



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL
LACTOSUERO SOBRE *Penicillium* sp. EN AREPAS DE
MAÍZ Y DE YUCA**

Luisa Fernanda Navarrete Osorio

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2023

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL LACTOSUERO SOBRE *Penicillium* sp. EN AREPAS DE MAÍZ Y DE YUCA

Luisa Fernanda Navarrete Osorio

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias-Microbiología

Director (a):

PhD. Sonia Amparo Ospina Sánchez

Codirector:

PhD. Carlos Mario Zuluaga Domínguez

Línea de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Grupo de Investigación:

Biopolímeros y Biofuncionales

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2023

*A Dios y a mis padres por estar conmigo
en los buenos y malos momentos, por su amor,
comprensión y apoyo incondicional; todos mis
triumfos son y serán siempre para ellos.*

*“Ama lo que haces”
Steve Jobs*

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas de Don Maíz S.A.S que permitieron que este proyecto se llevara a cabo, principalmente a Miguel Valderrama, por su apoyo y colaboración constante en la presente investigación, por darme el tiempo y el espacio requerido para la ejecución de la mayoría de las pruebas, así como la adquisición de los recursos necesarios para culminar con éxito la presente investigación. A los profesores Sonia Ospina y Carlos Zuluaga, por su comprensión y apoyo constante a lo largo de toda la investigación; al profesor Daniel Uribe por sus consejos y su ayuda durante mi cambio de proyecto y a la profesora Ibonne García por su apoyo durante las pruebas de liofilización ejecutadas.

Agradezco también a Danna García y a Margelly Bastidas por sacarme sonrisas y hacer más amenos los días pesados en el laboratorio; a todas las personas del IBUN que de alguna manera me apoyaron durante la ejecución de mis pruebas.

Resumen

Título en español: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DEL LACTOSUERO SOBRE *Penicillium* sp. EN AREPAS DE MAÍZ Y DE YUCA.

Las arepas son productos que se obtienen a partir de la masa de maíz blanca, amarilla o mezcla de ambas previamente cocida, mezclada con otros ingredientes como sal, queso entre otros, posteriormente asadas o horneadas; una de las principales limitantes en su producción y comercialización es la contaminación con mohos, antes del final de su vida útil; por lo que se han evaluado soluciones como el uso de nuevos conservantes. En este contexto, estudios encaminados al aprovechamiento del lactosuero, que es un subproducto proveniente de la elaboración de quesos, demuestran que puede funcionar como conservante natural si es hidrolizado con proteasas, puesto que, algunos péptidos provenientes de esta hidrólisis se asocian con un efecto antimicrobiano y antifúngico. Por tal motivo, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial antifúngico del lactosuero WPC 80 pretratado mediante hidrólisis con proteasas, sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca; para tal propósito, el lactosuero WPC 80 fue hidrolizado con cinco tipos de proteasas comerciales (Formea®, Alcalase®, Protamex®, Papaína y Tripsina de páncreas bovino) determinando su efecto antifúngico en medio de cultivo y en arepas de maíz y yuca, analizando a su vez el impacto de su uso en las características sensoriales (sabor y acidez) y fisicoquímicas (Porcentaje de humedad y pH) de estos productos; obteniendo finalmente como resultado que, de todos los hidrolizados evaluados el hidrolizado con tripsina presentó efecto antifúngico, siendo este mucho menor al efecto del ácido sórbico pero similar al del propionato de calcio. De su aplicación en arepas de maíz y yuca, se evidenció que su mezcla con ácido sórbico ambos a 500 ppm, limitaba el crecimiento de mohos tanto en refrigeración como en un ambiente con variación de temperatura y humedad relativa, logrando alcanzar una vida útil igual o superior a la exhibida por arepas con mezcla de conservantes (ácido sórbico 874 ppm y propionato de calcio 499 ppm) y con sólo ácido sórbico a 500 ppm, además el uso de este hidrolizado no produjo impacto negativo en las características fisicoquímicas y sensoriales analizadas. En conclusión, el hidrolizado del lactosuero WPC 80 con tripsina, es una opción para incrementar la vida útil de arepas que contienen ácido sórbico como conservante, en especial si se requiere un producto que se pueda almacenar fuera de nevera y con bajas concentraciones de conservantes sintéticos.

