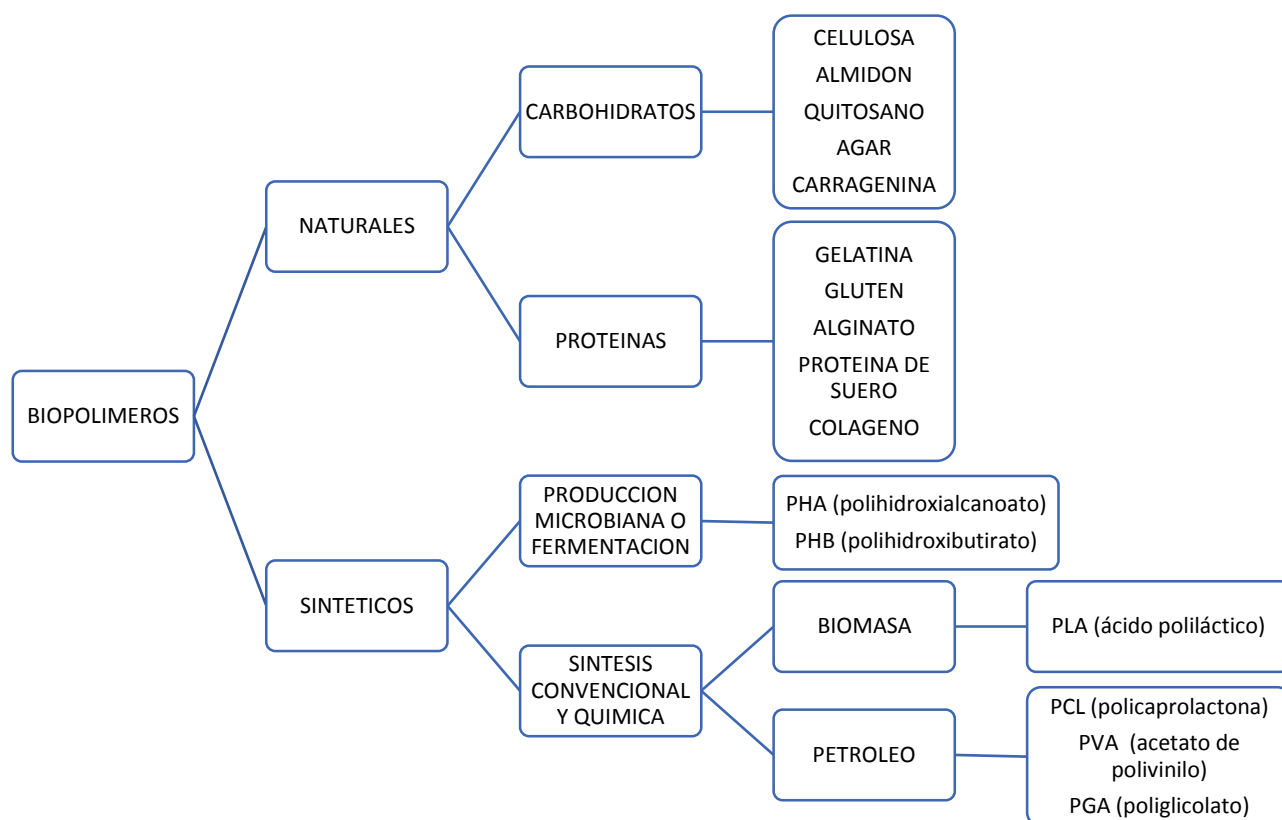


Figura 1. Categorías de los biopolímeros (Othman, 2014).

Los recubrimientos de gelatina son capaces de formar geles termoreversibles después del calentamiento, disolución y enfriamiento, debido a las combinaciones iónicas entre los grupos amino y carboxilo de sus aminoácidos, mediante puentes de hidrógeno (Fakhouri et al., 2013). Es decir, se forma una red tridimensional con zonas de uniones microcristalinas intermoleculares que finalmente dan lugar a películas brillantes, transparentes, flexibles, y fuertes (Cao, Yang, & Fu, 2009). Las propiedades fisicoquímicas de este tipo de película o recubrimiento, son influenciadas por las propiedades estructurales y físicas de la gelatina que a su vez son consecuencia del peso molecular, la distribución y la composición de los aminoácidos (Lacroix & Vu, 2014).

Las películas de gelatina son capaces de reducir la migración de la humedad, el oxígeno y los aceites, además son buenas barreras a los gases; sin embargo, son débiles barreras

al agua, debido a su naturaleza hidrofílica, y son susceptibles al quiebre debido a la fuerte energía cohesiva del polímero (Rivero et al., 2010); por esta razón se adiciona a la película agentes plastificantes los cuales son sustancias no volátiles con alto punto de fusión que cuando son adicionados a un material, mejoran sus propiedades físicas y/o mecánicas (A Gennadios, McHughc, & Weller, 1994). Entre los más usados se encuentra el glicerol, que actúa a nivel de los puentes de hidrógeno reduciendo las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas del polímero, mejorando su flexibilidad, fuerza y resistencia (McHugh & Krochta, 1994).

En un estudio realizado para evaluar el efecto de un recubrimiento de gelatina y quitosano en la calidad post cosecha de pimientos rojos lograron aumentar el tiempo de conservación en refrigeración de 2 a 3 semanas, mejorando además, la estructura de la fruta y disminuyendo la pérdida de agua (Poverenov et al., 2014). (Ramírez Q, Aristizábal T, & Restrepo F, 2013) estudiaron el uso de gel de sábila como recubrimiento para aumentar el tiempo de conservación de mora, mejorando el contenido de sólidos solubles totales, acidez y pH. Adicionalmente observaron que se redujo la pérdida de firmeza y peso, la permeabilidad a gases y vapor de agua.

Algunos recubrimientos pueden provocar cambios en las cualidades bioquímicas de los productos frescos; a pesar de ello, en un estudio realizado por (Poverenov et al., 2014) el recubrimiento de gelatina-quitosano aplicado en pimientos no afectó sus parámetros bioquímicos como: contenido de ácido ascórbico, fenoles y antioxidantes, ni los sólidos totales presentes en las frutas (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, & Montero, 2011).

Las ventajas y ciertas desventajas que presentan los recubrimientos, muestran la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías de envasado de alimentos, siendo así los recubrimientos antimicrobianos los más prometedores sistemas activos de envasado (Zhang et al., 2015).

Los recubrimientos comestibles pueden ser formulados con compuestos activos, como antioxidantes y antimicrobianos, para favorecer el efecto inhibitorio frente al ataque de microorganismos causantes del deterioro (A. Gennadios et al., 1997), para mejorar la estabilidad de productos alimenticios sensibles a la oxidación y a la acción microbiana (Joaquín Gómez-Estaca, López-de-Dicastillo, Hernández-Muñoz, Catalá, & Gavara, 2014). Estos tipos de recubrimientos son capaces de transportar y liberar los compuestos

activos en la superficie del alimento, en donde comúnmente ocurre el deterioro por acción microbiana (Chen, Wang, & Weng, 2010).

Muchas clases de compuestos antimicrobianos tienen potencial capacidad de aplicación en los recubrimientos, como: ácidos orgánicos, ácidos grasos, polipéptidos, aceites esenciales, extractos de plantas, nitritos y sulfitos (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009); sin embargo, el reemplazo de antimicrobianos sintetizados químicamente por sustancias antimicrobianas naturales son un factor importante en la aceptabilidad de un producto en el mercado internacional, debido a la estricta regulación en el uso de químicos en los alimentos (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Sobrino-López, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2007). La ϵ -polilisina es un antimicrobiano de origen natural formado por monómeros del aminoácido esencial lisina, está unido por enlaces péptidicos entre los grupos α -carboxilo y ϵ -amino de las moléculas de lisina (fig. 2) (Shukla, Singh, Pandey, & Mishra, 2012).

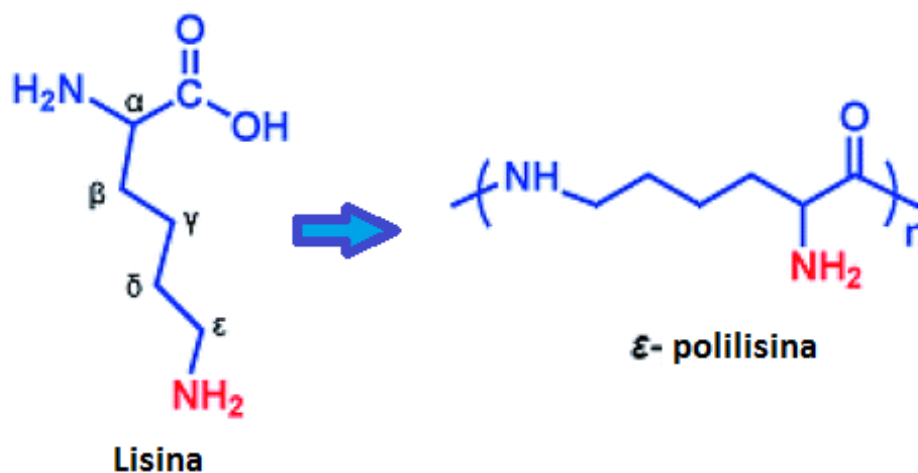


Figura 2. Estructura química de la lisina y ϵ -polilisina ($n = 23$ a 33 residuos) (Pandey & Kumar, 2014).

