



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Efecto de los recubrimientos con quitosano en la calidad y vida útil de los arándanos.

Effect of chitosan coatings on quality and shelf-life of blueberries.

Autora

Patricia Ramos Martín

Directores

Maria Eugenia Venturini Crespo

Domingo Blanco Parmo

Facultad de Veterinaria

2018/2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Los arándanos	3
3.1.1. Características generales	3
3.1.2. Valor nutricional	5
3.1.3. Producción y consumo	6
3.1.4. Pérdida de calidad postcosecha	7
3.2. Conservación postcosecha	8
3.2.1. Refrigeración	9
3.2.2. Envasado	9
3.2.3. Recubrimientos comestibles a base de quitosano	9
3.2.4. Tratamientos de control biológico	9
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1. Material vegetal	12
5.2. Diseño experimental	12
5.2.1. Recubrimientos comestibles	13
5.2.1.1. Preparación del recubrimiento de quitosano	13
5.2.1.2. Extracción y cuantificación de lipopéptidos	13
5.3. Metodología	15
5.3.1. Calidad físico-química	15
5.3.1.1. Pérdida de peso	15
5.3.1.2. Sólidos solubles totales, pH y acidez	15
5.3.1.3. Color	15
5.3.1.4. Determinación de la firmeza de los frutos	16
5.3.1.5. Análisis sensorial	16
5.3.2. Calidad microbiológica	17
5.3.2.1. Recuentos microbiológicos	17
5.3.2.2. Porcentaje de podredumbres	18
5.3.2.3. Grado de deshidratación	18
5.3.3. Calidad nutricional	19
5.3.3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales	19
5.3.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	20

5.3.3.3.	Antocianos totales	20
5.3.3.4.	Extracción y cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPAs)	21
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1.	Pérdida de peso y grado de deshidratación	23
6.2.	Porcentaje de podredumbres	24
6.3.	Influencia de los tratamientos en la calidad microbiológica	25
6.4.	Influencia de los tratamientos en la calidad físico-química	27
6.5.	Análisis sensorial	29
6.6.	Influencia de los tratamientos en la calidad nutricional	30
7.	CONCLUSIONES	32
7.1.	Conclusión general	32
7.2.	General conclusion	32
8.	VALORACIÓN PERSONAL	33
9.	BIBLIOGRAFÍA	i

1. RESUMEN

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) es un fruto climatérico que forma parte del grupo conocido como frutos del bosque o bayas, muy apreciados actualmente por sus excepcionales propiedades nutricionales, especialmente por su elevada actividad antioxidante. Sin embargo, su vida útil post-cosecha a temperaturas de comercialización no supera las 2-3 semanas. La deshidratación, que afecta enormemente a su aspecto, y el desarrollo de podredumbres, fundamentalmente por *Botrytis cinerea*, son las dos causas de su deterioro. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer los posibles efectos beneficiosos de recubrimientos con quitosano (0,5 y 1%) y su combinación con el sobrenadante lipoproteico producido por la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 sobre la pérdida de humedad y el desarrollo de mohos en los arándanos conservados a 6°C. También, para caracterizar la calidad global de los frutos se determinaron los siguientes parámetros: acidez titulable, sólidos solubles totales, pérdida de peso, pH, compuestos fenólicos y actividad antioxidante, recuentos de mesófilos aerobios totales y mohos y levaduras y control organoléptico a lo largo de su vida útil. En la segunda semana de conservación se detectó que los arándanos recubiertos con quitosano o tratados con el extracto de lipopéptidos o con ambos no tenían la calidad mínima para ser comercializados, bien por su elevado grado de deshidratación o por la aparición de podredumbres. Durante la aplicación de los tratamientos la capa cerosa de protección que recubre estos frutos, conocida como pruina, se pierde o se daña notablemente. Así, se constató que ni el recubrimiento con quitosano, ni los extractos antifúngicos ni ambos combinados consiguen compensar los efectos negativos de la pérdida de la capa cerosa.

2. ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) is a climacteric fruit that forms part of the group known as forest fruits or berries, which are currently highly appreciated for their exceptional nutritional properties, especially for their high antioxidant activity. However, its post-harvest shelf life at marketing temperatures does not exceed 2-3 weeks. Dehydration, which greatly affects their appearance, and the development of rots, mainly due to *Botrytis cinerea*, are the two causes of their deterioration. Therefore, the objective of this work was to establish the possible beneficial effects of chitosan coatings (0,5 and 1%) and their combination with the lipoproteic supernatant produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 strain on moisture loss and mold development in blueberries preserved at 6°C. Also, to characterize the overall quality of the fruits the following parameters were determined: titratable acidity, total soluble solids, weight loss, pH, phenolic compounds and antioxidant activity, total aerobic mesophilic counts and molds and yeasts and organoleptic control throughout their shelf life. In the second week of conservation, it was detected that the blueberries coated with chitosan or treated with lipopeptide extract or with both did not have the minimum quality to be marketed, either because of their high degree of dehydration or because of the appearance of rots. During the application of the treatments the waxy layer of protection that covers these fruits, known as pruine, is lost or significantly damaged. Like this, it was confirm that neither the chitosan coating, nor the antifungal extracts nor both combined were able to compensate for the negative effects of the loss of the waxy layer.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Los arándanos

3.1.1. Características generales

El arándano, pertenece a la familia Ericaceae, género *Vaccinium*, el cual engloba dos especies: el arándano rojo (*Vaccinium oxycoccus*) y el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) (Vázquez et al., 2009). Es un fruto climatérico capaz de madurar tras su recolección y que forma parte del grupo conocido como frutos del bosque o bayas.

El arándano azul (Figura 1) es una baya casi esférica de pequeño tamaño y con una coloración que varía de azul a negro, la epidermis está recubierta por secreciones cerosas que le proporcionan un toque atractivo (Mayorga, 2004). La disponibilidad de gran cantidad de variedades de arándano es el resultado del cruzamiento de varias especies del género *Vaccinium* adaptadas a distintas condiciones ambientales. Dicho cultivo tiene como principal objetivo la obtención de variedades con mayor productividad y calidad organoléptica bajo sus propias condiciones edafoclimáticas.



Figura 1. Arándanos azules (Fuente: <https://www.seeds-gallery.shop/en/home/duke-highbush-blueberry-seeds-vaccinium-corymbosum.html>)

El consumo de bayas o frutos rojos es debido a su atractivo color y sabor, pero también está vinculado a la prevención de algunas enfermedades crónicas y degenerativas, ya que se consideran fuente de antioxidantes naturales por su contenido en compuestos fenólicos. El término engloba un grupo muy diverso, que incluye gran variedad de frutas rojas, azules o moradas de pequeño tamaño y altamente perecederas, representadas principalmente por la fresa, grosella, zarzamora, frambuesa y el arándano.

A continuación, se detallan los principales parámetros vinculados a la calidad que se utilizan para clasificar y comercializar los frutos (Mitcham, Crisosto y Kader, 1998):

- **TAMAÑO:** para consumo en fresco se valoran más los frutos de mayor tamaño. Comercialmente se clasifican en función del número de frutos que ocupan un envase de un volumen determinado.

- COLOR DE LA PIEL: es debido a la presencia de antocianos, pigmentos que le confieren el color azul al fruto. Se persigue un color lo más uniforme posible.
- COLOR DE LA PULPA: puede variar de nacarado a marfil tostado dependiendo de la variedad.
- FIRMEZA: medida de la textura relacionada con la sensación que provoca el producto al tacto. Comercialmente se buscan frutos firmes que soporten la manipulación.
- FORMA: existen numerosas formas esféricas entre las variedades de arándanos cultivadas, que pueden variar desde achatadas a globosas.
- CICATRIZ: herida en el punto de inserción del fruto. Se valora que sea pequeña para minimizar la entrada de patógenos.
- PRSENCIA DE PRUINA: capa cerosa que rodea el fruto. No debe ser deteriorada durante la manipulación, pues tiene efectos beneficiosos para la conservación.
- AUSENCIA DE DEFECTOS: morfológicos y fisiológicos originados durante la etapa de crecimiento, o lesiones (heridas, cortes...) producidas durante la cosecha, transporte y almacenamiento. Afectan a la apariencia y facilitan la penetración de patógenos.
- SABOR: dependiente de los sólidos solubles, acidez total titulable y compuestos volátiles odorantes.

Estos parámetros fisicoquímicos oscilan entre un amplio rango de valores en función de la variedad y las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrolle el cultivo. El peso del fruto varía de 0,8 a 2,8 g, el diámetro de la baya oscila entre 1 y 3,2 cm, el pH se encuentra entre 2,8 y 3,5, el rango de acidez entre 0,4 y 1,3% expresado en cantidad de ácido cítrico y la cantidad de sólidos solubles va de 10 a 17°Brix (Pinedo, 2018). Estos dos últimos parámetros, junto con la homogeneidad del color característico son los estándares tenidos en cuenta para determinar el índice de madurez (Mitcham, Crisosto y Kader, 1998). Por otra parte, el índice de calidad depende del aspecto (color, tamaño, forma y ausencia de defectos), firmeza, sabor y valor nutricional.

El arándano es un fruto climatérico con una tasa de producción de esta hormona entre 0,1-1 $\mu\text{L}/\text{kg h}$ a 5°C. Sin embargo, a pesar de responder a los aportes de etileno debe ser cosechado casi en su madurez fisiológica, ya que el sabor no mejora tras la recolección (Mitcham, Crisosto y Kader, 1998). Su velocidad de respiración es de 2-3 $\text{mL CO}_2/\text{kg h}$ a 0°C, algo alta en comparación con otros frutos menos perecederos, por lo que conviene

almacenarlos a temperaturas lo más bajas posibles, pero por encima de 3°C para reducir la sensibilidad a daños por frío (Mitcham, Crisosto y Kader, 1998). Por otro lado, la combinación del frío con el envasado en atmósfera modificada es una alternativa para combatir la aparición de las principales patologías fúngicas implicadas en la pérdida de calidad del fruto, además de reducir la respiración del fruto, con la consiguiente reducción de su metabolismo.

3.1.2. Valor nutricional

El arándano se caracteriza por poseer un bajo valor calórico y un gran contenido en agua (más de un 80% del peso total del fruto) (Tabla 1). Su calidad nutricional está determinada por ser una buena fuente de fibra, vitaminas y minerales. Además, contiene diversos fitoquímicos principalmente de naturaleza fenólica que están relacionados con parámetros de calidad organoléptica, nutricional y funcional. La capacidad antioxidante de distintos compuestos bioactivos, donde destaca la vitamina C y los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, catequinas, flavonoles y antocianos), se asocia al efecto protector de prevención o ralentización de los procesos oxidativos que intervienen en un gran número de patologías (Vázquez et al., 2009).

Tabla 1. Valor nutricional del arándano (*Vaccinium corymbosum*)

Componente	Cantidad / 100 gramos	Componente	Cantidad / 100 gramos
Energía	57 kcal (240 kJ)	Sodio	1 mg
Proteína	0,74 g	Zinc	0,16 mg
Lípidos	0,33 g	Vitamina C	9,7 mg
Carbohidratos	14,49 g	Tiamina	0,037 mg
• Azúcares	9,96 g	Riboflavina	0,041 mg
• Fibra dietética	2,4 g	Niacina	0,418 mg
Cenizas	0,24 g	Vitamina B6	0,052 mg
Agua	84,21 g	Antocianos	22,8 mg
Calcio	6 mg	Polifenoles	307 mg
Hierro	0,28 mg	Actividad antioxidante	15,3 mmol/kg
Magnesio	6 mg	Flavonoides	
Fósforo	12 mg	• Antocianinas	25-100 mg
Potasio	77 mg	• Flavonoles	22 mg

Fuente: Base de datos de nutrientes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2019) y Chiabrando y Giacalone (2017)

Molina et al. (2008) concluyeron que el sistema de producción y la zona de cultivo pueden marcar pequeñas diferencias en los parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad del arándano. Proponen que los factores genéticos son los principales determinantes de dichas variaciones y que por ello se hace necesaria una buena selección de variedades adaptadas a las condiciones específicas de cada zona de cultivo. Investigadores europeos y

americanos coinciden en que las variedades silvestres no sólo presentan mejores propiedades organolépticas de color, sabor, textura y jugosidad, sino que, además tienen un contenido fenólico más alto, asociado a una mayor actividad antioxidante.