Palabras clave: efecto antifúngico, lactosuero, *Penicillium*, arepa de maíz y yuca.

Abstract

Título en inglés: ASSESSMENT OF THE ANTIFUNGAL EFFECT OF WHEY ON *Penicillium* sp. IN CORN AND CASSAVA AREPAS.

Arepas are products made from the dough of white corn, yellow corn, or a combination of both, previously cooked and mixed with other ingredients such as salt, cheese, among others, and then baked or grilled. One of the main limitations in their production and commercialization is mold contamination before the end of their shelf life. Therefore, solutions such as the use of new preservatives have been evaluated. In this context, studies aimed at the utilization of whey, a byproduct of cheese production, demonstrate that it can function as a natural preservative when hydrolyzed with proteases, since some peptides resulting from this hydrolysis are associated with antimicrobial and antifungal effects. For this reason, the objective of this research was to evaluate the antifungal potential of pre-treated whey protein concentrate (WPC) 80 through hydrolysis with proteases against *Penicillium* sp. in corn and cassava arepas. For this purpose, WPC 80 was hydrolyzed with five types of commercial proteases (Formea®, Alcalase®, Protamex®, Papain, and bovine pancreatic Trypsin), determining their antifungal effect in culture media and in corn and cassava arepas. The impact of its use on the sensory characteristics (flavor and acidity) and physicochemical properties (moisture content and pH) of these products was also analyzed. The results showed that, among all the hydrolysates evaluated, the hydrolysate with Trypsin presented an antifungal effect, which was much lower than the effect of sorbic acid but similar to that of calcium propionate. When applied to corn and cassava arepas, it was observed that the combination of the hydrolysate with Trypsin and sorbic acid, both at 500 ppm, inhibited mold growth both under refrigeration and in an environment with temperature and relative humidity variations, achieving a shelf life equal to or greater than that exhibited by arepas with a mixture of preservatives (sorbic acid 874 ppm and calcium propionate 499 ppm) and arepas with sorbic acid alone at 500 ppm. Furthermore, the use of this hydrolysate did not have a negative impact on the analyzed physicochemical and sensory characteristics. In conclusion, the hydrolysate of WPC 80 with Trypsin is an option to extend the shelf life of arepas containing sorbic acid as a preservative, especially if a product that can be stored outside the refrigerator and without high concentrations of synthetic preservatives is required.

Keywords: antifungal effect, whey, *Penicillium*, corn and cassava arepa.

CONTENIDO

Introducción.....	14
1. Marco teórico	17
1.1 Breve historia de la arepa	17
1.2. Definición y características de las arepas.....	18
1.3. Retos en el mercado nacional e internacional de las arepas	20
1.4. Estrategias de conservación para la extensión de la vida útil de los alimentos tipo panadería.....	21
1.5. Estrategias de conservación en arepas.....	23
1.5.1. Estrategia de extensión de vida útil en arepas: conservantes tradicionales y biopreservantes	24
1.5.2. Estrategias de extensión de vida útil en arepas: tecnologías de empaque	36
1.6. Mohos predominantes en productos a base de maíz y arepas.....	37
1.6.1. Caracterización del género <i>Penicillium</i> sp.	37
1.6.2. Factores abióticos óptimos de crecimiento para <i>Penicillium</i> sp.....	40
1.6.3. Patogenicidad de <i>Penicillium</i> sp. en alimentos	41
1.7. Caracterización del lactosuero.....	42
1.7.1. Péptidos bioactivos del lactosuero para extensión de vida útil en alimentos	44
2. Problema de investigación y objetivos.....	48
2.1. Planteamiento del problema.....	48
2.2. Objetivos	49
2.1.1. Objetivo general	49
2.1.2. Objetivos específicos	49
2.3. Hipótesis	49
3. Metodología.....	50
3.1. Materiales y reactivos	50
3.2. Activación de la cepa	50
3.3. Hidrólisis enzimática del lactosuero	51
3.4. Evaluación de la actividad antifúngica en medio de cultivo.....	52
3.5. Análisis estadístico para selección del hidrolizado	54
3.6. Evaluación del impacto en vida útil del lactosuero hidrolizado seleccionado en arepas de maíz y de yuca	54
3.7. Análisis estadístico para determinación del impacto en vida útil.....	56
3.8. Evaluación de la actividad antifúngica mediante inoculación directa de las arepas de maíz y de yuca	57
4. Resultados y discusión.....	59
4.1. Activación de la cepa	59