La ϵ -polilisina es producida por fermentación a través de la ruta metabólica de la bacteria *Streptomyces albulus* (Fig. 3), que además es un microorganismo no patógeno ni toxigénico (Chang, McLandsborough, & McClements, 2014a). La ϵ -polilisina ha sido utilizada en la industria de alimentos como biomaterial, en medicina, farmacéutica y electrónica, con diferentes y variadas aplicaciones como agente emulsificante, agente

dietario, transportador de medicamentos, agente antimicrobiano en recubrimientos e hidrogeles, biorremediador, etc., (Pandey & Kumar, 2014) Posee actividad antimicrobiana, no es tóxica, es soluble en agua, tiene buena estabilidad térmica (hasta 100 °C por 30 minutos o autoclavado a 121 °C por 20 minutos); y es estable en condiciones ácidas o alcalinas (Pandey, 2014) (Shukla et al., 2012).

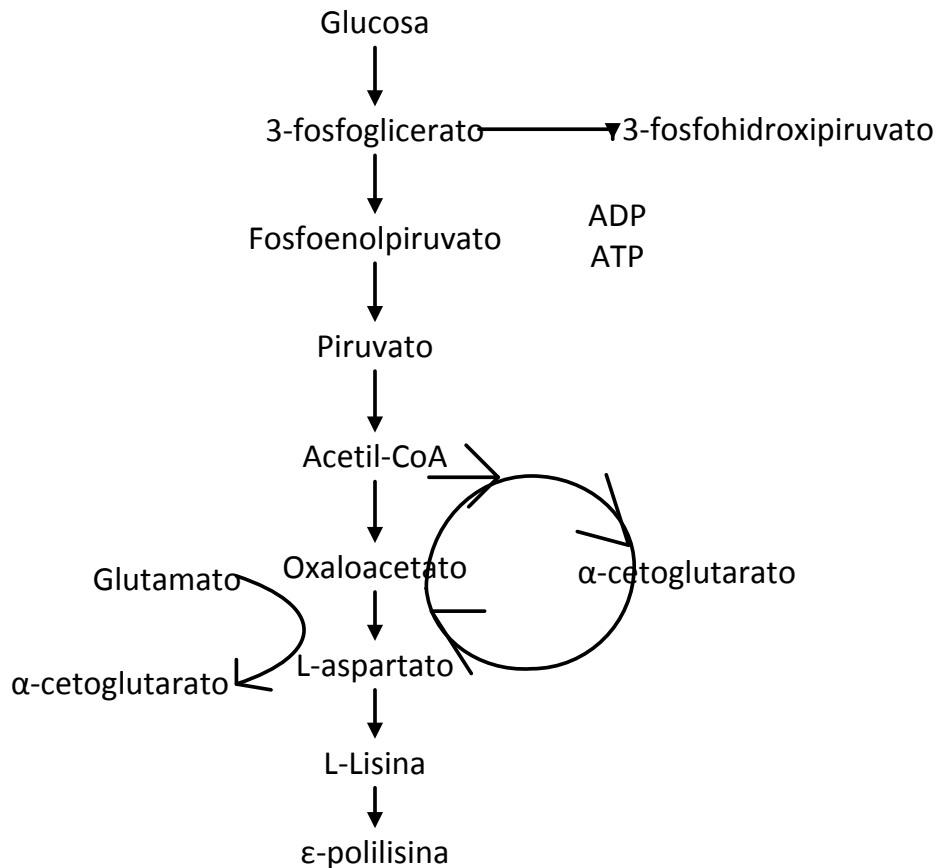


Figura 3. Producción de ϵ -polilisina mediante el metabolismo microbiano de *S. albus* (Xu et al., 2015).

En los últimos años el interés por este polímero ha aumentado debido a su gran potencial en la prevención del deterioro causado por el crecimiento de microorganismos (Yoshida & Nagasawa, 2003) además que ha sido reconocido como una sustancia generalmente segura (GRAS No. 000135) a niveles superiores de 50 mg/kg con capacidad de ser aplicada directamente sobre los alimentos (FDA, 2003).

La ϵ -polilisisina es completamente digerida en el cuerpo humano en lisinas sin ningún efecto secundario. Pruebas de toxicidad crónica y carcinogenicidad mostraron que el consumo diario de 6500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en una dieta de una persona es segura (Hiraki et al., 2003).

El tamaño molecular de la ϵ -polilisisina es un factor importante para su actividad antimicrobiana. Moléculas con más de nueve residuos de L-lisinas muestran potencial actividad para inhibir el crecimiento de los microorganismos, mientras que moléculas con ocho residuos de L-lisina muestran una actividad antimicrobiana menor (Shima, Matsuoka, Iwamoto, & Sakai, 1984).

La presencia de grupos aminos cargados positivamente a lo largo de la cadena de la ϵ -polilisisina la hace fuertemente catiónica a valores de $\text{pH} < 9$, que además corresponde a su punto isoeléctrico ($\text{pI} \approx 9$) (Yoshida & Nagasawa, 2003). Por debajo de este pH se requiere una baja concentración de ϵ -polilisisina para tener actividad antimicrobiana, mientras que sobre este valor, se requiere mayor concentración para tener el mismo efecto (Pandey & Kumar, 2014).

En un estudio realizado por (Chang et al., 2014a) y (Yoshida & Nagasawa, 2003), se propuso que el mecanismo de acción antimicrobiano de la ϵ -polilisisina, el cual es a través de su fijación electrostática a la superficie aniónica del microorganismo, provocando la separación de la membrana externa y la alteración del citoplasma consiguiendo así que la célula muera. Posee capacidad antimicrobiana de amplio espectro capaz de actuar frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*), mohos y levaduras.

Según (Chang et al., 2014a) la actividad antimicrobiana de la ϵ -polilisisina es mayor frente a bacterias que a mohos y levaduras. (Shima et al., 1984) observaron que la ϵ -polilisisina inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas en bajas concentraciones, aproximadamente de 1-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que la mayoría de hongos y levaduras requirieron concentraciones de alrededor de 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La aplicación de la ϵ -polilisisina en alimentos y bebidas es limitada por su potencial interacción con varios componentes complejos presentes en la matriz de estos productos. Al ser un elemento catiónico interactúa fuertemente con moléculas aniónicas, provocando importantes efectos, como la formación de precipitados indeseables, aumento de la turbidez en la solución y/o sedimentos; además de que la actividad antimicrobiana puede reducirse debido a la interacción electrostática, la cual es capaz de cambiar la habilidad

de acercamiento o aproximación de la ϵ -polilisina a la membrana celular bacteriana como consecuencia de la pérdida de su carga catiónica (Chang et al., 2014a). Desde su aprobación como aditivo seguro, su uso como aditivo en alimentos ha aumentado; así, en Japón se la utiliza para la conservación de carne y pescado para sushi (1-5 mg/g), arroz y vegetales cocidos (0,01 – 0,5 mg/g) (Zhang et al., 2015), en arroz para sushi (5-50 ppm) y en leche condensada (Pandey & Kumar, 2014).

Con base en lo anterior, es necesario conocer la estructura de la ϵ -polilisina y su interacción con otros elementos para el desarrollo de empaques bioactivos y elaborar un recubrimiento que cumpla con todos los requerimientos necesarios para proteger el alimento y satisfacer las necesidades del consumidor. Si bien, los usos de la ϵ -polilisina se han limitado a carnes y algunos cereales, su aplicación en frutas ha sido apenas documentados en la literatura y no existe información al respecto. Este hecho abre las posibilidades a esta investigación.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA (H₀):

El recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina no tiene efecto significativo en la calidad microbiológica de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_a):

El recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina tiene efecto significativo en la calidad microbiológica de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

VARIABLE INDEPENDIENTE

El recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina.

VARIABLE DEPENDIENTE

La calidad microbiológica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Primera parte:

Selección de la concentración mínima inhibitoria de ϵ -polilisisina

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de ϵ -polilisisina se realizó mediante el método de difusión en disco en placa de agar frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 (Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca, & Montero, 2012). Se prepararon tres soluciones filmogénicas a partir de gelatina al 4% (p/v) y glicerol al 1% (p/v) con distintas concentraciones de ϵ -polilisisina: 0 (control), 75, 150, 300 y 700 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Aproximadamente 25 ml de cada solución filmogénica se colocó en una placa de plexiglas y se secaron en estufa a 60 °C durante 24 horas. Una vez obtenidas las películas se acondicionaron y se procedió a cortar discos de 5 mm de diámetro, los cuales fueron asépticamente ubicados en cajas Petri con agar BHI (Brain Heart Infusion), en el cual previamente se inoculó en superficie con 0,1 ml de *Escherichia coli* (ATCC 25922), a una concentración de 10^6 . Las zonas de inhibición fueron medidas después de 24 horas de incubación a 37 °C mediante comparación de sus diámetros de inhibición.

La cepa de *Escherichia coli* fue obtenida de la colección de cepas del laboratorio de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y la ϵ -polilisisina fue adquirida de Zhejiang Silver-Elephant Bio-Engineering Co., Ltd.; de peso molecular 4130~5776 Da.

Segunda parte:

Aplicación del recubrimiento en mora de castilla y análisis

Cosecha y selección de la materia prima

La cosecha de la mora de castilla se realizó en un terreno del Sector Huachi Grande, la fruta se encontraba en un estado de madurez tipo 4 (Fig. 4), según la clasificación de la madurez de la norma INEN 2427 (INEN, 2010). La muestra fue homogenizada de acuerdo a su color externo y a la ausencia de daños físicos, con un tamaño mediano promedio de 25 – 18 mm de diámetro y 25 – 20 mm de longitud.



Figura 4. Diferentes estados de madurez de la mora de castilla (INEN, 2010).