En los últimos años se han realizado una serie de investigaciones sobre la posible relación entre el consumo de arándanos silvestres y el menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Éstas revelaron que los arándanos silvestres poseen la capacidad potencial de regular la presión sanguínea y prevenir la aterosclerosis (Vázquez et al., 2009). Junto con los parámetros de calidad y de rendimiento agronómico del fruto, el perfil fenólico del arándano podría utilizarse como un nuevo criterio a la hora de seleccionar variedades que contribuyan a revalorizar y extender su consumo.

Para cualquier fruto, la diversidad y concentración de antioxidantes dependen en gran medida de la especie y del cultivo. Las prácticas precosecha, las condiciones climáticas, el grado de madurez en el momento de cosecha, el almacenamiento postcosecha y las operaciones de procesado son también determinantes de los perfiles fitoquímicos.

Dentro de los principales grupos de antioxidantes, los compuestos fenólicos representan un gran grupo de metabolitos secundarios, compuestos por uno o más anillos aromáticos con grados variables de hidroxilación, metoxilación y glicosilación, que contribuyen al color, astringencia y amargor de los frutos.

Los ácidos fenólicos libres en la fruta rara vez exceden el 5% del total, pueden subdividirse en derivados cinámicos (esterificados) y benzoicos (glicosilados). A su vez, los flavonoides representan el grupo más diverso de compuestos fenólicos, con dos anillos aromáticos asociados a través de enlaces C-C por medio de un enlace C-C en un heterociclo oxigenado 3 C. Sobre la base del estado de oxidación del anillo central, los flavonoides se dividen en flavonoles, flavanoles, flavonas y antocianinas. Las bayas son particularmente ricas en este último subgrupo, que son las responsables de sus colores característicos. Concretamente, el arándano es un fruto que destaca por su gran contenido en antocianinas (Pinedo, 2018). Estos compuestos son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante total de los arándanos (84%), mientras que la quercetina y el kaempferol conjugados como 3-glucósidos y 3-glucuronidas solo son responsables del 14% de la capacidad antioxidante del fruto.

3.1.3. Producción y consumo

La producción y el consumo de arándanos están liderados por Estados Unidos, Canadá seguidos de Polonia, Alemania y México. Chile, representa el 90% de la producción

de arándanos de América del Sur. A nivel mundial el cultivo de arándano se está implementando en zonas como Marruecos en África, Japón y China.

Como se muestra en la Figura 2, en cada país productor se desarrolla el cultivo y su recolección en una etapa concreta a lo largo de cada campaña, dentro de la cual se encuentra un periodo de plena producción. En cuanto a la producción a nivel europeo, España se ha posicionado justo detrás de Alemania y Polonia con variedades más tempranas que parten desde enero. La producción mayoritaria se sitúa entre marzo y junio en Huelva.

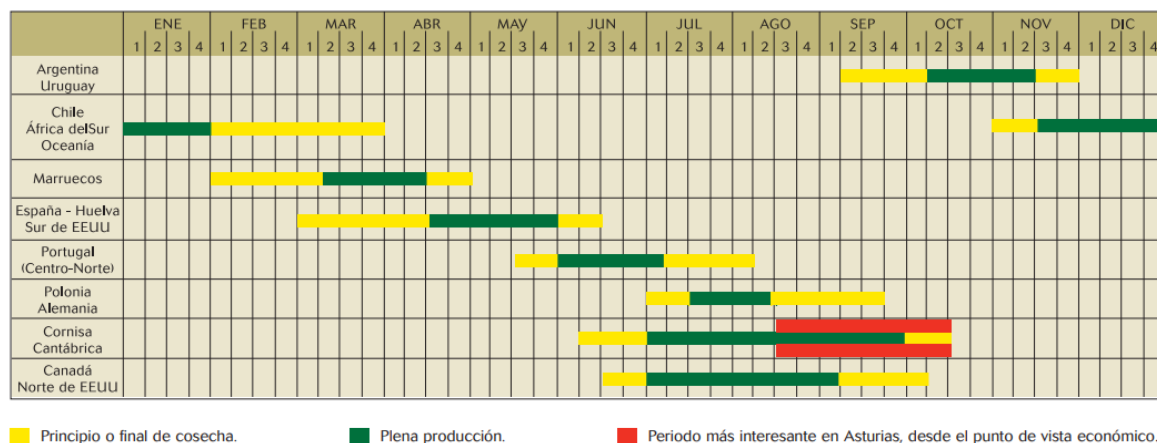


Figura 2. Principales países productores y su calendario de producción (García, García y Ciordia, 2007).

Por otro lado, el mercado europeo es el segundo importador de arándanos a nivel mundial, liderado por Reino Unido y Alemania, donde el consumo se ha incrementado de manera significativa en los últimos años, debido a que, junto con Países Bajos, Francia e Italia, son consumidores tradicionales de este tipo de frutos. Sin embargo, a pesar de que España es el segundo consumidor de fruta de la Unión Europea después de Italia, el consumo de arándanos apenas llega a 130 gramos por persona y año según datos de la empresa Fresh4cast (García, García y Ciordia, 2018). Como consecuencia del crecimiento exponencial de su consumo a nivel mundial se hace necesaria la aplicación de tecnologías postcosecha que prolonguen su vida útil facilitando así el comercio internacional.

3.1.4. Pérdida de calidad postcosecha

Como se ha visto en los apartados anteriores, la producción y el consumo de arándano en todo el mundo ha aumentado rápidamente en los últimos años debido a sus diversos beneficios para la salud, su sabor único y su valor nutricional. Sin embargo, los arándanos son altamente perecederos y sensibles al deterioro rápido, por lo que, dependiendo de la etapa de maduración, método de cosecha, presencia plagas y condiciones de almacenamiento tienen una vida de 1 a 8 semanas (Duan et al., 2011).

A continuación, se detallan las principales causas que determinan la escasa vida útil en postcosecha de estos frutos:

- Sensibilidad a la pérdida de agua que provoca su rápida deshidratación y marchitez.
- Ablandamiento ocasionado por la degradación de pectinas, celulosa y hemicelulosa, principales componentes de la pared celular y lámina media, por la acción de las enzimas poligalacturonasa, celulasa y b-galactosidasa (Chen et al., 2017). Estas actividades enzimáticas, así como otros procesos fisiológicos causantes de la senescencia de los frutos están regulados por el etileno (Xu y Liu, 2017).
- La tendencia a daños mecánicos durante la cosecha y el transporte, que pueden provocar lesiones internas y acelerar el deterioro del fruto por aumento del metabolismo, así como favorecer la infección por microorganismo fitopatógenos (Fan et al., 2017).
- Ataque de patógenos tales como *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre gris (Figura 3), *Rhizopus sp* (Uliana et al., 2014), *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.* y diversas levaduras (Tournas y Katsoudas, 2005).



Figura 3. Podredumbre gris por *B. cinerea* en arándanos (Laboratorio de fitopatología de la Universidad de Chile)

3.2. Conservación postcosecha

En la actualidad, el almacenamiento en frío, los revestimientos alimentarios, la radiación ultravioleta, las atmósferas modificadas, la ozonización y la fumigación con dióxido de azufre son algunas tecnologías postcosecha que han sido testadas para aumentar la vida útil y mantener la calidad nutricional de los arándanos (Yang et al., 2014).

3.2.1. Refrigeración

Los arándanos son sensibles a la pérdida de agua, provocando defectos apreciables en el fruto como posibles arrugas en la piel. Por ello, se debe conservar la fruta a una temperatura y humedad recomendada para reducir la deshidratación. En el caso de almacenar los arándanos a una humedad relativa alta del 90-95% y una temperatura de 0°C conseguimos una disminución en la pérdida de humedad del fruto y una vida útil de 1-2 semanas (Quispe, 2018).

3.2.2. Envasado

El envasado en atmósfera modificada (20% CO₂ y 10% O₂) reduce el crecimiento de *Botrytis cinerea* y otros organismos causantes de la descomposición; también reduce la respiración y el ablandamiento de los arándanos, prolongando la vida postcosecha (Mitcham, Crisosto y Kader, 1998). Refrigerado a 0°C y envasado en atmósfera modificada el arándano puede alcanzar una vida útil de 20-30 días.

3.2.3. Recubrimientos comestibles a base de quitosano

El quitosano (polyβ-(1,4)-N-acetyl-d-glucosamina) es uno de los polímeros naturales más utilizados en la producción de recubrimientos comestibles. Es un polisacárido con alto peso molecular producido industrialmente a partir de la deacetilación de la quitina de los exoesqueletos de crustáceos o de la pared celular de los hongos, siendo biodegradable, no tóxico y no alergénico, lo que contribuye a su uso en muchos campos, incluyendo la alimentación, la biomedicina, la agricultura y la protección del medio ambiente. Por sus características como alta actividad antimicrobiana, biocompatibilidad, biodegradabilidad y perfil no tóxico, las capas de quitosano son un excelente portador de otras sustancias funcionales, tales como antimicrobianos y antioxidantes (Vieira et al., 2016).

El uso de películas o recubrimientos comestibles representa una alternativa y/o estrategia adicional para la conservación de la fruta, por su capacidad de reducir la humedad, la migración de solutos, la tasa de respiración y transpiración, la toma de firmeza y, en general, el retraso de la senescencia. Los recubrimientos comestibles nos permitirán reducir las pérdidas de peso y la velocidad de respiración. Combinados con otras sustancias antimicrobianas (lipopéptidos de origen bacteriano) también nos ayudarán a prevenir la aparición de podredumbres.

3.2.4. Tratamientos de control biológico

El método más utilizado a lo largo de los últimos años para combatir las podredumbres en frutas y hortalizas ha sido el uso de fungicidas, pero actualmente sus

inconvenientes y limitaciones están aumentando por lo que surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas a estos tratamientos. Hay numerosas especies de levaduras y de bacterias capaces de inhibir el crecimiento de los mohos. Estos agentes de biocontrol pueden frenar el desarrollo de las podredumbres postcosecha colonizando las vías de infección, compitiendo por los nutrientes, secretando compuestos con actividad antifúngica (Chalutz y Droby, 1998). Un ejemplo es el género *Bacillus* spp, ya que algunas cepas tienen la capacidad de producir estos compuestos con actividad antifúngica (antibióticos o enzimas) que degradan las paredes celulares de las células hifales y volátiles antifúngicos que las convierte a priori en excelentes agentes de biocontrol frente a un amplio rango de patógenos.

B. amyloliquefaciens dedica el 8,5% de su genoma a la producción de compuestos con actividad antifúngica: lipopéptidos entre los que destacan iturinas (Hsieh et al., 2008; Yu et al., 2002) fengicinas (Lin et al., 1999; Ongena et al., 2007) y surfactinas (Ahimou et al., 2000; Hsieh et al., 2004).