Preparación del recubrimiento

El recubrimiento comestible se elaboró de acuerdo con el método desarrollado por (Shen, Wu, Chen, & Zhao, 2010) con algunas modificaciones, la gelatina tipo B (Mallinckrodt Baker, Inc. EE.UU.), a una concentración de 4% (p/v) fue disuelta en agua a 70 °C, con agitación constante a 200 rpm. Una vez obtenida una solución homogénea, se redujo la temperatura hasta 45 °C con ayuda de un baño termostático y se añadió el plastificante glicerol (Invitrogen, EE.UU.) al 1% (p/v). La disolución se homogenizó por 20 minutos. Para el recubrimiento con ϵ -polilisina (G ϵ PL), éste se elaboró como se describe líneas arriba pero al final se añadió el antimicrobiano a la concentración seleccionada en el apartado anterior y se homogeneizó por 20 minutos más (Fig. 5).

Aplicación del recubrimiento

Cada recubrimiento se aplicó mediante inmersión de la fruta, durante 5 minutos, en la solución obtenida. A continuación, las moras fueron llevadas a un secador provisto de circulación de aire a 21 °C, donde permanecieron durante 30 minutos (Fig. 5).

Envasado y almacenamiento

Las moras se colocaron en envases de polietileno perforado para permitir la circulación de gases y se almacenaron en refrigeración a 5 °C durante 8 días (Fig. 5).

Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se pesaron asépticamente 10 g de moras refrigeradas (con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina y control sin recubrimiento) que se colocaron en una bolsa con 90 ml de agua peptonada y se homogenizó (Stomacher, Suiza), durante 2 minutos. Se tomó 1 ml de esta disolución y se colocó en un tubo con 9 ml de agua peptonada estéril (dilución = 10^{-2}), se homogenizó en un vórtex y se repitió la toma del 1 ml hasta la dilución 10^{-4} . Todos los análisis microbiológicos se realizaron cada dos días y los recuentos con ayuda de un cuentacolonias.

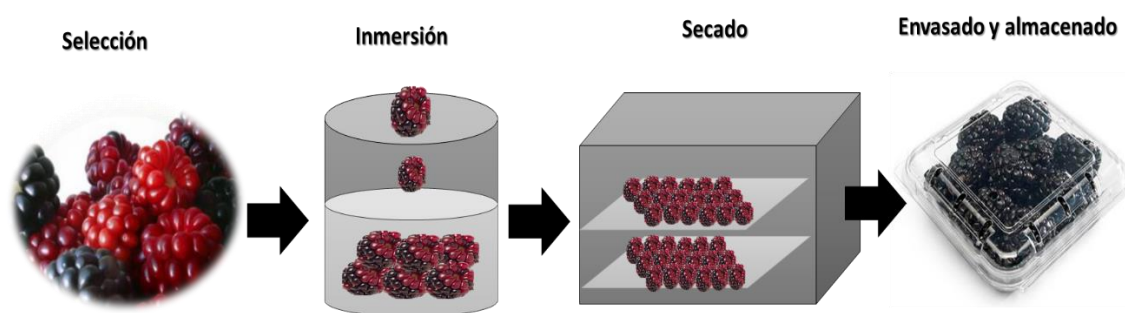


Figura 5. Diagrama del proceso del recubrimiento, envasado y almacenamiento de moras.

Recuento de mohos y levaduras

Se realizó de acuerdo a la metodología de la norma INEN 1529-10 (INEN, 1998), con algunas variaciones. Para esto se tomó 0,1 ml de las diluciones previamente realizadas y se sembró en superficie en placas Petri con agar sabouraud y cloranfenicol, se incubó a 25 °C durante 5 días.

Recuento de bacterias aerobias mesófilas y bacterias aerobias psicrótrofas

Se realizó de acuerdo a la metodología de la norma INEN 1529-5 (INEN, 2006). Para ello se empleó siembra en profundidad con 1 ml de las diluciones previamente realizadas con vertido de agar PCA. La incubación para el caso de bacterias aerobias mesófilas se realizó a 25 °C durante 72 h y para las psicrótrofas se realizó a 6 °C durante 8 días.

Determinación de la tasa respiratoria

El porcentaje de respiración fue medido de acuerdo al método descrito por (Maqbool, Ali, Alderson, Zahid, & Siddiqui, 2011). Se realizaron mediciones del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono de una muestra de moras contenidas en jarras herméticas de vidrio provistas de un septum para la toma de gases del espacio de cabeza. Las jarras fueron mantenidas en una cámara refrigerada con temperatura controlada a 5 °C. El análisis de la composición gaseosa de la atmósfera en el interior de las jarras se realizó cada 10 horas mediante un analizador de gases de espacio de cabeza (MAPY 4.0, Witt Gasetecnik, Witten, Alemania). A partir de la composición gaseosa observada, se efectuaron los cálculos correspondientes para determinar las tasas respiratorias ($\text{mg O}_2/\text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Análisis sensorial

Se aplicó una prueba triangular (Watts, Ylimaki, Jeffery, & Elías, 1992) entre una muestra de moras con recubrimiento y ϵ -polilisina y moras con recubrimiento sin ϵ -polilisina. Los recubrimientos se prepararon como se describió anteriormente pero para efectos de la evaluación sensorial se preparó un recubrimiento de gelatina sin la incorporación de ϵ -polilisina. El panel estuvo compuesto por 10 panelistas semi-entrenados para determinar la presencia de ϵ -polilisina. Además se aplicó una prueba de intensidad de cualidades, en la cual se evaluaron atributos como la apariencia, aroma, sabor, presencia de residuos en el sabor, textura y aceptabilidad general, realizada por 14 panelistas semi-entrenados, para determinar cualitativamente los atributos de la muestra de moras con recubrimiento y ϵ -polilisina, frente a una muestra de moras con recubrimiento sin ϵ -polilisina, además de un control.

Procesamiento y análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada uno de los análisis realizados, fueron analizados por el software SPSS. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto entre las variables, y en los casos que existieron diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del ensayo preliminar para la selección de la concentración de ϵ -polilisina se observó que a concentraciones de 70 $\mu\text{g/ml}$ y 150 $\mu\text{g/ml}$, no se presenta actividad antimicrobiana mientras que a 300 $\mu\text{g/ml}$ y 700 $\mu\text{g/ml}$, si se observaron halos de inhibición (Fig. 6) frente a *Escherichia coli*. En la Tabla 1, se presentan los diámetros (cm) de las zonas de inhibición tanto a 300 como 700 $\mu\text{g/ml}$, que fue mayor conforme aumenta la concentración de ϵ -polilisina en el recubrimiento.

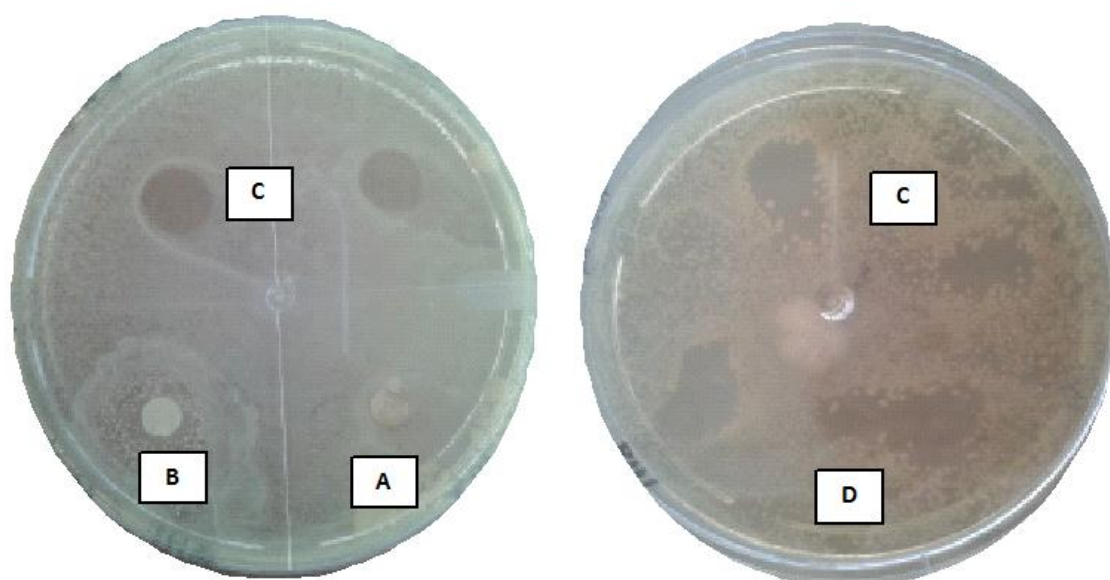


Figura 6. Prueba in vitro: para la determinación de la concentración inhibitoria mínima. Discos de película de gelatina con diferentes concentraciones de ϵ -polilisina (A = 70, B = 150, C = 300 y D = 700 $\mu\text{g/ml}$, con réplica).

(Zhang et al., 2015) documentaron el uso de 2 g/l de ϵ -polilisina (2000 $\mu\text{g/ml}$) como concentración mínima inhibitoria necesaria para evitar el crecimiento de *E. coli*, mediante la inmersión del antimicrobiano en discos de papel filtro; mientras que cuando usaron una película de almidón con ϵ -polilisina, fue necesario aumentar la concentración del antimicrobiano hasta 2 g por 100 g de almidón. La interacción entre los grupos hidroxilo del almidón y los grupos amino de la ϵ -polilisina obstaculizaron la difusión del

antimicrobiano en la película, como consecuencia la actividad antimicrobiana de la película ϵ -polilisina/almidón disminuyó.

Tabla 1. Diámetro de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, al utilizar ϵ -polilisina a diferentes concentraciones.

Concentración ϵ -polilisina ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio largo (cm)	Promedio ancho (cm)
0	-	-
70	-	-
150	-	-
300	$1,4 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,3$
700	$2,0 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,07$

En otro experimento se determinó que la concentración inhibitoria mínima de ϵ -polilisina frente a *E. coli* fue de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (Li, Han, Feng, Tian, & Mo, 2014). La ϵ -polilisina es capaz de interactuar con varios componentes que conforman la matriz en donde se encuentra presente, lo que reduce su potencial antimicrobiano, porque cambia su habilidad de aproximarse e interactuar con la membrana de las células bacterianas (Chang et al., 2014a). En un estudio realizado por el mismo Li (2014), sobre la eficacia del complejo constituido por goma arábica/ ϵ -polilisina (GA/ ϵ PL) en jugo de manzana, se observó que a medida que se aumentaba la concentración de goma arábica, la actividad antimicrobiana de la ϵ -polilisina disminuía, debido a la reducción de las cargas positivas presentes en la ϵ -polilisina; sin embargo, el complejo GA/ ϵ PL tuvo apreciable efecto antifúngico.

De los resultados, es posible que la ϵ -polilisina a bajas concentraciones haya interactuado con la gelatina presente en el recubrimiento lo que limitaría su actividad. Resultados similares fueron obtenidos al trabajar con una película de gelatina y quitosano (Chiono et al., 2008), la incorporación de ϵ -polilisina dio lugar a la formación de complejos polielectrolitos a través de interacciones electrostáticas entre los grupos amonio del quitosano y los grupos carboxilato cargados negativamente en la gelatina (Yin, Li, Sun, & Yao, 2005); por lo tanto se produjo una reacción entre la gelatina y ϵ -polilisina que limitaría la actividad antimicrobiana.

(Zahi, El Hattab, Liang, & Yuan, 2017) reportaron que la concentración de ϵ -polilisina que presentó mayor actividad frente a diferentes grupos de bacterias es menor a 100 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo por los resultados obtenidos se seleccionó la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de ϵ -polilisina para la aplicación en el recubrimiento en moras.

Análisis microbiológico

En la Figura 7, se observa que el recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$, logró la disminución del crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en la muestra de moras, en comparación con la muestra control. Los recuentos de la muestra G ϵ PL (2,15 y 2,18 log ufc/g respectivamente) y el control (2,32 y 2,49 log ufc/g respectivamente), en los días 1 y 3, fueron similares ($p < 0,05$). No obstante, según el análisis de datos ANOVA en los días 6 y 8 los recuentos aumentaron y tuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$), pero, el recuento en G ϵ PL (2,65 log ufc/g) siempre fue menor que el control (3,11 log ufc/g).

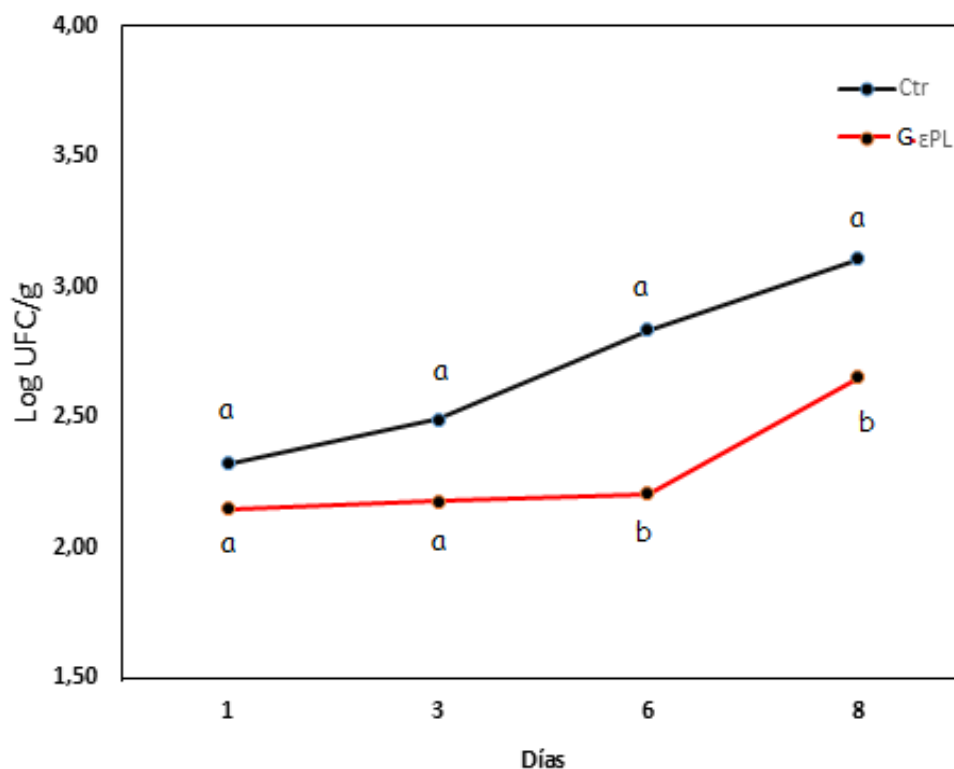


Figura 7. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (G ϵ PL) a 300 $\mu\text{g/ml}$ y el control (sin recubrimiento) en el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en moras almacenadas a $\sim 6^\circ\text{C}$ durante 8 días.

La ϵ -polilisina a la concentración ensayada y en el recubrimiento, fue efectiva frente a bacterias aerobias mesófilas. Este resultado fue similar a los obtenidos en ensayos realizados por (Zhang et al., 2015) quienes utilizaron un recubrimiento con ϵ -polilisina a diferentes concentraciones: 0, 2, 4 y 6 g/L frente a *Escherichia coli*. Si bien, al día 8 de almacenamiento fue evidente un incremento en los recuentos, este hecho podría estar relacionado con la carga catiónica de la ϵ -polilisina y la posibilidad de una interacción con las zonas aniónicas presentes en la gelatina (Yin et al., 2005). Según (J. Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010) la gelatina por sí sola no tiene efecto antimicrobiano.

Las moras frescas son propensas a la contaminación bacteriana, proveniente del campo, durante el riego, la manipulación en la cosecha, el transporte, la comercialización y con el consumidor, los cuales pueden ser posibles microorganismos patógenos; es por ello que es necesario el uso de antimicrobianos que disminuyan y/o los eliminen; si bien no existen estudios de la aplicación de ϵ -polilisina en frutas, algunos autores han determinado la concentración inhibitoria mínima necesaria de ϵ -polilisina frente a bacterias aerobias mesófilas; tales como: *Listeria monocytogenes* (15 $\mu\text{g/ml}$), *Serratia marcescens* (16 $\mu\text{g/ml}$) (Zhou et al., 2011), *Bacillus subtilis* (25 $\mu\text{g/ml}$), *Escherichia coli* (50 $\mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus aureus* (25 $\mu\text{g/ml}$) (Zahi et al., 2017).

Asimismo, el efecto antimicrobiano de la ϵ -polilisina fue evaluado en diferentes matrices como: en carne de pollo, inhibió completamente el crecimiento de *S. Typhimurium*, con una población sobreviviente de 8 log ufc/g en el control (Jung, Min, & Yoon, 2009). Extractos de alimentos como leche, carne de res, bolonia (mezcla de carne de res y cerdo junto con grasa), arroz cocido, vegetales (50:50 brócoli y coliflor) fueron usados como sustratos para la evaluación del crecimiento de *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* en presencia de ϵ -polilisina, en todos los casos fue evidente el aumento en los recuentos 6,3 a 7,9 log ufc/g hasta el final del almacenamiento. En el arroz se obtuvo reducciones de 0.4 a 1.5 log ufc/g en los 3 patógenos, mientras que en los vegetales la ϵ -polilisina hizo que *E. coli* y *S. Typhimurium* se redujeran 1.3 y 1.2 log ufc/g, respectivamente; mientras que en la leche, carne y bologna los recuentos llegaron a niveles indetectables durante el almacenamiento (Geornaras, Yoon, Belk, Smith, & Sofos, 2007).

En un estudio del recuento total de bacterias en carne de cerdo el uso de ϵ -polilisina produjo una reducción de 2,93 log ufc/g (Li, Feng, et al., 2014). Asimismo, en carne de

res se evaluó el crecimiento de microorganismos como *pseudomonas* y bacterias ácido lácticas que en presencia de ϵ -polilisina no se produjo su crecimiento (Zinoviadou, Koutsoumanis, & Biliaderis, 2010). En envoltorios de embutidos se evaluó la concentración de *E. coli* después de haber sido tratadas con una una solución de lavado que contenía ϵ -polilisina, después de 18 días los recuentos se mantuvieron como al inicio (4 log ufc/g) mientras que en el control los recuentos aumentaron (6,5 log ufc/g) (Zhu et al., 2010).

Todos estos ensayos sobre la actividad antimicrobiana de la ϵ -polilisina muestran su eficiencia en el control de bacterias patógenas, lo cual es comparable con los resultados obtenidos, ya que se consiguió reducir los recuentos en moras tras la aplicación del recubrimiento con ϵ -polilisina, en comparación con la muestra control.

En la Figura 8 se observa el crecimiento de microorganismos aerobios psicrótrofos en ambos tratamientos, control y recubrimiento + ϵ -polilisina. Los resultados muestran que aunque para cada día existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), la ϵ -polilisina no fue efectiva frente a microorganismos psicrótrofos. Este hecho puede estar relacionado con la capacidad de las bacterias psicrótrofas para sintetizar una cápsula de exopolisacáridos en condiciones de estrés, que protege al microorganismo de fagocitosis y anticuerpos, aumentando su resistencia y patogenicidad (Meyer et al., 2002).