Se ha demostrado que estos compuestos, poseen una baja toxicidad y alta biodegradabilidad, lo que los coloca como una alternativa plausible y real a los pesticidas de síntesis química contra enfermedades como la podredumbre marrón que afecta a las frutas de hueso (Calvo *et al.*, 2019) y la podredumbre gris, causada por *Botrytis* spp.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El Grupo de Investigación Alimentos de Origen Vegetal, representado por los miembros que desarrollan sus actividades en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, participa en el grupo de cooperación “Adaptación a las condiciones agronómicas de Aragón de modelos sostenibles de especies innovadoras de frutos rojos – ARABERRIES” que fue concedido en la convocatoria de subvenciones de apoyo a acciones de cooperación de agentes del sector agrario, en el marco del PROGRAMA DE DESARROLLO RURAL para Aragón 2014-2020, para 2018.

El objetivo de este grupo es implantar el cultivo de frutos rojos, principalmente de origen silvestre, en parcelas experimentales de zonas de montaña de la comunidad, que se adecuan a los requerimientos del cultivo, potenciando así la economía rural y la producción sostenible. Además, la influencia de la temperatura, altitud, precipitaciones e intensidad de la radiación, entre otros factores ambientales, en la producción de metabolitos secundarios ha sido estudiada en profundidad, resultando en algunos casos en un aumento de estos, lo que otorga un valor añadido a los productos cultivados en estas áreas.

Así, mientras se obtienen las primeras producciones debemos familiarizarnos con la evaluación de la calidad y el manejo postcosecha de estos frutos, así como determinar la calidad nutricional de variedades comerciales para posteriormente poder compararla con la de los frutos cultivados en las parcelas experimentales. Además, como se ha explicado a lo largo de la introducción, existe la necesidad de ensayar diferentes estrategias para aumentar la vida útil de los frutos.

Por ello, se estableció como objetivo general el estudio de la calidad global (físicoquímica, microbiológica, nutricional y organoléptica) y el aumento de la vida útil del arándano mediante la aplicación de un recubrimiento con quitosano, así como su combinación a distintas concentraciones, con el sobrenadante de la cepa de biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 rico en sustancias con actividad antifúngica, principalmente iturina.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal

Este estudio se ha realizado con arándanos frescos de la variedad Windsor, suministrados a mediados del mes de marzo por la empresa Intercom de Huelva, España.

Tras la recepción se hizo una selección previa de los arándanos objeto de estudio, con el fin de eliminar aquellos frutos con defectos apreciables y desarrollo de podredumbres fúngicas, además de conseguir lotes homogéneos en cuanto a las características de los frutos.

5.2. Diseño experimental

Para la evaluación del comportamiento del recubrimiento con quitosano y el sobrenadante lipopeptídico de la cepa *Bacillus amylolicuefaciens* BUZ-14 sobre la calidad del arándano de la variedad Windsor, se prepararon 11 lotes (Figura 4): frescos sin ningún tratamiento (control), un control conservado en bolsas de alta humedad (Lifepack), desinfectados con hipoclorito sódico (100 mg/L), y frutos recubiertos con: quitosano al 0,5%, quitosano al 1%, sobrenadante de la cepa *Bacillus amylolicuefaciens* (BUZ-14) en una relación 1:5, sobrenadante de BUZ-14 en una relación 1:10, combinación de quitosano (0,5%) y sobrenadante de BUZ-14 (1:5), mezcla de quitosano (0,5%) y sobrenadante de BUZ-14 (1:10), quitosano (1%) y sobrenadante de BUZ-14 (1:5), quitosano (1%) y sobrenadante de BUZ-14 (1:10). Finalmente, todos los lotes se envasaron en barquillas de polipropileno con tapa y se conservaron a 6°C hasta el fin de su vida útil, a lo largo de la cual se determinaron distintos parámetros físico-químicos, funcionales, microbiológicos (porcentaje de podredumbres, recuento de mesófilos aerobios totales, mohos y levaduras), y organolépticos.



Figura 4. Diseño experimental.

5.2.1. Recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles se elaboraron mezclando quitosano (Sigma Aldrich, Bornem, Belgium) y la fracción lipopeptídica del sobrenadante producido por *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14, en las proporciones detalladas anteriormente en el diseño experimental.

5.2.1.1. Preparación del recubrimiento de quitosano

Para la preparación del recubrimiento se utilizó quitosano al 0,5 y 1% en una solución acuosa de ácido láctico (Panreac, Barcelona, España) al 0,5%. Para lograr la disolución total, la mezcla se mantuvo en agitación durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró para eliminar impurezas, y así evitar defectos visuales, utilizando como filtro 3 capas de gasa estéril y la ayuda de un kitasato acoplado a un embudo Büchner y bomba de vacío. Una vez filtrado, se transfirieron 200 mL de la disolución a recipientes de vidrio de 500 mL de capacidad, se incorporó glicerol (Merck, Darmstadt, Alemania), como plastificante para obtener un recubrimiento más flexible, maleable y resistente. Finalmente se añadió un núcleo magnético de 30 mm liso, y los recipientes se llevaron a autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

5.2.1.2. Extracción y cuantificación de lipopéptidos

Para la extracción de los lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 se siguió el procedimiento mostrado en la Figura 5. Se tomaron 1000 mL del medio de cultivo 863 y se distribuyeron en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm a 15°C (Megafuge Heraeus 1.0R, Thermo Fisher, UK). Después se separaron los sobrenadantes por decantación y se autoclavaron 15 minutos a 121°C (Sobrenadante Libre de Células-CFS). Tras enfriarse (temperatura ambiente), se añadió n-butanol (en proporción 1:4 v/v) y se dividió de nuevo en tubos Falcon de 50 mL. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm a 15°C. Se separó la fase superior (butanólica) y el resto fue desechado. De cada fracción butanólica que contenía los lipopéptidos extraídos, se obtuvieron entre 8-10 mL los cuales se llevaron a evaporación a vacío en rotavapor (Laborota 4000 Heidolph; Schwabach, Alemania) ($T^a=50^{\circ}\text{C}$, 90 rpm). Finalmente, el residuo se disolvió en agua Mili-Q en proporción 1:2 en relación al volumen obtenido previamente de fase butanólica. Si la disolución obtenida tenía turbidez, se filtraba a través de filtros de poliamida (CHROMAFIL® Xtra PA-20/25) de 0,20 μm de tamaño de poro.

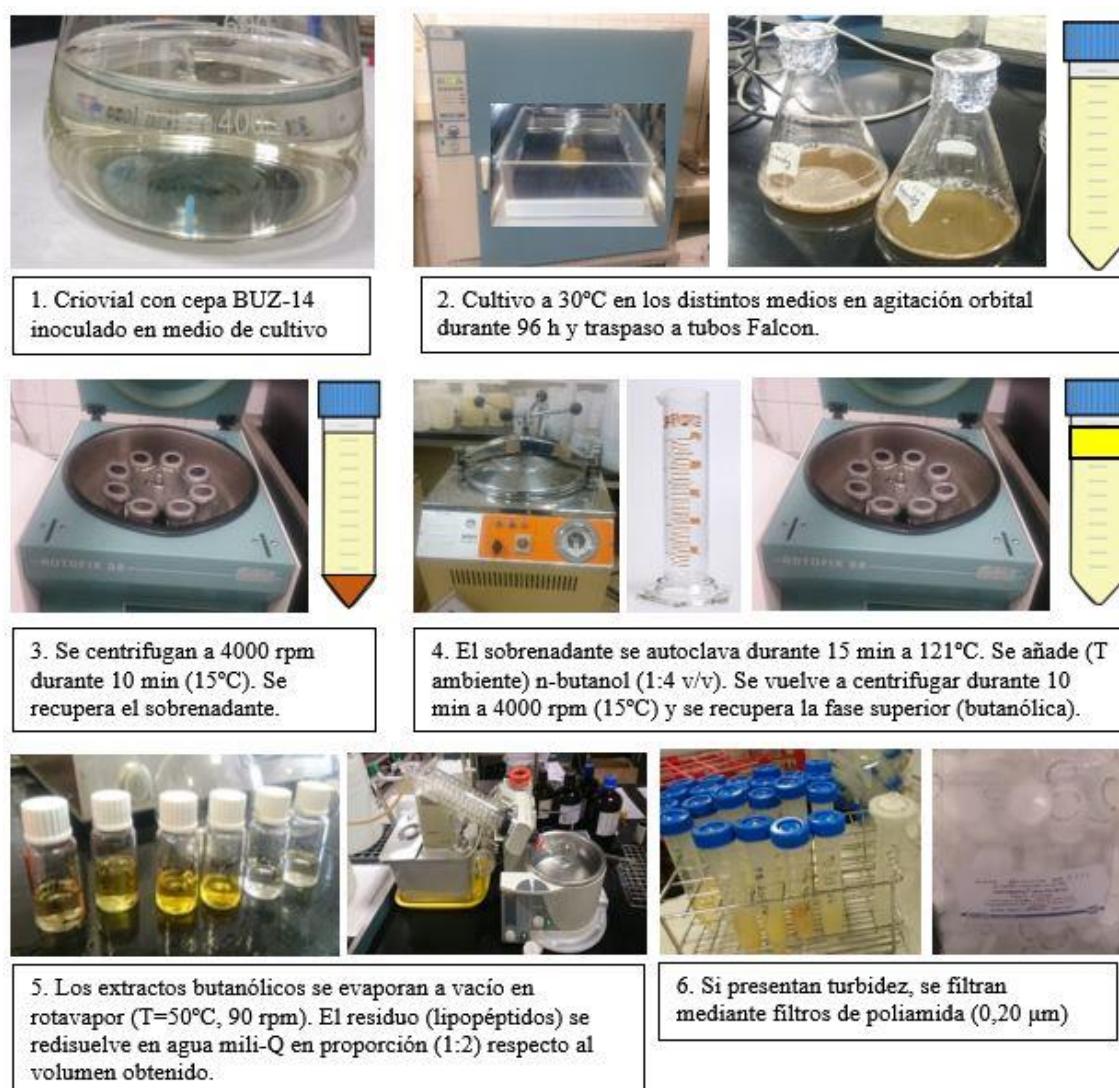


Figura 5. Procedimiento de extracción de la fracción lipopeptídica producida por la cepa BUZ-14.

La cuantificación se realizó en un equipo de cromatografía HPLC (Agilent-HP 110 Series) con detector DAD acoplado (Agilent 1200 Series). Se inyectaron las muestras para identificar los lipopéptidos producidos por la cepa bacteriana por triplicado y se cuantificaron las distintas sustancias mediante la integración de los picos obtenidos en el HPLC y elaboración de las correspondientes curvas patrón. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Columna: Lichrospher RP18, 5 μm 250x4mm.
- Fase móvil:
 - A: 100% acetonitrilo (0,1% ácido fórmico).
 - B: 100% agua mili Q (0,1% ácido fórmico).
 - Flujo: 1 mL min⁻¹ y los gradientes se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la fase móvil para la identificación de lipopéptidos por HPLC

Tiempo (min)	%A	%B
0	35	65
8	35	65
10	40	60
25	40	60
30	80	20
45	80	20
50	100	0
60	35	65

Las concentraciones de iturinas y fengicinas en los extractos de lipopéptidos fueron $585,7 \pm 66,6$ y $1195,0 \pm 311,1$ mg/mL.

5.3. Metodología

5.3.1. Calidad físico-química

5.3.1.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso de las muestras se calculó como la diferencia entre el peso inicial y el peso final de las bandejas de cada lote en el correspondiente punto de análisis a lo largo de su vida útil. Los resultados se expresaron como el porcentaje de pérdida de peso respecto al peso inicial.

5.3.1.2. Sólidos solubles totales, pH y acidez

El contenido en sólidos solubles totales (SST) es una característica comercial de gran valor, que fue determinada por refractometría. Los valores medios deseados dependen del fruto en sí, en el caso de los arándanos debe estar comprendido entre 10 y 17°Brix.