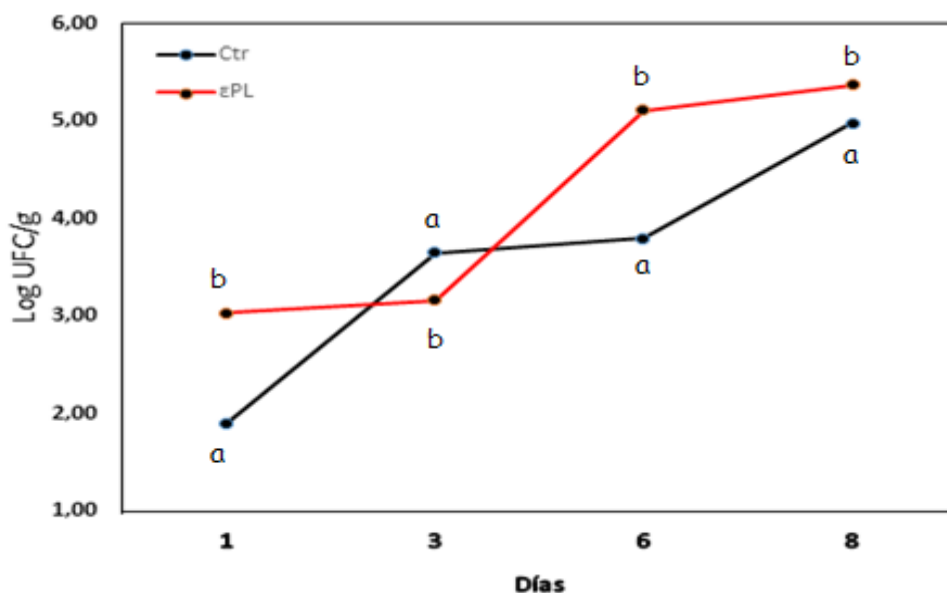


Figura 8. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (G ϵ PL) a 300 μ g/ml y el control (sin recubrimiento) en el crecimiento de bacterias aerobias psicrótrofas en moras almacenadas a 6 °C durante 8 días.

Las moras contienen altos niveles de azúcar y otros nutrientes además de una actividad de agua ideal para el crecimiento microbiano. Su pH bajo las hace particularmente susceptibles a la contaminación fúngica, ya que una gran parte de las bacterias es eliminada por efectos del pH ácido.

Respecto al desarrollo de mohos y levaduras (Fig. 9), al inicio del ensayo tanto el control (4,19 log ufc/g) como la muestra GεPL presentaron recuentos bajos (3,88 log ufc/g). El día 3 mostraron un comportamiento similar ($p < 0,05$), sin embargo a partir de este punto y pese al desarrollo de microorganismos, el recubrimiento con ε-polilisina fue más efectivo al momento de reducir los recuentos microbianos, al día 6 y 8 del ensayo, los recuentos finales de la muestra GεPL fueron menores (5,19 y 5,32 log ufc/g) en comparación con la muestra control (7,26 y 7,14 log ufc/g). En la muestra control el crecimiento mohos y levaduras se produjo rápidamente y se propagó en todas las muestras contenidas en la caja, este hecho provocó la pudrición de las moras en conjunto con la pérdida de líquido y desprendimiento de un aroma característico de la fermentación. Según (Tournas & Katsoudas, 2005) los hongos más comunes que se encuentran en moras son: *Botrytis cinerea*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus stolonifer*.

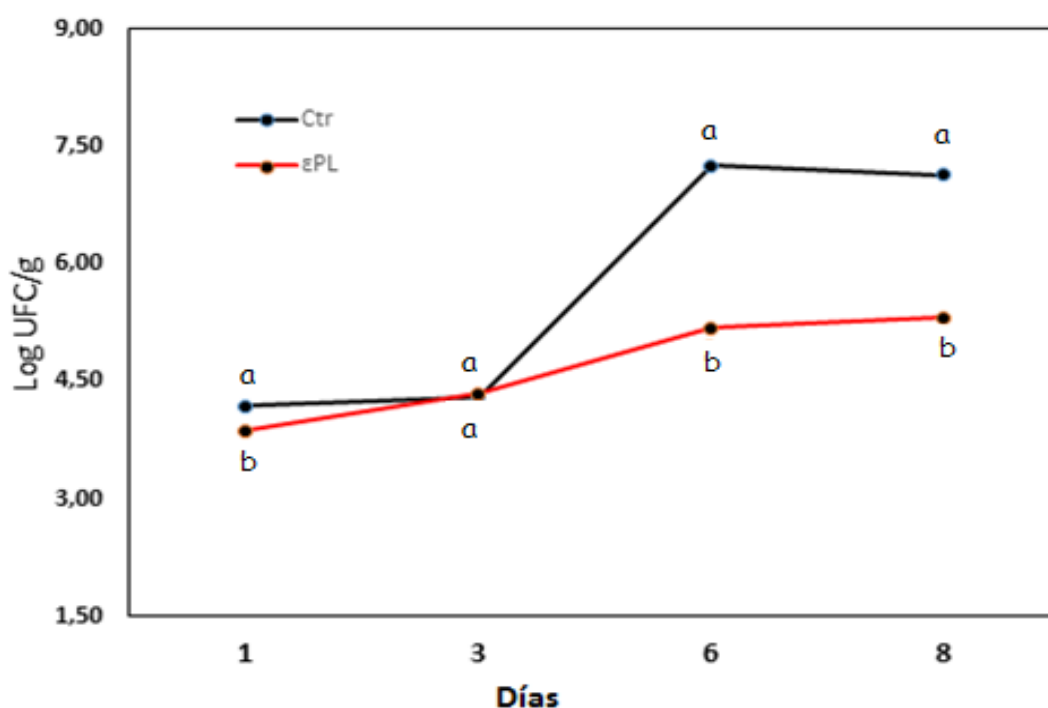


Figura 9. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ε-polilisina (GεPL) a 300 µg/ml y el control (sin recubrimiento) en el crecimiento de mohos y levaduras en moras almacenadas a 6 °C durante 8 días

Según (Chang, McLandsborough, & McClements, 2014b) la actividad antimicrobiana de la ϵ -polilisisina frente a mohos y levaduras se ha atribuido a su capacidad para interactuar y quebrantar las membranas celulares aniónicas, formadas de quitina debido a i) la competencia entre el biopolímero aniónico y la superficie aniónica de las células de las levaduras, existe actividad antifúngica ya que al menos algunas moléculas catiónicas de la ϵ -polilisisina fueron liberadas del complejo biopolímero/ ϵ -polilisisina; o ii) aunque el complejo biopolímero/ ϵ -polilisisina, en conjunto era negativo, algunas partes cargadas positivamente, podrían atraer a la superficie de las células de levadura cargadas negativamente (Muzzarelli et al., 2012).

La disminución de las ufc/g de mohos y levaduras es un resultado importante debido a que a este grupo pertenecen algunos patógenos y mohos responsables de la pudrición de las frutas que son difíciles de eliminar; sin embargo no existen datos de actividad antimicrobiana de ϵ -polilisisina frente a mohos y levaduras presentes en frutas; a pesar de ello es posible comparar su desarrollo con el de otros microorganismos similares. En un estudio en bebidas de frutas, la adición de ϵ -polilisisina a un jugo de manzana permitió la reducción de levaduras *Zygosaccharomyces bailii* (12,5 μ g/ml de ϵ -PL) y *Saccharomyces cerevisiae* (1,6 μ g/ml de ϵ -PL), desde 10^4 ufc/g. Z (Chang et al., 2014a).

En otro estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de la ϵ -polilisisina en una película aplicada en hogazas de pan; la ϵ -polilisisina presentó actividad fungistática frente a *Penicillium expansum* (productor de patulina) y fungicida frente a *Fusarium verticillioides* (productor de fumonisinas) y *Aspergillus parasiticus* (productor de aflatoxinas); todos ellos mohos capaces de disminuir la calidad del pan. La reducción de la carga microbiana fue entre 54% a 99% y la reducción del contenido de aflatoxinas fue de 93% al 99% (Luz et al., 2016).

Tasas respiratorias

En la Figura 10 se presenta la tasa de respiración de las moras (contenido de CO_2) de dos muestras, control y G ϵ PL. En todos los casos las moras tuvieron una misma tendencia en el desarrollo del proceso de respiración durante el tiempo de almacenamiento (8 días), sin embargo existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los resultados, siendo así que las tasas de respiración del control fueron más altas que la de la muestra G ϵ PL. Resultados

similares fueron obtenidos por (Dayron Sora et al., 2006) ya que los tratamientos que mostraron las mayores tasas respiratorias fueron los testigos sin película plástica ni atmósfera modificada.

La diferencia entre las tasas respiratorias podría estar asociada a que el recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina forma una atmósfera modificada en la superficie de las moras con composición diferente al aire ambiental; consiguiendo con esto que las tasas de respiración disminuyan; así, la muestra control en el día 1 produjo una concentración de CO₂ de 20,25 mg/Kg.h y la muestra G ϵ PL 15,71 mg/Kg.h; mientras que al final de la experimentación hubo una producción de 22,81 mg/Kg.h en la muestra control y 20,43 mg/Kg.h en la muestra G ϵ PL. La alta concentración de CO₂ disminuye el proceso de maduración de las moras, probablemente porque el CO₂ actúa como un inhibidor competitivo del etileno (Dayron Sora et al., 2006).

Los días 1, 2 y 3 exhibieron una disminución en la producción de CO₂, esto puede deberse a la baja temperatura de almacenamiento utilizada (6 °C) lo que permite minimizar la actividad metabólica del fruto e inhibir la podredumbre provocada por hongos (Dayron Sora et al., 2006). Contrariamente, al día 6 y 8 del ensayo se produjo un aumento en la producción de CO₂; que puede estar relacionado con el aumento de las ufc/g de mohos y levaduras en las moras (Fig. 10).

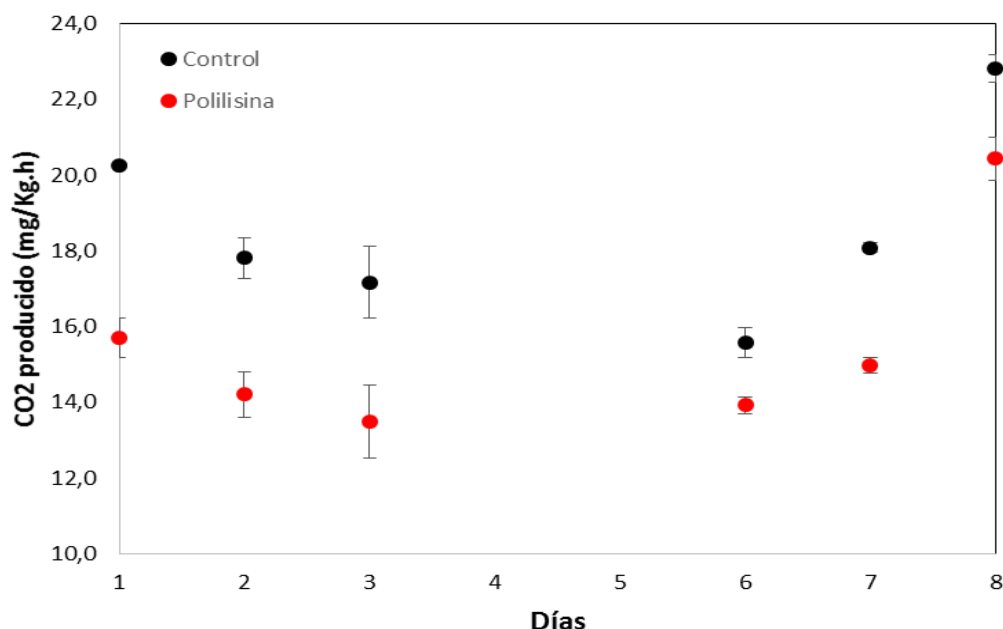


Figura 10. Efecto del recubrimiento comestible de gelatina con ϵ -polilisina (300 μ g/ml) y el control en las tasas de respiración (producción de CO₂) en moras almacenadas a 6 °C durante 8 días.

Análisis sensorial

La Figura 11 muestra los promedios de las seis cualidades evaluadas por 14 catadores semi-entrenados. En general, se estableció como límite de aceptabilidad el valor de 5 para todas las cualidades. El color, textura y aceptabilidad del control se matuvieron por debajo de este límite, en contraste a las cualidades de la mora con gelatina y mora con gelatina y ϵ -polilisina, que mantuvieron sus promedios por encima del límite, esto evidencia que tanto la gelatina como la ϵ -polilisina pueden ser utilizados como recubrimiento en alimentos, específicamente en frutas, sin que se alteren sus propiedades sensoriales, y en algunos casos incluso mejorándolos, como sucedió con la textura en una fruta tan percible como la mora. Respecto al color, existieron diferencias significativas entre los tratamientos (con recubrimiento y el control), la mora con recubrimiento sin ϵ -polilisina y la mora con recubrimiento con ϵ -polilisina fueron evaluados como más brillantes; mientras que el color de la mora sin recubrimiento (control) fue calificado como opaco.

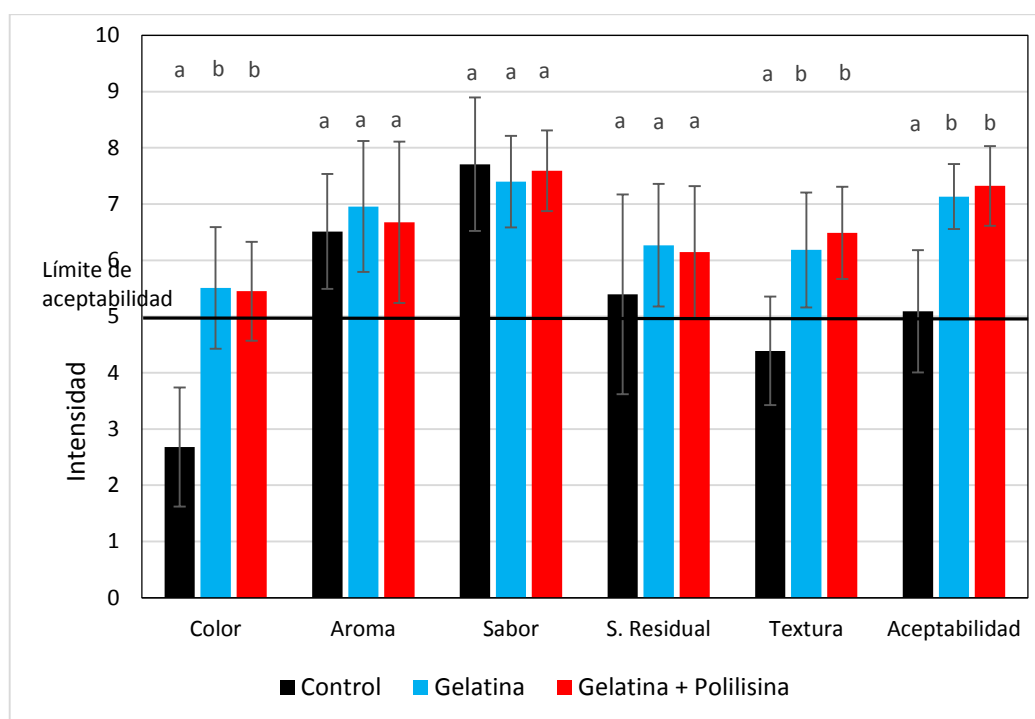


Figura 11. Intensidad de los atributos sensoriales de la mora control (sin recubrimiento), mora con recubrimiento de gelatina y mora con recubrimiento de gelatina + ϵ -polilisina (300 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados representan el promedio de 14 catadores y las barras de error representan el intervalo de confianza (95 %) de la media. Para cada atributo, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

La mejor evaluación se obtuvo en la mora con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina, que fue considerada como la más brillante. Después de siete días de almacenamiento se observó que la muestra control había cambiado su color de rojo a negro, esto debido a que la fruta ha empezado el proceso de senescencia; además, el brillo propio de la fruta ha disminuido considerablemente en comparación con el día 1. La muestra de moras con el recubrimiento de gelatina con ϵ -polilisina, después de los 7 días de almacenamiento, mantuvo el color característico de la madurez inicial tipo 4 y el brillo (Fig 12).



Figura 12. Color y brillo de las moras con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina (300 μ g/ml) (izquierda) y del control sin tratamiento aplicado (derecha) al día 1 del almacenamiento refrigerado.

El color es un criterio de calidad que el consumidor considera cuando desea elegir un producto para su consumo; además es una cualidad importante cuando se determina la eficacia de un tratamiento postcosecha en frutas (McGuire, 1992). Los recubrimientos son importantes debido a que mejoran el aspecto visual de la fruta. La gelatina utilizada como recubrimiento formó una matriz de apariencia brillante que rodeó a la mora, lo que, mejoró las propiedades sensoriales del alimento (Cerqueira, Souza, Teixeira, & Vicente, 2012) aumentando su brillo (Lee, Dangaran, & Krochta, 2002). (Arnon, Granit, Porat, & Poverenov, 2015) observaron que al utilizar un recubrimiento de CMC (6% p/v). en mandarinas, éstas mejoraron su brillo.

En el parámetro olor, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. La mora con recubrimiento de gelatina tuvo mayor calificación promedio (6,96)

que la mora con gelatina y ϵ -polilisina (6,67) y el control (6,51); lo mismo ocurrió con el parámetro sabor, que se mantuvo similar en los dos tratamientos con recubrimiento y el control. A la vista de los resultados, la ϵ -polilisina no afecta las cualidades sensoriales ya que los catadores no percibieron diferencias. La similitud entre los promedios de la evaluación sensorial de los tratamientos de gelatina y ϵ -polilisina y gelatina sin ϵ -polilisina, indica que las diferencias con el control se deben a la presencia de gelatina en ambos, mas no a la ϵ -polilisina. La ϵ -polilisina tiene un sabor ligeramente amargo (Pandey & Kumar, 2014); que al parecer es enmascarado por la acidez de la mora. Según (Chang et al., 2014b) la percepción del amargor de la ϵ -polilisina está relacionado con la unión a polímeros aniónicos (mucina) presentes en la boca.



Figura 13. Color y brillo de las moras con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina (300 $\mu\text{g/ml}$) (izquierda) y del control (derecha), al día 7 del almacenamiento refrigerado.

La textura presentó diferencias en la intensidad, el control fue evaluado como más suave que el resto de tratamientos los cuales tuvieron promedios similares, sin embargo el tratamiento con ϵ -polilisina presentó mayor firmeza. Resultados similares fueron obtenidos por (Poverenov et al., 2014) al recubrir pimientos rojos con gelatina, la textura se mantuvo más firme durante el ensayo, en comparación con los pimientos que no fueron recubiertos, los cuales presentaron mayor degradación en su textura. Estos resultados se

pueden explicar debido a que los recubrimientos comestibles, como el de gelatina, son capaces de reducir la migración de la humedad (Lacroix & Vu, 2014). Los recubrimientos, además de reducir el efecto del daño en las paredes de las células, mantienen la textura de la fruta por más tiempo. Resultados similares fueron obtenidos por (Poverenov et al., 2014) quienes recubrieron pimientos rojos con gelatina y al final del almacenamiento estos tuvieron menor pérdida de firmeza en comparación con los pimientos que no fueron recubiertos. Asimismo, un recubrimiento de gelatina-quitosano mejoró la textura de los pimientos durante la experimentación.