La acidez total y el pH se determinaron mediante una valoración ácido-base realizada con un titulador automático Crison Compact Titrator, tras la extracción del zumo del fruto. Los resultados de acidez total se expresaron como mg de ácido cítrico/L, por tratarse del ácido predominante junto con el málico.

5.3.1.3. Color

Se determinaron las coordenadas CIElab de 6 frutos representativos de cada lote. Los valores de las coordenadas de color de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) se describen de la siguiente manera:

- Tonos amarillos (b^{*+}), o matices azules (b^{*-}).
- Tonos rojizos (a^{*+}), o tonos verdes (a^{*-}).
- Claridad (L^*), luminosidad del estímulo juzgada con relación a luminosidad de otro estímulo que consideramos el blanco.

Las muestras se analizaron mediante el software Matrox Inspector 8.0 (Matrox Electronic Systems Ltd, Dorval, Canadá) previamente escaneadas (HP SCanjet G4010, 1200

ppp de resolución). Las medidas de reflexión se han efectuado en el rango de longitudes de onda correspondientes a la región del espectro visible e infrarrojo (de 360 nm a 900 nm). Mediante la selección de una región óptica de interés (ROI) en las imágenes escaneadas de cada una de las muestras de arándano, se obtuvieron las coordenadas promedio R, G, B, que han sido utilizadas para calcular las coordenadas CIElab correspondientes al ROI seleccionado.

A partir de dichas coordenadas se calcularon las diferencias de color entre las distintas muestras mediante la siguiente fórmula propuesta por la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) de 2004:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2)} = \sqrt{(a^*m - a^*ref)^2 + (b^*m - b^*ref)^2 + (L^*m - L^*ref)^2}$$

Donde ΔE^*ab es la diferencia de color entre las muestras, m es la muestra que se quiere comparar, y ref es la muestra de referencia.

Por último, el criterio para decidir si la diferencia de color entre las muestras es apreciable al ojo humano, se basa en:

$\Delta E^*ab < 3$: diferencias de color entre muestras no apreciables por el ojo humano.

$\Delta E^*ab > 3$: diferencias de color entre muestras apreciables por el ojo humano.

5.3.1.4. Determinación de la firmeza de los frutos

Se determinó la firmeza de los frutos y la elasticidad de la piel mediante un ensayo de punción en un texturómetro TA-XT (Stable Micro Systems Ltd., Reino Unido), utilizando una sonda de aguja acero inoxidable de 2 mm. Se realizó una punción de 1,5 mm de distancia en la región ecuatorial de treinta frutos de cada lote a una velocidad de 0,5 mm/s. Los resultados de firmeza y elasticidad de la piel se expresaron en g y mm, respectivamente.

5.3.1.5. Análisis sensorial

El análisis sensorial fue realizado por un panel de catadores entrenados formado por miembros del Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal. La finalidad de dicho análisis fue evaluar la apariencia y calidad organoléptica de los arándanos. Para ello, se diseñó una hoja de cata dividida en dos fases y que recogía los siguientes atributos:

Evaluación externa

Fase en la que se evaluó el aspecto general, determinando el grado de preferencia visual externa en una escala de 0 a 10, siendo 0 poco apetecible y 10 muy apetecible. También se evaluó la presencia de defectos y golpes.

Fase Gustativa/En boca

En esta fase se evaluaron 7 atributos. Del mismo modo que en el caso de la evaluación del aspecto general, se utilizó una escala de 0 a 10 para la valoración de los distintos atributos. En primer lugar, se evaluó la **intensidad del sabor característico**, además de indicar la presencia o ausencia de sabores anómalos. Por otro lado, se evaluaron dos atributos muy relacionados entre sí, jugosidad y dureza, siendo 0 = poco jugoso y 10 = muy jugoso; y 0 = poco duro y 10 = muy duro, respectivamente. Los atributos evaluados relacionados con el sabor fueron la acidez, grado de amargor y astringencia, en función de la siguiente escala de 0 = poco ácido/amargo/astringente a 10 = muy ácido/amargo/astringente. Finalmente, se pidió al panel de cata que puntuasen los distintos lotes según la aceptabilidad general del producto siendo 0 = me desagrada mucho y 10 = me agrada mucho.

Antes de presentar los frutos al panel de catadores, y en cada punto de análisis, se codificó cada uno de los lotes con un número de tres cifras tomadas aleatoriamente.

5.3.2. Calidad microbiológica

5.3.2.1. Recuentos microbiológicos

Los distintos análisis microbiológicos que a continuación se describen proporcionaron información acerca de la carga microbiana inicial de los frutos, así como la carga de los distintos lotes a lo largo del tiempo de conservación.

Se tomaron 2 arándanos (superficie 10 cm²/arándano) que se homogeneizaron en 80 ml de agua de peptona 0,1% en Vibromatic durante 3 minutos a 520 rpm. Se realizaron diluciones seriadas en tubos de 9 ml de agua de peptona 0,1%. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para el análisis de mesófilos aerobios totales se realizó la siembra en superficie de 0,1 ml de inóculo de la dilución correspondiente en agar PCA (Plate Count Agar) (Figura 6). Se incubaron las placas a 30°C durante 24-48 horas.

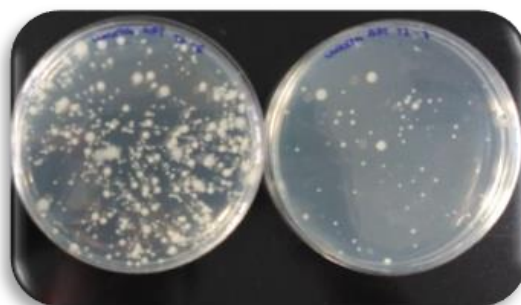


Figura 6. Crecimiento de AMT en agar PCA.

Para el análisis de mohos y levaduras se realizó la siembra en superficie de 0,1 ml de inóculo de la dilución correspondiente en agar DRBC (Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol) (Figura 7). Se incubaron las placas a 25°C durante 7 días.

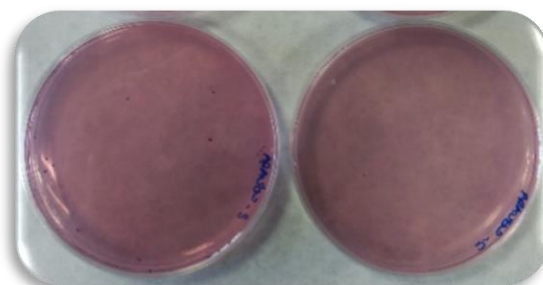


Figura 7. Crecimiento de mohos y levaduras en agar DRBC

5.3.2.2. Porcentaje de podredumbres

En cada punto de análisis se evaluaron visualmente los frutos para determinar el número de podredumbres fúngicas en el total de frutos del lote estudiado, expresando los resultados como porcentaje de estas.

5.3.2.3. Grado de deshidratación

El grado de deshidratación de los arándanos se determinó teniendo en cuenta la siguiente escala (Figura 8). Para expresar los resultados en el grado de deshidratación total de cada lote, se ponderó el porcentaje de frutos en cada grado de esta escala. La aceptabilidad del lote siguió el siguiente criterio establecido:

- Si el grado es ≤ 2 se considera aceptable.
- Si el grado se encuentra entre 2-2,5 será leve.
- Si el grado es $\geq 2,5$ será rechazado por deshidratación moderada a intensa



Figura 8. Escala de deshidratación de arándanos.

5.3.3. Calidad nutricional

Para la cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos, en primer lugar, se tiene que llevar a cabo la extracción de dichos compuestos. Esta etapa preliminar se realiza en varias fases como se explica en las Figuras 9 y 10. Primero, se extraen los compuestos fenólicos libres mediante intercambio de materia sólido-líquido hacia solventes orgánicos. A continuación, se recuperan del residuo de la primera extracción los compuestos fenólicos insolubles, aquellos conjugados con otras sustancias presentes en la muestra, mediante una metanólisis ácida, y finalmente se obtienen las proantocianidinas no extraíbles (NEPAs) del consiguiente pellet obtenido de la extracción anterior, mediante butanólisis ácida como se explicará más adelante.

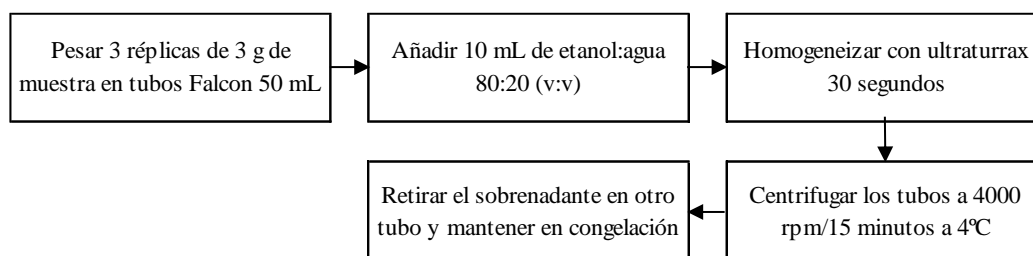


Figura 9. Proceso de extracción de los compuestos fenólicos libres

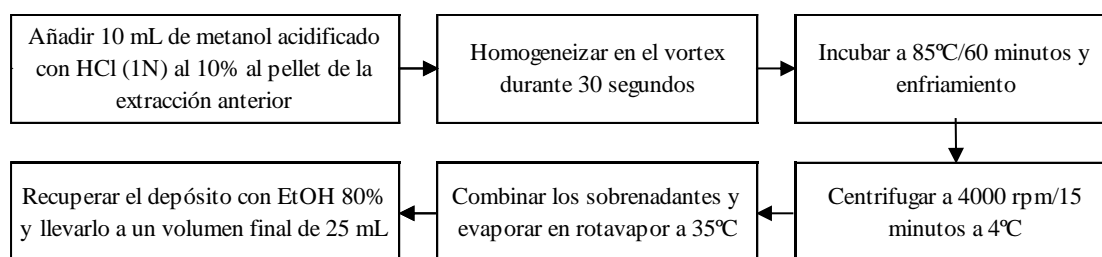


Figura 10. Proceso de extracción de los compuestos fenólicos ligados

A los extractos obtenidos en las dos primeras fases se les realiza una serie de ensayos que se detallan a continuación para cuantificar los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante que se correlaciona con estos compuestos.

5.3.3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales

El procedimiento para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales se modificó del método Folin-Ciocalteu originalmente descrito por Singleton y Rossi (1965). Se hizo reaccionar el reactivo de fosfomolibdato con los extractos a estudiar y carbonato de sodio. Tras 60 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó la absorbancia de la muestra a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Unicam; Waltham, USA). Los resultados se extrapolaron de la curva de calibrado y fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de peso seco.

5.3.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

El radical libre DPPH, posee un color morado, que vira hacia amarillo pálido por reacción con sustancias capaces de donar uno o varios átomos de hidrógeno, como son los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Esto permite medir la pérdida de absorbancia de la reacción, que está directamente relacionada con la cantidad de sustancias antioxidantes del fruto. Con este método se determinó la capacidad de estas sustancias para detener una de las fases más importantes del proceso oxidativo, la reacción de propagación en cadena provocada por los radicales libres.

El protocolo de trabajo se modificó del propuesto por Llorach et al. (2004). Se mezclaron 900 µl de los extractos fenólicos, en la correspondiente dilución, junto con 900 µl de solución de radical libre DPPH 133 mM. Se agitó la mezcla y se incubó durante dos horas y media en oscuridad para que se desarrollase totalmente el color y medir la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron en µmol Trolox/100 g de peso seco, previa calibración del ensayo con este compuesto por ser un análogo estructural de la vitamina E.