Respecto a la aceptabilidad general, se percibieron diferencias significativas, los promedios de los tratamientos de mora con gelatina y mora con gelatina y ϵ -polilisina fueron mejor calificados en comparación con el control. Para los catadores, la mora con gelatina y ϵ -polilisina fue la que mayor aceptabilidad tuvo.

De la prueba triangular, utilizando una tabla binomial (Tabla 2, Anexo 2) con 10 catadores y 1 respuesta correcta, el nivel de significancia fue de 0,83. Es decir, no fue significativo. Los resultados indican que la ϵ -polilisina no fue identificada en el resto de muestras por lo tanto su presencia no alteró el sabor de las moras.

VERIFICACIÓN DE LAS HIPÓTESIS

Mediante el respectivo análisis de datos ANOVA de cada ensayo, considerando un nivel de confianza de 95%, se rechaza la hipótesis nula, concluyéndose que el recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina tiene efecto significativo en la calidad microbiológica de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se determinó el efecto del recubrimiento comestible de gelatina y ϵ -polilisina en la calidad microbiológica de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth); en donde la ϵ -polilisina con su actividad antimicrobina, en general disminuyó el crecimiento microbiano. El recubrimiento fue capaz de proveer protección física e incrementar el tiempo de vida útil post cosecha de la fruta hasta por 8 días.
- El recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina a razón de 300 $\mu\text{g/ml}$, disminuyó el crecimiento microbiano de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras, consiguiendo aumentar el tiempo de vida útil de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en 8 días.
- Al usar la combinación de gelatina con ϵ -polilisina se consiguió el desarrollo de un recubrimiento comestible, el cual tuvo un efecto positivo en la calidad sensorial de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth); así, la gelatina actuó como un mejorador de la textura y color, mientras que el aroma y sabor fueron similares al control, con esto se obtuvo una buena aceptabilidad general de las moras aplicadas el recubrimiento.

RECOMENDACIONES

- * La naturaleza higroscópica de la gelatina podría ser un inconveniente en la elaboración de películas, se recomienda estudiar el uso de agentes entrecruzantes para mejorar las propiedades físicoquímicas de la película.

- * Al utilizar ϵ -polilisina hay que tener en cuenta que ésta puede interactuar con los elementos de la matriz, por lo tanto se recomienda estudiar las posibles interacciones electrostáticas que se puedan generar al preparar soluciones de recubrimiento para frutas.

- * La ϵ -polilisina es un antimicrobiano natural, por esta razón se recomienda realizar más estudios de actividad antimicrobiana en otras frutas, para ampliar el campo de aplicación y establecer parámetros de control, como un límite de ufc/g de microorganismos.

- * Se recomienda establecer los tiempos de secado y el flujo de aire en la ventilación en la aplicación de recubrimientos a frutas.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., & Harte, J. (2010). Consumer acceptance of fresh blueberries in bio-based packages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1121-1128. doi: 10.1002/jsfa.3922
- Arnon, H., Granit, R., Porat, R., & Poverenov, E. (2015). Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: A layer-by-layer approach. *Food Chemistry*, 166, 465-472. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.061>
- Bernal-Roa, L., Melo, L., & Díaz-Moreno, C. (2011). Evaluación del perfil aromático y propiedades antioxidantes durante la maduración de frutos de mora (*Rubus glaucus* benth.)-aromatic profile and antioxidant properties during blackberry (*Rubus glaucus* benth.) Fruit ripening. Paper presented at the II International Conference on Postharvest and Quality Management of Horticultural Products of Interest for Tropical Regions 1016.
- Bernal, L. J., Melo, L. A., & Díaz Moreno, C. (2014). Evaluation of the Antioxidant Properties and Aromatic Profile During Maturation of The Blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and The Bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 67, 7209-7218.
- Cao, N., Yang, X., & Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 729-735. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.017>
- Castillo, S., Navarro, D., Zapata, P. J., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M., & Martínez-Romero, D. (2010). Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 183-188. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.04.006>
- Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 175-184. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.007>
- Conforti, F. D., & Zinck, J. B. (2002). Hydrocolloid-Lipid Coating Affect on Weight Loss, Pectin Content, and Textural Quality of Green Bell Peppers. *Journal of Food Science*, 67(4), 1360-1363. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10289.x
- CPM, C. P. M. (2014). Fresh facts for industry: Protective coatings.
- Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2014a). Antimicrobial delivery systems based on electrostatic complexes of cationic ϵ -polylysine and anionic gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 35, 137-143.
- Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2014b). Interaction of cationic antimicrobial (ϵ -polylysine) with food-grade biopolymers: Dextran, chitosan, carrageenan, alginate, and pectin. *Food research international*, 64, 396-401.
- Chen, C.-P., Wang, B.-J., & Weng, Y.-M. (2010). Physicochemical and antimicrobial properties of edible aloe/gelatin composite films. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(5), 1050-1055. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02235.x
- Chiono, V., Pulieri, E., Vozzi, G., Ciardelli, G., Ahluwalia, A., & Giusti, P. (2008). Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal*

- of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2), 889-898. doi: 10.1007/s10856-007-3212-5
- Dayron Sora, Á., Fischer, G., & Flórez, R. (2006). Almacenamiento refrigerado de frutos de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en empaques con atmósfera modificada. *Agronomía Colombiana*, 24, 306-316.
- De Jesús Avena-Bustillos, R., Krochta, J. M., Saltveit, M. E., de Jesús Rojas-Villegas, R., & Saucedo-Pérez, J. (1994). Optimization of edible coating formulations on zucchini to reduce water loss. *Journal of food engineering*, 21(2), 197-214.
- Fakhouri, F. M., Costa, D., Yamashita, F., Martelli, S. M., Jesus, R. C., Alganer, K., . . . Innocentini-Mei, L. H. (2013). Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, 95(2), 681-689. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.027>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- FDA. (2003). *ε-polylysine notification: GRAS 000135* USA: Retrieved from <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm267372.pdf>.
- Freire Salazar, V. H. (2012). *Alternativas de mejora en el manejo poscosecha y comercialización de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth) proveniente de la provincia de Tungurahua*. Quito, 2012.
- Garzón, G. A., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2009). Determination of Anthocyanins, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity in Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science*, 74(3), C227-C232. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01092.x
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 30(4), 337-350. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1996.0202>
- Gennadios, A., McHugh, T., & Weller, C. (1994). Edible coatings and films based on proteins. IN: Krochta, JM; Baldwin, EA; Nisperos-Carriedo, M. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Pennsylvania, USA: Technomic.
- Geornaras, I., Yoon, Y., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2007). Antimicrobial Activity of ε-Polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in Various Food Extracts. *Journal of Food Science*, 72(8), M330-M334. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00510.x
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.008>
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>

- Hiraki, J., Ichikawa, T., Ninomiya, S.-i., Seki, H., Uohama, K., Seki, H., . . . Barnett Jr, J. W. (2003). Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 328-340. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0273-2300\(03\)00029-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-2300(03)00029-1)
- INEC, M. (2000). SICA.(2000). III Censo Nacional Agropecuario. *Resultados Nacionales y Provinciales. Instituto Nacional y Estadística del Ecuador-INEC, Ministerio de Agricultura y Ganadería-MAG, Servicio de Servicio y Censo Agropecuario-SICA. Quito, Ecuador.*
- INEN, N. T. E. N. (1998). NTE INEN 1529-10: Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad.
- INEN, N. T. E. N. (2006). NTE INEN 1529-5: Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. .
- INEN, N. T. E. N. (2010). NTE INEN 2427: Frutas frescas. Mora. Requisitos.
- Jung, Y., Min, K., & Yoon, K. (2009). Responses of acid-stressed Salmonella Typhimurium in broth and chicken patties to subsequent antimicrobial stress with ϵ -polylysine and combined potassium lactate and sodium diacetate. *Food Microbiology*, 26(5), 467-474.
- Kenneth Gross, C. Y. W., Mikal Saltveit. (2016). The Commercial Storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. *Agriculture Handbook*, 66.
- Kester, J., & Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*.
- Lacroix, M., & Vu, K. D. (2014). Chapter 11 - Edible Coating and Film Materials: Proteins. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in Food Packaging (Second Edition)* (pp. 277-304). San Diego: Academic Press.
- Lee, S. Y., Danganan, K. L., & Krochta, J. M. (2002). Gloss Stability of Whey-Protein/Plasticizer Coating Formulations on Chocolate Surface. *Journal of Food Science*, 67(3), 1121-1125. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09463.x
- Li, Y.-Q., Feng, J.-L., Han, Q., Dai, Z.-Y., Liu, W., & Mo, H.-Z. (2014). Effects of ϵ -Polylysine on Physicochemical Characteristics of Chilled Pork. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2507-2515. doi: 10.1007/s11947-013-1223-4
- Li, Y.-Q., Han, Q., Feng, J.-L., Tian, W.-L., & Mo, H.-Z. (2014). Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Control*, 43, 22-27.
- Luz, C., Calpe, J., Saladino, F., Quiles, J., Ruiz, J., Franzón, M. F., & Meca, G. (2016). Antifungal and antimycotoxigenic activity of polylysine biofilms. *Toxicology Letters*, 258, Supplement, S170. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1638>
- MAGAP, M. d. a., ganadería, acuacultura y pesca. (2014). *Zonificación agroecológica económica del cultivo de mora (rubus glaucus) en el Ecuador a escala 1:250000*. Quito: Retrieved from <http://balcon.magap.gob.ec/mag01/magapaldia/HOMBRO%20A%20HOMBRO/manuales/Manual%20El%20cultivo%20de%20la%20%20mora.pdf>.
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P. G., Zahid, N., & Siddiqui, Y. (2011). Effect of a novel edible composite coating based on gum arabic and chitosan on biochemical and physiological responses of banana fruits during cold storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5474-5482.
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2010). Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. *Journal of food engineering*, 99(3), 377-383. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.023>

- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(4), 841-845.
- Méndez, A. D. G. (2008). Evaluación de un tratamiento postcosecha de la tecnología IV gama en frutos de moras (*Rubus glaucus* Benth). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 9(1), 44-54.
- Meyer, J.-M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., . . . Palleroni, N. J. (2002). Siderophore Typing, a Powerful Tool for the Identification of Fluorescent and Nonfluorescent Pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2745-2753. doi: 10.1128/aem.68.6.2745-2753.2002
- Muzzarelli, R. A. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., & Paoletti, M. G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 995-1012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.063>
- Othman, S. H. (2014). Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 296-303. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.042>
- Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine. *Process Biochemistry*, 49(3), 496-505. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.009>
- Poverenov, E., Zaitsev, Y., Arnon, H., Granit, R., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., . . . Fallik, E. (2014). Effects of a composite chitosan–gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. *Postharvest Biology and Technology*, 96, 106-109. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.05.015>
- Ramírez Q, J. D., Aristizábal T, I. D., & Restrepo F, J. I. (2013). CONSERVACIÓN DE MORA DE CASTILLA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE DE GEL DE MUCÍLAGO DE PENCA DE SÁBILA. *Vitae*, 20, 172-183.
- Ramírez Rosa, U. M., Camacho Alejandro, Reyes Guadalupe, Esquivel Rosalba (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento* (Trillas Ed.). México.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Sobrino-López, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2007). Shelf-life extension of fresh-cut “Fuji” apples at different ripeness stages using natural substances. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2), 265-275.
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 369-375. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.005>
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438-447. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285-290.

- Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T., & Sakai, H. (1984). Antimicrobial action of ϵ -poly-L-lysine. *The Journal of antibiotics*, 37(11), 1449-1455.
- Shukla, S. C., Singh, A., Pandey, A. K., & Mishra, A. (2012). Review on production and medical applications of ϵ -polylysine. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 70-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.001>
- Stoner, G. D., Wang, L.-S., & Casto, B. C. (2008). Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, 29(9), 1665-1674.
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78.
- Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1), 11-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002>
- Watts, B. M., Ylimaki, G., Jeffery, L., & Elías, L. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*: IDRC.
- Xu, Z., Sun, Z., Li, S., Xu, Z., Cao, C., Xu, Z., . . . Xu, H. (2015). Systematic unravelling of the biosynthesis of poly (L-diaminopropionic acid) in *Streptomyces albulus* PD-1. *Scientific reports*, 5.
- Yin, Y., Li, Z., Sun, Y., & Yao, K. (2005). A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of Materials Science*, 40(17), 4649-4652. doi: 10.1007/s10853-005-3929-9
- Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2003). ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(1), 21-26.
- Zahi, M. R., El Hattab, M., Liang, H., & Yuan, Q. (2017). Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of ϵ -polylysine. *Food Chemistry*, 221, 18-23.
- Zhang, L., Li, R., Dong, F., Tian, A., Li, Z., & Dai, Y. (2015). Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with ϵ -poly-l-lysine. *Food Chemistry*, 166, 107-114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.008>
- Zhou, C., Li, P., Qi, X., Sharif, A. R. M., Poon, Y. F., Cao, Y., . . . Chan-Park, M. B. (2011). A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-l-lysine. *Biomaterials*, 32(11), 2704-2712. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.040>
- Zhu, H., Jia, S., Yang, H., Tang, W., Jia, Y., & Tan, Z. (2010). Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with ϵ -polylysine. *Food Science and Biotechnology*, 19(6), 1479-1484. doi: 10.1007/s10068-010-0211-y
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2010). Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 49-59. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.08.003>

ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo de unidades formadores de colonias

El cálculo de las unidades formadoras de colonias se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$UFC/g = \frac{NC * FD}{V_i}$$

Donde:

UFC/g = Unidades formadoras de colonias/gramo

NC = Número de colonias contabilizadas

FD = Factor de dilución

V_i = Volumen inoculado en placa

(Ramírez Rosa, 2015)

ANEXO 2

Tabla 2. Tabla binomial de un extremo para la prueba triangular del análisis sensorial

Probabilidad de X o más juicios concordantes en n pruebas ($p = 1/2$)

n \ X	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37																	
5	625	312	062																																																	
6	688	219	031																																																	
7		483	125	016																																																
8			737	288	070	008																																														
9				508	180	038	004																																													
10					754	344	100	021	002																																											
11						540	227	085	011	001																																										
12							774	388	146	038	006	003																																								
13								681	287	082	022	013	007																																							
14									791	424	180	057	013	007	001																																					
15										804	464	219	077	021	004	001																																				
16											629	332	143	049	013	002	001																																			
17												815	481	238	095	031	008	001																																		
18													824	503	263	115	041	012	003																																	
19														664	383	189	078	027	007	001																																
20															832	523	286	134	062	017	004	001																														
21																836	518	278	127	053	011	003																														
22																	680	424	230	108	043	015	004	001																												
23																		845	557	327	189	078	029	008	002	001																										
24																			860	641	397	152	064	023	007	002	001																									
25																				861	701	442	248	127	062	019	008	002	001																							
26																					856	711	458	265	136	061	024	008	002	001																						
27																						860	720	473	281	150	071	030	011	003	001																					
28																							864	728	487	296	163	080	035	014	005	001																				
29																								868	736	500	171	086	024	009	003	001																				
30																									875	743	511	188	099	047	020	008	003	001																		
31																										871	749	527	197	108	053	024	009	003	001																	
32																											875	755	533	208	114	051	038	017	006	002	001															
33																												878	761	542	222	126	066	049	023	010	004	001														
34																													880	765	551	233	136	072	036	016	007	002	001													
35																														883	769	561	243	144	079	040	019	008	003	001												
36																															885	771	569	253	152	085	044	021	009	004	001											
37																															888	775	568	263	152	085	044	021	009	004	001											
38																																888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001										
39																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
40																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
41																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
42																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
43																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
44																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
45																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
46																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
47																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
48																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
49																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									
50																																	888	772	560	272	152	085	044	021	009	004	001									

Fuente: Watts, B.M; Ylimaki, G.L; Jeffery, L.E; Elías, L.G. 1992

ANEXO 3



Figura 14. Moras con recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina.

ANEXO 4



Figura 15. Inmersión de moras en la solución de recubrimiento de gelatina y ϵ -polilisina y secado.

ANEXO 5

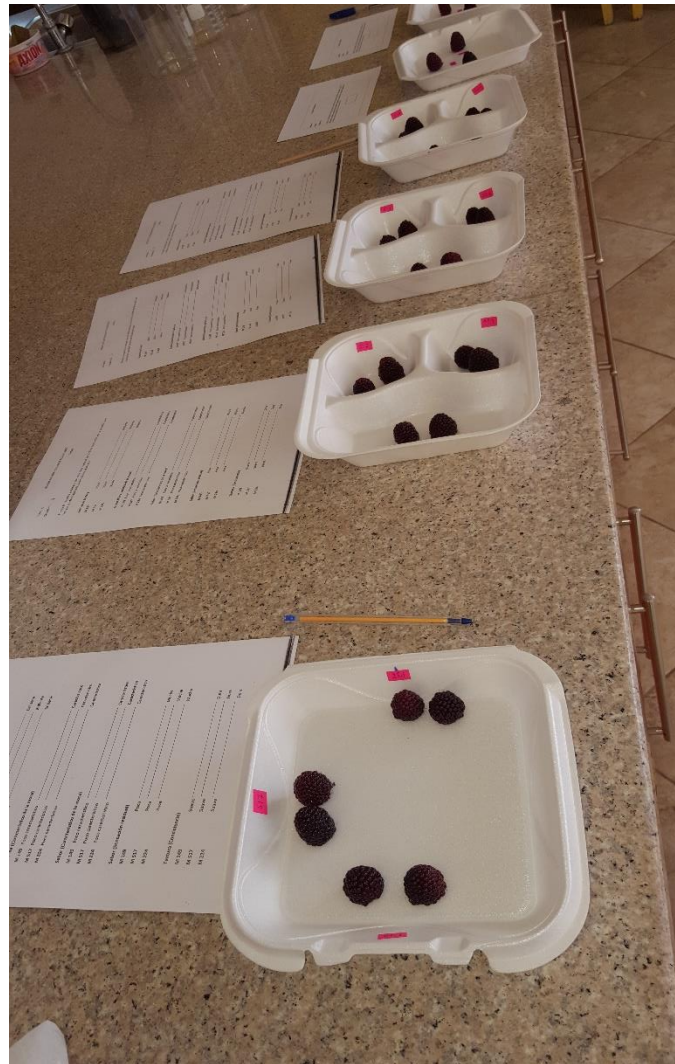


Figura 16. Evaluación sensorial de las muestras de moras.
Intensidad de cualidades y prueba triangular.

ANEXO 6



Figura 17. Medición de concentración de gases.