5.3.3.3. Antocianos totales

Para la determinación de estos pigmentos se seguirá la extracción descrita por Dekazos (1970). Para ello se trituraron 3 gramos de muestra, por triplicado, y se homogeneizaron con 10 mL MeOH acidificado al 1% con HCl 0,5 N y 0,1 g ácido ascórbico. Se maceraron los extractos en frío y agitación durante 5 minutos, se filtraron a vacío, y se re-extractaron tres veces con 5 mL MeOH acidificado. Finalmente, se enrasaron a 25 mL con MeOH acidificado.

Para determinar el máximo de absorción de los extractos se realizó un barrido espectrofotométrico, obteniendo un máximo de absorción a 525 nm, correspondiente a la longitud de onda donde mayor cantidad de luz adsorbe la cianidina 3-O-glucósido, que se tomó por lo tanto como antociano mayoritario en las muestras (PM = 449,2 g/mol; e = 29600 L/mol cm). El resultado se expresó en mg de equivalentes de cianidina 3-O-glucósido (CGE)/100 g peso seco a partir de la Ley de Beer-Lambert:

$$C \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{ABS * Pm \left(\frac{g}{mol} \right) * Vextracto (mL) * 100 * Fd}{e (L/molcm) * L * masa muestra (g)}$$

ABS: valor lectura de absorbancia de la muestra

Masa muestra: cantidad pesada para la extracción (g)

Fd: factor de dilución si procede

E: absortividad molar del compuesto (L/mol cm)

L: paso óptico (cm)

V extracción: volumen final empleado en la extracción (25 mL)

P.M.= peso molecular del compuesto (g/mol)

5.3.3.4.Extracción y cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPAs)

La extracción de estos compuestos se realizó por butanolisis ácida, incubando los pellets procedentes de la extracción de los compuestos fenólicos conjugados, explicada en el apartado 5.3.3, con butanol acidificado con ácido clorhídrico a 100°C durante 1h (Pérez y Saura, 2015). Se enrasaron las muestras a 25 mL y se midió la absorbancia a 530 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de cianidina (PM=340,5 g/mol; e=34700 L/mol cm) a partir de la ecuación de Beer-Lambert.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los prometedores resultados que se recogían en diversas publicaciones respecto al empleo de recubrimientos solos o combinados con diversos agentes antimicrobianos (Yang et al., 2014; Chiabrand y Giacalone, 2017; Mannozi et al., 2018) para aumentar la vida útil y la calidad de los arándanos conforme nuestra hipótesis de partida para plantear este estudio. Sin embargo, ya en la segunda semana de conservación se detectó que los arándanos recubiertos con quitosano o tratados con el extracto de lipopéptidos o con ambos no tenían la calidad mínima para ser comercializados, bien por su elevado grado de deshidratación o por la aparición de podredumbres. Como se puede observar en la Figura 11 la aplicación del recubrimiento aumentaba la deshidratación, es decir, ejercía el efecto contrario para el que en principio era aplicado.

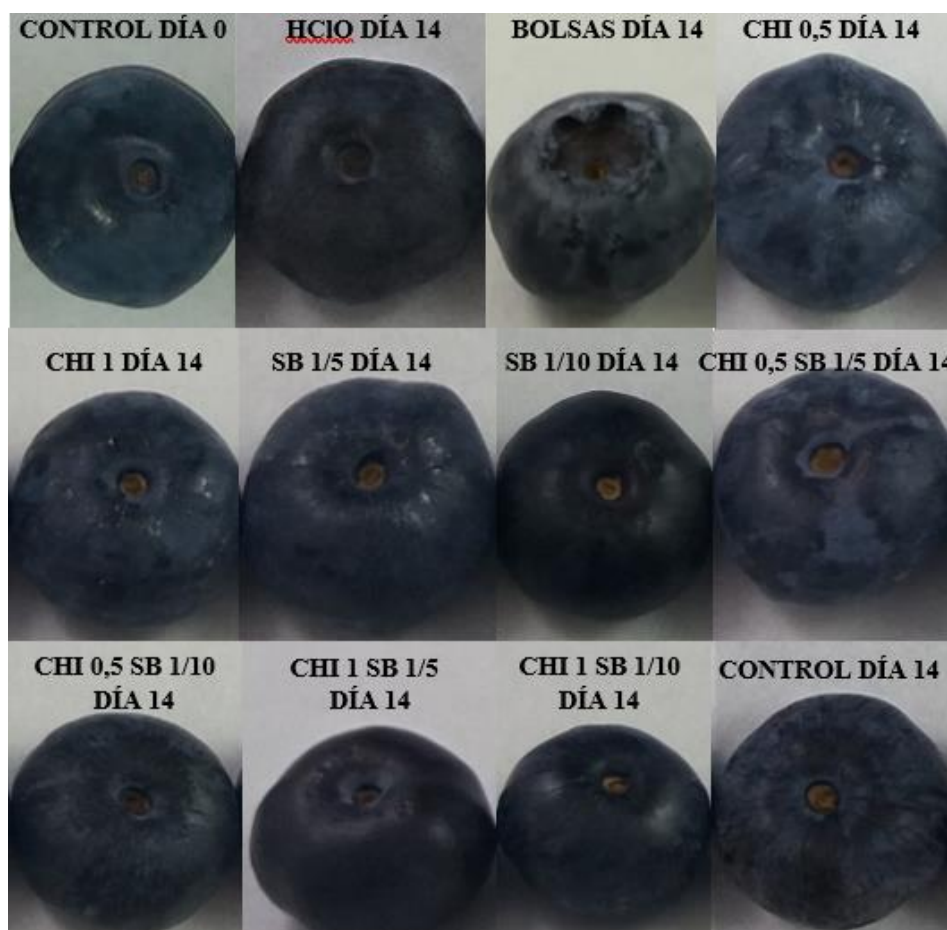


Figura 11. Aspecto de los distintos lotes de arándano conservados a 6°C. Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

Como se puede observar en la Figura 11 los lotes que recibieron algún tratamiento perdían la capa cerosa conocida como pruina. Esta cera cuticular está generalmente compuesta por una compleja mezcla de compuestos alifáticos de cadena larga (ácidos grasos, alcoholes, alcanos, aldehídos y cetonas) y compuestos cíclicos (triterpenos y esteroides). Esta capa es la primera barrera protectora frente a estreses abióticos y bióticos y juega un papel vital en limitar las pérdidas de agua que no se producen por las estomas y en prevenir la germinación de esporas fúngicas (Bernard y Joubès 2013; Samuels, Kunst y Jetter, 2008). Sin embargo, esta capa es muy vulnerable al daño mecánico y muy fácil de dañar durante la recolección, el envasado y el transporte ocasionando una apariencia no atractiva y dando la impresión de que la fruta está senescente o que es de poca calidad. Por tanto, cualquier tratamiento que elimine o disminuya la continuidad de esta capa estará perjudicando la calidad y vida útil de estos frutos (Chu et al., 2018). Así, en nuestro estudio hemos constatado que todos los tratamientos aplicados disminuyen esta capa en menor o mayor medida y que en ningún caso el efecto protector buscado con los recubrimientos o los extractos antifúngicos compensaban esta pérdida.

6.1. Pérdida de peso y grado de deshidratación

Como ya hemos comentado, una de las principales causas de la pérdida de calidad en arándanos es la pérdida de peso o deshidratación. En la Figura 12 se detallan los resultados de la pérdida de peso en los distintos lotes de arándanos conservados a 6°C.

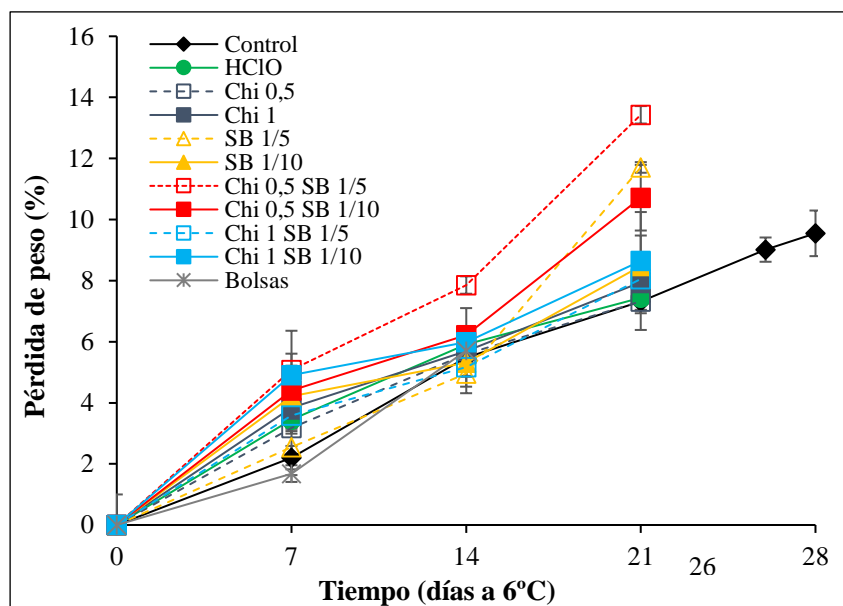


Figura 12. Pérdida de peso de los distintos lotes de arándano conservados a 6°C. Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con

quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

Si tenemos en cuenta la pérdida de peso para 21 días de almacenamiento a 6°C, el orden de mayor a menor pérdida de peso sería el siguiente: Chi 0,5 SB 1/5, SB 1/5, Chi 0,5 SB 1/10, Chi 1 SB 1/10, SB 1/10, Chi 1 SB 1/5, Chi 1, HClO, Chi 0,5 y Control. En conclusión, al aplicar un recubrimiento comestible de quitosano con sobrenadante BUZ-14 aumenta la pérdida de peso siendo el lote control el que menor pérdida de peso alcanzó.

Los arándanos se clasificaron en función del grado de deshidratación en base a la escala detallada en la Figura 8. Los resultados se expresaron en grado de deshidratación total de cada lote, ponderando el porcentaje de frutos correspondiente en cada grado de la escala.

En la Tabla 3 se recogen los resultados del grado de deshidratación de los distintos lotes estudiados. A los 14 días de conservación ninguno de los lotes superó el grado 2 de deshidratación obteniendo valores muy similares entre ellos. Sin embargo, en los 7 días siguientes el grado de deshidratación se duplica superando todos, excepto el lote control y el conservado en bolsas, el criterio de aceptabilidad (2-2,5 deshidratación leve). Así, teniendo en cuenta este criterio de aceptabilidad a partir del día 14 de análisis todos los lotes serían rechazados excepto el lote control y el envasado en bolsas de alta humedad.

Tabla 3. Grado de deshidratación de los distintos lotes de arándano conservados a 6°C

Tiempo (días)	Tratamiento *										
	Control	HClO	Chi 0,5	Chi 1	SB 1/5	SB 1/10	Chi 0,5 SB 1/5	Chi 0,5 SB 1/10	Chi 1 SB 1/5	Chi 1 SB 1/10	Bolsas
14	1,8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
21	2,3	3,5	3,4	3,9	3,7	3,4	2,7	3,2	2,7	3,1	2,2
26	3,3										
28	3,0										

*Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

6.2. Porcentaje de podredumbres

Junto a la deshidratación la aparición de podredumbre es el factor que limita la vida útil de los arándanos. Además, la aparición de un solo fruto con podredumbre en una bandeja es causa de rechazo y devolución del lote. En este trabajo no seguiremos este criterio y analizaremos los resultados analizando el porcentaje de frutos afectados de podredumbre en todas las bandejas (3 bandejas por lote y día de análisis).

En la Tabla 4 se detalla el porcentaje de podredumbres fúngicas obtenido para cada lote analizado. A los 7 días de conservación todos los lotes, excepto el control, presentaron podredumbres, entre 1 y 3% de los frutos dependiendo del lote. A los 14 días casi todos los lotes con tratamiento superan el 5% de frutos afectados. Únicamente los lotes recubiertos con quitosano al 1%, el control y el envasado en bolsas de alta humedad mantienen un porcentaje bajo de podredumbres, 3,3, 2,2 y 2,2, respectivamente. En el día 21 todos los lotes tratados superan el 10% de frutos afectados de podredumbre.

Tabla 4. Porcentaje de frutos afectados de podredumbre en los distintos lotes de arándanos conservados a 6°C

Tiempo (días)	Tratamiento*										
	Control	HClO	Chi 0,5	Chi 1	SB 1/5	SB 1/10	Chi 0,5 SB 1/5	Chi 0,5 SB 1/10	Chi 1 SB 1/5	Chi 1 SB 1/10	Bolsas
0	0										
7	0	2,2	1,1	1,1	2,2	2,2	1,1	3,3	2,2	2,2	2,2
14	2,2	6,7	5,6	7,8	7,8	12,2	5,6	6,3	3,3	3,3	2,2
21	1,1	12,2	10,8	10,0	9,4	10,0	11,7	14,2	12,5	8,6	
26	8,9										
28	7,8										

*Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

En los arándanos la alteración fúngica más habitual es la podredumbre gris por *B. cinerea*, y fue la que ocasionó el 100% de las lesiones en nuestros frutos (figura 13).



Figura 13. Arándanos afectados de podredumbre gris por *B. cinerea*

6.3. Influencia de los tratamientos en la calidad microbiológica

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos (mesófilos aerobios totales, mohos y levaduras) de los arándanos.

En los recuentos de aerobios mesófilos totales se observó una reducción del número

de bacterias en los siguientes lotes: Control, Chi 1, SB 1/5, SB 1/10, Chi 0,5 SB 1/5, Chi 0,5 SB 1/10, Chi 1 SB 1/5 y Chi 1 SB 1/10. Por el contrario, el recuento aumentó en los lotes HClO y Chi 0,5. En los mohos se observa una disminución en los siguientes lotes: Control y Chi 0,5. Por el contrario, el recuento aumentó en los lotes HClO, Chi 1, SB 1/5, SB 1/10, Chi 0,5 SB 1/5, Chi 0,5 SB 1/10, Chi 1 SB 1/5 y Chi 1 SB 1/10. Por último, el número de levaduras se redujo en todos los lotes salvo en el lote Chi 1 SB 1/10 que aumentó.

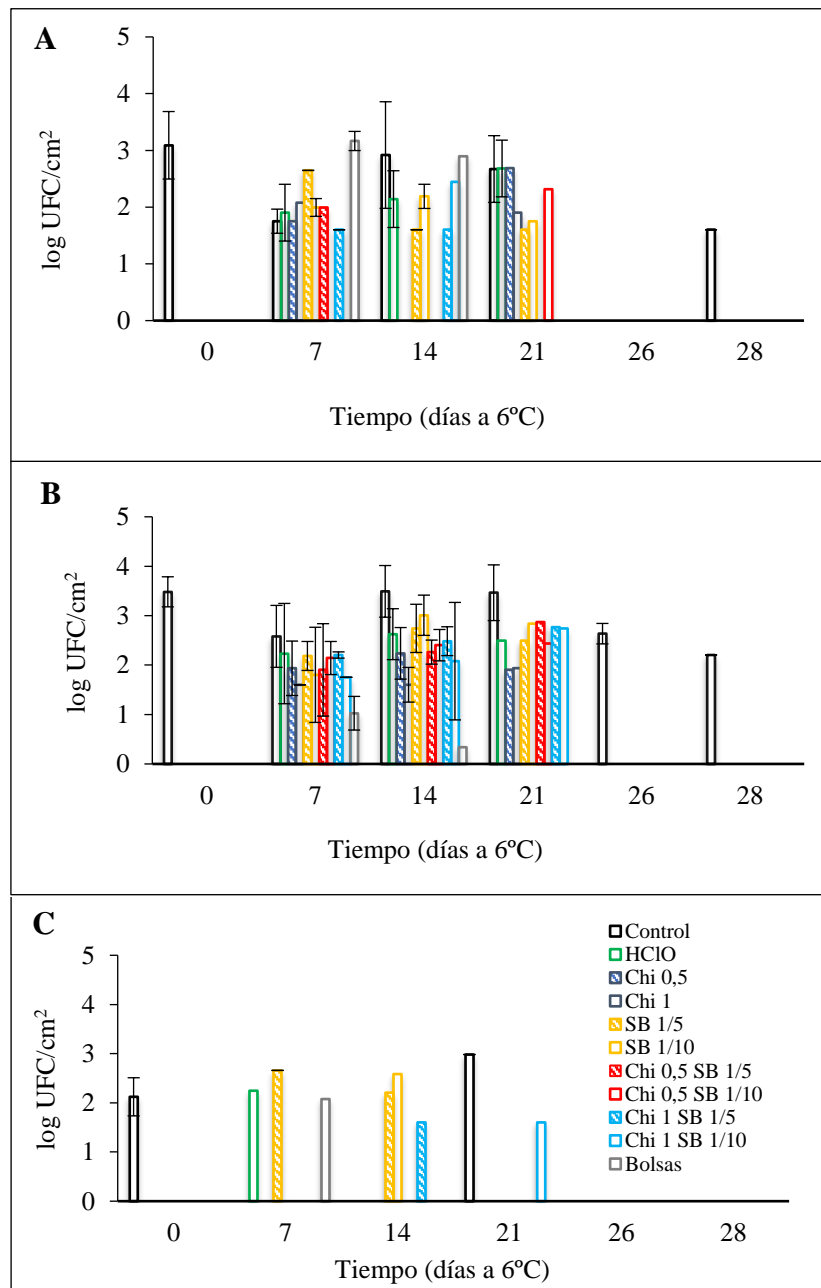


Figura 14. Recuentos microbiológicos en los arándanos conservados a 6°C. A) Aerobios mesófilos totales, B) Mohos y C) Levaduras. Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano

al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

6.4. Influencia de los tratamientos en la calidad físico-química

En la Tabla 5 se detallan los resultados de sólidos solubles totales (SST), pH, acidez total y color (coordenadas CIElab y variación de color) de los distintos lotes de arándano conservados a 6°C.

Tabla 5. Evolución de los sólidos solubles totales (SST), pH, acidez total, coordenadas de color (L* y b*) y variación de color (AE) en los distintos lotes de arándano conservados a 6°C

Tiempo (días)	Lotes*	SST (°Brix)	pH	Acidez total (g de cítrico/L)	L*	b*	AE
0	Control	11,5 ± 0,1	3,6 ± 0,0	12 ± 0,6	34,1 ± 1,6	-3,5 ± 0,6	
	Chi 0,5	-	-	-	33,4 ± 0,7	-3,2 ± 0,5	
	Chi 1	-	-	-	35,7 ± 1	-3,0 ± 1	
7	Control	12 ± 0,1	3,4 ± 0,0	9,3 ± 0,2	34,1 ± 1,6	-3,5 ± 0,6	
	HCIO	11,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2	11,4 ± 6,2	32,8 ± 1,3	-2 ± 0,6	2,0
	Chi 0,5	11,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1	9,8 ± 0,1	33,9 ± 1,7	-3,1 ± 0,3	0,5
	Chi 1	11,1 ± 0,2	3,5 ± 0,1	8,9 ± 0,3	34,2 ± 1,7	-3,5 ± 0,8	0,1
	SB 1/5	11,2 ± 0,1	3,2 ± 0,9	8,4 ± 0,9	31,2 ± 1,3	-1,9 ± 0,5	3,3
	SB 1/10	10,6 ± 0,1	3,0 ± 0,5	8 ± 0,3	31,6 ± 1,8	-2,4 ± 1,3	2,8
	Chi 0,5 SB 1/5	10,8 ± 0,1	3,6 ± 0,1	9 ± 0,3	31,2 ± 1,5	-3,5 ± 0,4	2,9
	Chi 0,5 SB 1/10	11,3 ± 0,1	3,7 ± 0,0	9 ± 0,2	32,7 ± 0,5	-2,3 ± 0,7	1,8
	Chi 1 SB 1/5	11,1 ± 0,1	3,6 ± 0,2	9 ± 0,7	32,2 ± 1,4	-2,6 ± 0,8	2,1
	Chi 1 SB 1/10	11 ± 0,1	3,5 ± 0,2	9,6 ± 0,3	33,5 ± 1,3	-2,7 ± 0,3	1,1
Bolsas	11 ± 0,1	3,9 ± 0,7	7,4 ± 1,9	32,6 ± 2,1	-3,6 ± 0,4	8,1	
14	Control	12,6 ± 0,1	3,2 ± 0,2	7,5 ± 0,4	34,4 ± 1,1	-3,8 ± 0,3	0,5
	HCIO	12,5 ± 0,0	3,9 ± 0,8	8 ± 0,6	34,9 ± 1,6	-2,5 ± 0,4	1,3
	Chi 0,5	11,7 ± 0,2	3,7 ± 0,7	8,2 ± 0,5	33,1 ± 1,3	-2,8 ± 1	1,2
	Chi 1	12,3 ± 0,3	3,0 ± 0,2	6,9 ± 0,3	35,0 ± 0,8	-3,3 ± 0,5	0,9
	SB 1/5	11,9 ± 0,3	3,0 ± 0,1	7 ± 0,2	32,1 ± 1,3	-2 ± 0,8	2,5
	SB 1/10	12,3 ± 0,1	3,8 ± 0,5	6,2 ± 0,3	31,2 ± 1,1	-1,8 ± 0,5	3,4
	Chi 0,5 SB 1/5	12,2 ± 0,1	3,7 ± 0,6	7,4 ± 0,7	35,7 ± 1,3	-3,2 ± 0,4	1,6
	Chi 0,5 SB 1/10	11,6 ± 0,1	3,6 ± 0,6	7,8 ± 0,4	33,6 ± 1,5	-2,3 ± 0,6	1,3
	Chi 1 SB 1/5	12,2 ± 0,2	3,7 ± 0,5	7,4 ± 0,3	33,1 ± 1,5	-2,8 ± 0,4	1,2
	Chi 1 SB 1/10	11,8 ± 0,2	3,4 ± 0,1	8,6 ± 0,2	34,3 ± 1,1	-2,2 ± 0,5	1,4
Bolsas	10,6 ± 0,1	3,9 ± 0,7	7,4 ± 1,9	33,3 ± 1,8	-4,2 ± 0,1	7,34	
21	Control	12,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	8,7 ± 0,6	33,2 ± 2,3	-3,2 ± 0,9	0,9
26	Control	12,5 ± 0,2	3,7 ± 0,0	9,5 ± 0,2	35,3 ± 1,9	-3,5 ± 0,9	1,1
28	Control	13,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1	9 ± 0,7	35,6 ± 1	-3,2 ± 1,3	1,6

* Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HCIO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

En lo referido a sólidos solubles totales (SST), tomando como referencia la muestra control del día 0 de análisis, el contenido en azúcares de los arándanos aumenta con el tiempo en todos los lotes, excepto en el caso de los arándanos conservados en bolsas de alta humedad (Bolsas), donde se aprecia una ligera reducción de los grados Brix. El lote control es el que mostró mayor variación, en el día 0 de análisis da 11,5°Brix, y a día 28 (fin de vida útil)

13,2°Brix. Por otro lado, el lote de menor variación (exceptuando “Bolsas”) fue Chi 0,5 SB 1/10 con 11,6°Brix al final de su vida útil (día 14).

Para analizar la variación del pH con el tiempo, se tomó como referencia la muestra control del día 0 (3,6) y se vio que disminuía con el tiempo, pero muy levemente. Los lotes que presentaron mayor variación fueron Chi 1 y SB 1/5, con un valor de 3,0 al final de su vida útil.

La acidez total titulable de los arándanos se expresa en ácido cítrico por ser éste el mayoritario. La acidez inicial fue de 12 g de cítrico/L, la cual disminuye a lo largo de la vida útil del fruto. El lote SB 1/10 muestra una mayor reducción en cuanto a la acidez, a tiempo 14 da un resultado de 6,2 g de cítrico/L. Por último, el lote control fue el de menor variación con una acidez de 9 g de cítrico/L al final de la vida útil del mismo.

A su vez, la Tabla 5 recoge las coordenadas CIElab y la variación del color de los distintos lotes conservados a 6°C. Ninguno de los valores difiere sustancialmente de los demás y la diferencia de color (AE) siempre es menor de 3 (excepto en bolsas) lo que quiere decir que las diferencias si las hubiere no son apreciables por el ojo humano. Tampoco se puede establecer una conclusión general sobre la influencia de los distintos tratamientos o de los recubrimientos. Este hecho sorprende ya que Chu et al. (2018) concluyen que la eliminación de la capa cerosa en los arándanos produce un descenso significativo de la coordenada L* y un aumento de b* indicando que la superficie del fruto se vuelve más oscuro y con un tono azul menos intenso.

En la Figura 15 se recogen los resultados del análisis de firmeza y elasticidad de los distintos lotes de arándano conservados a 6°C. Tomaremos el día 14 de análisis, donde mayores variaciones se detectan, como referencia para comparar los distintos lotes entre sí e intentar establecer una conclusión clara sobre la evolución de la firmeza y elasticidad.

La firmeza y la elasticidad aumentan en todos los lotes de arándanos, siendo el lote Chi 1 SB 1/5 el de mayor valor obtenido en cuanto a firmeza, y el lote Chi 1 en términos de elasticidad. Sin embargo, el lote Control fue en el que menos aumentó su firmeza y elasticidad a lo largo de la vida útil, seguido del lote HCIO. Esto puede ser debido a que en ambos lotes no se aplicó un recubrimiento comestible, el cual pudo influir en cierto modo en la elasticidad y firmeza de la piel de los arándanos.

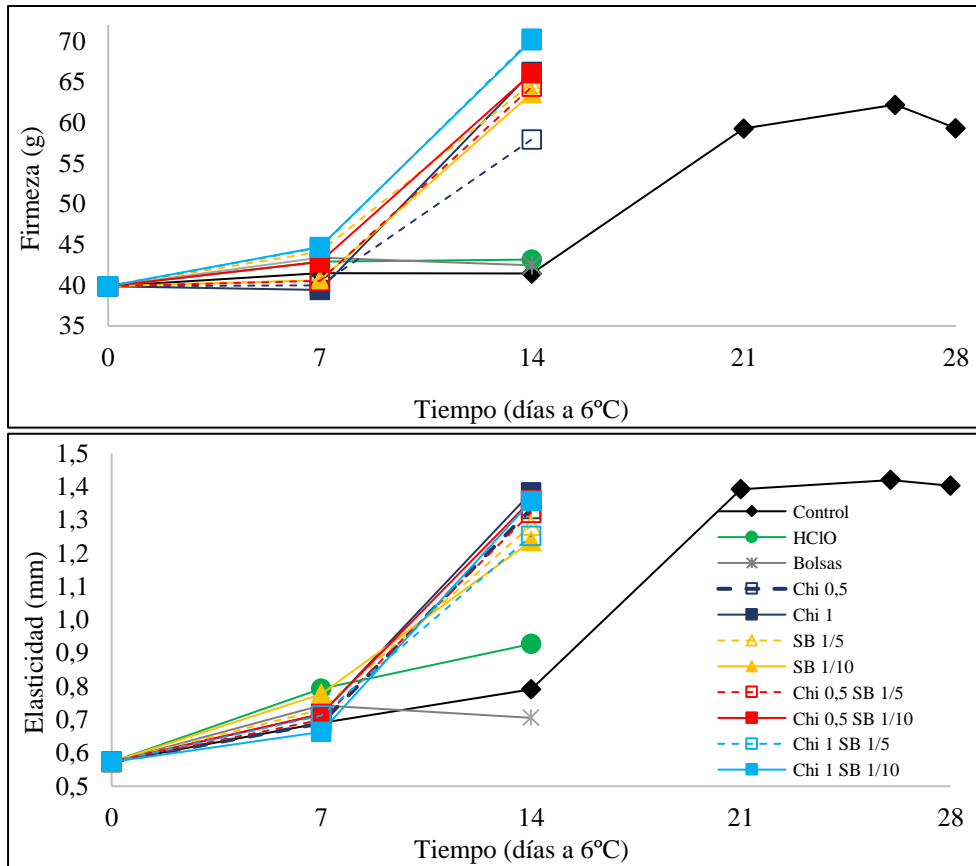


Figura 15. Evolución de la firmeza y la elasticidad en los distintos lotes de arándanos conservados a 6°C. Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

6.5. Análisis sensorial

En la Figura 16 se recogen los resultados de la evaluación sensorial, en la que se midieron una serie de atributos (aspecto general, presencia de defectos apreciables, intensidad del sabor característico, presencia de sabores anormales apreciables, jugosidad, dureza, acidez, amargor, astringencia y aceptación general) valorados de forma escalonada de 0 a 10.

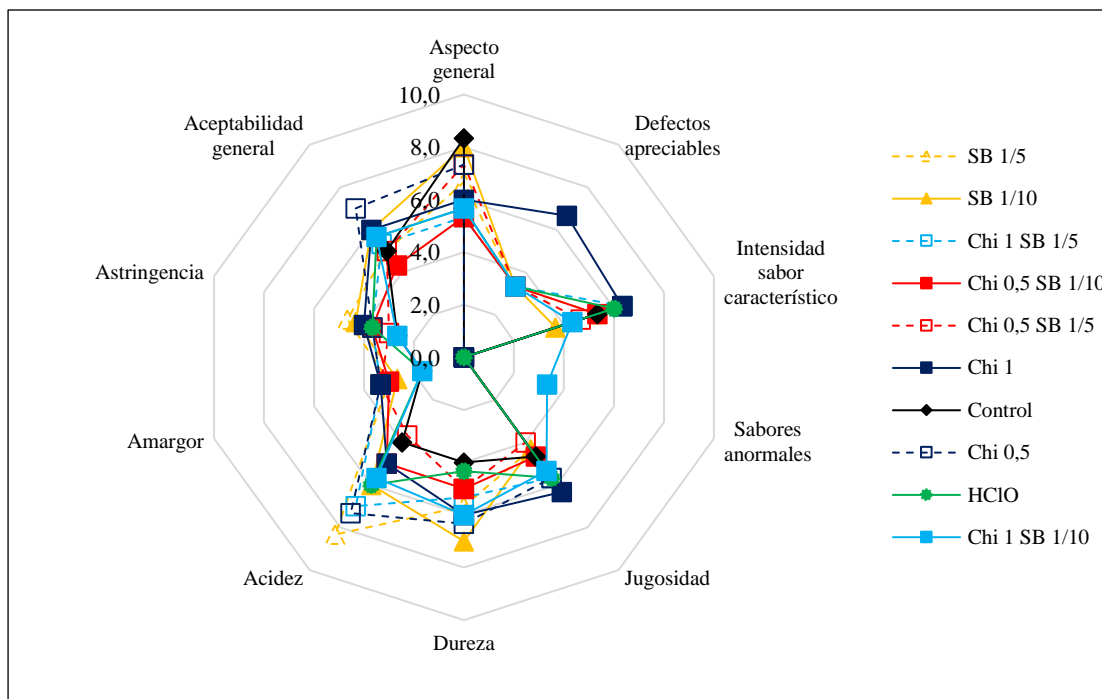


Figura 16. Análisis sensorial de los distintos lotes de arándano tras 14 días a 6°C. Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

Mediante la ayuda de tres catadores formados, se realizó la evaluación sensorial de los distintos lotes de arándanos conservados a 6°C en el día 14 de su vida útil, momento en el cual todos los lotes salvo el lote control ya no eran aptos para su comercialización.

La conclusión que se obtuvo del diagrama de araña fue la siguiente: Chi 1 mostró defectos apreciables y Chi SB 1/10 fue el único que tenía sabores anómalos. En cuanto al sabor, todos poseían el sabor característico del arándano fresco, siendo Chi 0,5 el de mayor aceptabilidad general. Predomina la acidez y la jugosidad en todos los lotes. Sin embargo, no predomina el amargor y la astringencia. Finalmente, el control mostró menor dureza que el resto, siendo SB 1/10 el de mayor firmeza.

6.6. Influencia de los tratamientos en la calidad nutricional

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos en las determinaciones de compuestos funcionales presentes en estos frutos, así como la capacidad antioxidante que se deriva de ellos. El contenido en compuestos fenólicos totales es similar al obtenido por Yang et al. (2014), y por norma general decrece con los tratamientos a lo largo de la conservación de los frutos. En los resultados obtenidos se observa que los antocianos son los flavonoides

mayoritarios presentes en los frutos rojos y que en este estudio se han obtenido concentraciones de estos compuestos muy por encima de las presentadas por Chiabrando y Giacalone (2017). Además, salvo en el caso de los tratamientos Chi 1 SB 1/5 y las bolsas de alta humedad, todos los tratamientos ensayados mantienen la estabilidad de estos compuestos.

La capacidad antioxidante de los extractos fenólicos obtenidos de los frutos también se mostró estable a durante el estudio, exceptuando las variaciones debidas a la composición de los propios frutos, más que a los tratamientos ensayados.

Tabla 6. Evolución de los compuestos funcionales en los arándanos conservados a 6°C

Tiempo	Tratamientos ^a	Fenoles Totales (mg EAG ^b /100 g p.s. ^c)	Antocianos totales (mg ECG ^d /100 g p.s.)	NEPAs (mg EC ^e /100 g p.s.)	Capacidad antioxidante (um ET ^f /100 g p.s.)
0	Control	1054,7 ± 38,2	1003,5 ± 25,4	46,9 ± 3,0	223,7 ± 42,9
7	Control	1212,9 ± 85,6	906,5 ± 10,2	75,6 ± 0,8	199,3 ± 94,5
	HClO	1489,3 ± 101,6	921,0 ± 15,4	75,2 ± 4,9	184,0 ± 5,8
	Chi 0,5	858,8 ± 34,6	979,5 ± 54,2	88,7 ± 6,7	289,9 ± 85,4
	Chi 1	848,6 ± 38,2	959,1 ± 39,9	53,2 ± 7,1	269,2 ± 131,3
	SB 1/5	626,4 ± 21,9	941,4 ± 22,4	20,0 ± 0,2	219,9 ± 34,5
	SB 1/10	751,3 ± 30,2	1070,8 ± 54,1	68,5 ± 0,7	193,5 ± 47,9
	Chi 0,5 SB 1/5	553,4 ± 116,0	684,6 ± 25,1	14,3 ± 1,2	474,6 ± 27,9
	Chi 0,5 SB 1/10	798,5 ± 14,1	920,6 ± 35,8	76,6 ± 1,2	266,0 ± 72,9
	Chi 1 SB 1/5	846,4 ± 31,1	998,9 ± 3,6	48,4 ± 0,5	137,1 ± 49,6
	Chi 1 SB 1/10	827,3 ± 5,9	754,0 ± 47,7	27,5 ± 2,4	312,7 ± 63,0
	Bolsas	789,6 ± 148,5	865,2 ± 21,1	84,5 ± 1,7	205,6 ± 27,0
	14	Control	833,2 ± 44,6	933,2 ± 61,9	84,2 ± 0,6
HClO		1160,6 ± 33,2	952,3 ± 32,1	75,4 ± 3,1	354,7 ± 64,3
Chi 0,5		886,3 ± 8,6	964,2 ± 56,4	27,4 ± 1,4	426,8 ± 28,6
Chi 1		784,1 ± 218,0	937,2 ± 19,3	59,7 ± 1,3	254,7 ± 44,2
SB 1/5		711,0 ± 66,7	966,7 ± 48,3	19,7 ± 0,2	452,4 ± 56,2
SB 1/10		867,8 ± 84,4	869,4 ± 45,8	29,0 ± 0,4	221,1 ± 91,2
Chi 0,5 SB 1/5		420,8 ± 121,5	973,3 ± 48,2	76,0 ± 5,1	165,6 ± 45,0
Chi 0,5 SB 1/10		686,0 ± 196,3	936,3 ± 51,0	82,7 ± 2,5	222,8 ± 36,8
Chi 1 SB 1/5		859,6 ± 202,9	595,5 ± 104,5	31,0 ± 2,2	276,5 ± 80,6
Chi 1 SB 1/10		825,9 ± 85,3	933,6 ± 36,9	34,7 ± 1,8	180,7 ± 69,1
Bolsas		879,6 ± 88,8	569,1 ± 50,2	76,7 ± 0,9	255,3 ± 69,1
28		Control	861,7 ± 132,3	710,3 ± 32,3	55,4 ± 11,6

^a Sin tratamiento: Control, Desinfectado con ácido hipocloroso: HClO, envasado en bolsas de alta humedad: Bolsas, recubierto con quitosano al 0,5%: Chi 0,5, recubierto con quitosano al 1%: Chi 1, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/5: SB 1/5, recubierto con extracto de lipopéptidos de BUZ-14 diluido 1/10: SB 1/10, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos al 1/5: Chi 0,5 SB 1/5, recubierto con quitosano al 0,5% y lipopéptidos 1/10: Chi 0,5 SB 1/10, recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/5: Chi 1 SB 1/5 y recubierto con quitosano al 1% y lipopéptidos 1/10: Chi 1 SB 1.

^bEAG: equivalentes de ácido gálico

^cp.s.: peso seco

^dECG: equivalentes de cianidina 3-O-glucosido

^eEC: equivalentes de catequina

^fET: equivalentes de Trolox

7. CONCLUSIONES

7.1. Conclusión general

Los prometedores resultados que se recogían en diversas publicaciones respecto al empleo de recubrimientos comestibles, solos o combinados con diversos agentes antimicrobianos, para aumentar la vida útil y la calidad de los arándanos no se han visto reproducidos en nuestro estudio. Durante la aplicación de los distintos tratamientos, recubrimientos con quitosano, solos o combinados con el extracto de lipopéptidos, o extractos solos, la capa cerosa de protección que recubre estos frutos, conocida como pruina, se pierde o se daña notablemente. Los arándanos tratados en el día 14 ya no tenían la calidad mínima para ser comercializados, bien por su elevado grado de deshidratación o por la aparición de podredumbres. Así, se constató que ni el recubrimiento con quitosano, ni los extractos antifúngicos ni ambos combinados consiguen compensar los efectos negativos de la pérdida de la capa cerosa.

7.2. General conclusion

The promising results reported in various publications regarding the use of edible coatings, alone or in combination with various antimicrobial agents, to increase the shelf life and quality of blueberries have not been reproduced in our study. During the application of the various treatments, coatings with chitosan, alone or combined with lipopeptide extract, or extracts alone, the waxy protective layer covering these fruits, known as the pruina, is lost or significantly damaged. The blueberries treated on day 14 no longer had the minimum quality to be marketed, either because of their high degree of dehydration or because of the appearance of rot. Thus, it was found that neither the chitosan coating, nor the antifungal extracts nor both combined are able to compensate for the negative effects of the loss of the waxy layer.

8. VALORACIÓN PERSONAL

El desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado ha sido una buena experiencia servida para adquirir competencias en el campo de la investigación, de manera que he alcanzado conocimiento sobre equipos y técnicas de análisis que hasta el momento desconocía, a los cuales se hace referencia a lo largo de la memoria.

Tanto el trabajo realizado en el laboratorio, como la búsqueda bibliográfica han sido muy gratificantes, ya que he desarrollado multitud de conocimientos adquiridos en asignaturas impartidas a lo largo del Grado (Análisis Microbiológico, Físico-Sensorial y Químico de los Alimentos, Microbiología e Higiene Alimentaria, Química y Bioquímica de los Alimentos, Bromatología, Tecnología de los Alimentos y Tecnología de Productos Vegetales).

Por último, resaltar las competencias adquiridas a la hora de trabajar en equipo, de la organización en función del tiempo disponible, y búsqueda bibliográfica para conocer información sobre el tema objeto de estudio y poder comparar y obtener conclusiones con los resultados analíticos de diversos estudios bibliográficos estudiados.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ahimou, F., Jacques, P., y Deleu, M. (2000). “Surfactin y iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity.” *Enzyme and Microbial Technology*, 27, pp. 749–754. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00295-7

Bernard, A., y Joubès, J. (2013). “Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation”. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 110–129.

Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., (2017). “Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases”. *Food Microbiology*, 63, 101-110.

Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., Venturini, M.E., (2019). “The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots”. *Food Microbiology*, 82, pp. 62-69. DOI: 10.1016/j.fm.2019.01.010

Chen, Y., Hung, Y. C., Chen, M., y Lin, H. (2017). “Effects of acidic electrolyzed oxidizing water on retarding cell wall degradation and delaying softening of blueberries during postharvest storage”. *LWT-Food Science and Technology*, 84, pp. 650-657. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.06.011

Chiabrando, V., y Giacalone, G. (2017). “Quality evaluation of blueberries coated with chitosan and sodium alginate during postharvest storage”. *International Food Research Journal*, 24 (4), 1553-1554.

Chu, W., Gao, H., Chen, H., Fang, X., Zheng, Y. (2018). “Effects of cuticular wax on the postharvest quality of blueberry fruit.” *Food Chemistry*, 239, 68-74.

Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) (2004). *Colorimetry*. Third edition.

Dekazos, E.D. (1970). “Quantitative determination of anthocyanin pigments during maturation and ripening of red tart cherries”. *Journal of Food Science* 35 (3). DOI: 10.1111/j.1365-2621.1970.tb12147.x

Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., y Shachnai, A. (1998). “Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus”. *Biological control*, 12(2), pp. 97-101. DOI: 10.1006/bcon.1998.0615

Duan, J., Wu, R., Strik, B. C., y Zhao, Y. (2011). “Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions”. *Postharvest Biology and Technology*, 59 (1), pp. 71-79. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.006

Fan, S., Li, C., Huang, W., y Chen, L. (2017). “Detection of blueberry internal bruising over time using NIR hyperspectral reflectance imaging with optimum wavelengths”. *Postharvest Biology and Technology*, pp. 134, 55-56. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.012

García, J.C., García, G. y Ciordia, M. (2007). *Situación actual del cultivo del arándano en el mundo*. Disponible en: <http://www.serida.org/pdfs/5566.pdf> [Consultado 03-06-2019].

García, J.C., García, G. y Ciordia, M. (2018). *El cultivo del arándano en el norte de España*. Disponible en:

<http://www.serida.org/pdfs/7452.pdf> [Consultado 03-06-2019].

Hernández, E. (2005). *Evaluación sensorial*. Centro Nacional de Medios para el aprendizaje. Colombia.

Hsieh, F.-C., Li, M.-C., Lin, T.-C., y Kao, S.-S. (2004). “Rapid detection y characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* y closely related species based on PCR.” *Current Microbiology*, 49, pp. 186–191. DOI: 10.1007/s00284-004-4314-7

Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M., y Kao, S.S. (2008). “Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A.” *Current Microbiology*, 56, pp. 1–5. DOI: 10.1007/s00284-007-9003-x

Lin, T.P., Chen, C.L., Chang, L.K., Tschen, J.S.M., y Liu, S.T. (1999).” Functional y transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*.” *Journal of Bacteriology*, 181, pp. 5060–5067.

Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., y Terry, L. A. (2014). “Berry antioxidants: small fruits providing large benefits”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (5), 825-833.

Mannozi, C., Tylewicz, U., Chinnici, F., Siroli, L., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., y Romani, S. (2018). “Effects of chitosan based coatings enriched with procyanidin by-product on quality of fresh blueberries during storage”. *Food chemistry*, 251, 18-19.

Mitcham, E.J., Crisosto, C.H., y Kader, A.A. (1998). “Bushberries: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality”. Postharvest Facts Sheets. Universidad de Davis.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., y Thonart, P. (2007). “Surfactin y fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants.” *Environmental Microbiology*, 9, pp. 1084–1090. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x

Pérez-Jiménez, J., y Saura-Calixto, F. (2015). “Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries”. *Food Research International*, 74, pp. 315-323. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.007

Pinedo, S.K. (2018). “*Caracterización fisicoquímica y organoléptica de variedades comerciales de arándanos y otras especies del género Vaccinium*”. Tesis. Universidad nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Sandoval, L.D.P. (2018). *Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento en la pérdida de peso, contenido antocianinas y capacidad antioxidante de arándano azul (Vaccinium corymbosum L.) variedad Biloxi*. Tesis de grado. Universidad César Vallejo. Disponible en:

http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/27176/sandoval_qll.pdf?sequence=4&isAllowed=y [Consultado 03-06-2019]

Samuels, L., Kunst, L., y Jetter, R. (2008). “Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells”. *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp. 683–707.

- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents". *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), pp. 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent". In *Methods in enzymology*. Academic press. 299, pp. 152-178. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Tezotto-Uliana, J. V., Fargoni, G. P., Geerdink, G. M., y Kluge, R. A. (2014). "Chitosan applications pre-or postharvest prolong raspberry shelf-life quality". *Postharvest Biology and Technology*, 91, pp. 72-77. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.12.023
- Tournas, V. H., y Katsoudas, E. (2005). "Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits". *International journal of Food microbiology*, 105(1), pp. 11-17. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002
- Umagiliyage, A. L., Becerra-Mora, N., Kohli, P., Fisher, D. J., y Choudhary, R. (2017). "Antimicrobial efficacy of liposomes containing d-limonene and its effect on the storage life of blueberries". *Postharvest Biology and Technology*, 128, 130-131.
- USDA (2019). USDA. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171711/nutrients> [Consultado 03-06-2019].
- Vázquez, S., Guillén, R., Jaramillo, S., Jiménez, A. y Rodríguez, R. (2009). *Funcionalidad de distintas variedades de arándanos*. Disponible en: <https://previa.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-P25T.pdf>
- Vieira, J. M., Flores-López, M. L., de Rodríguez, D. J., Sousa, M. C., Vicente, A. A., y Martins, J. T. (2016). "Effect of chitosan–Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit". *Postharvest Biology and Technology*, 116, pp. 88-89. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.01.011
- Xu, F., y Liu, S. (2017). "Control of Postharvest Quality in Blueberry Fruit by Combined 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and UV-C Irradiation". *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), pp. 1695-1696. DOI: 10.1007/s11947-017-1935-y
- Yang, G., Yue, J., Gong, X., Qian, B., Wang, H., Deng, Y., y Zhao, Y. (2014). "Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries". *Postharvest Biology and Technology*, 92, pp. 46-53. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.01.018
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., y Bertagnolli, B.L. (2002). "Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*". *Soil Biology and Biochemistry*, 34, pp. 955–963. DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00027-5