4.2.	Evaluación de la actividad antifúngica en medio de cultivo.....	60
4.3.	Evaluación del impacto en vida útil del lactosuero hidrolizado seleccionado en arepas de maíz y de yuca	72
4.4.	Evaluación de la actividad antifúngica mediante inoculación directa de las arepas de maíz y de yuca	97
5.	<i>Conclusiones</i>	101
6.	<i>Recomendaciones</i>	102
7.	<i>Anexos</i>	103
8.	<i>Bibliografía</i>	115

Listado de Figuras

	Pág.
Figura 1. Evidencia de especies que contaminan productos horneados en vida útil.	22
Figura 2. Actividad de agua y procesos en alimentos.	24
Figura 3. Tipos de fiálides en el género <i>Penicillium</i> .	38
Figura 4. Tipos de conidióforos en el género <i>Penicillium</i> .	39
Figura 5. Partes del conidióforo en el género <i>Penicillium</i> .	39
Figura 6. Características macroscópicas de colonias de <i>Penicillium</i> .	40
Figura 7. Montaje de microcultivo.	51
Figura 8. Ejemplo del Formulario de panel sensorial empleado.	58
Figura 9. Conidióforo de la cepa de estudio comparada con imagen de literatura (conidióforo monoverticilado visto previamente en Figura 4).	59
Figura 10. Apariencia macroscópica de la cepa en medio PDA.	59
Figura 11. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día dos de seguimiento.	70
Figura 12. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día once de seguimiento.	71
Figura 13. Evidencia fotográfica de porcentajes de muestras con moho en arepas de maíz en cuarto ambiente y refrigeración.	75
Figura 14. Evidencia fotográfica de arepas de maíz al final de los 50 días de seguimiento en refrigeración.	76
Figura 15. Evidencia fotográfica de arepas de maíz al final de los 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.	76
Figura 16. Evidencia fotográfica de porcentajes de muestras con moho en arepas de yuca en cuarto ambiente y refrigeración.	79
Figura 17. Evidencia fotográfica de arepas de yuca al final de los 50 días de seguimiento en refrigeración.	78
Figura 18. Evidencia fotográfica de arepas de yuca al final de los 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.	80
Figura 19. Resultados de prueba de inoculación directa en arepas de maíz al final del seguimiento.	97
Figura 20. Resultados de prueba de inoculación directa en arepas de yuca al final del seguimiento.	98

Listado de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Características microbiológicas según NTC 5372.	19
Tabla 2. Criterios microbiológicos según Resolución 1407 de 2022.	19
Tabla 3. Características fisicoquímicas según NTC 5372.	19
Tabla 4. Cantidades máximas de los conservantes admitidos en alimentos según la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social.	24
Tabla 5. Clasificación de algunos conservantes empleados para alimentos.	25
Tabla 6. Factores implicados en la degradación del ácido sórbico.	27
Tabla 7. Acidulantes, descripción y usos en la industria de alimentos.	31
Tabla 8. Productos comerciales con bacteriocinas empleados en la industria de alimentos	34
Tabla 9. Condiciones de crecimiento de algunas especies del género <i>Penicillium</i> .	40
Tabla 10. Micotoxinas producidas por <i>Penicillium</i> frecuentemente encontradas en alimentos.	41
Tabla 11. Micotoxinas en alimentos y su efecto en salud.	42
Tabla 12. Composición nutricional de ambos tipos de lactosuero	43
Tabla 13. Tratamientos de hidrólisis enzimática evaluados.	51
Tabla 14. Diseño experimental para evaluación de actividad antifúngica.	53
Tabla 15. Listado de ingredientes empleados en las formulaciones de arepas de maíz y de yuca.	56
Tabla 16. Diámetro promedio por día en cada tratamiento evaluado.	63
Tabla 17. Análisis fisicoquímico del lactosuero WPC 80 empleado, ISO Chill®8010; declarado en la ficha técnica del producto.	63
Tabla 18. Resultados del cálculo de Inhibición de Crecimiento Micelial (MGI).	64
Tabla 19. Resultados de ANOVA para diámetro de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. al día dos de seguimiento.	66
Tabla 20. Resultados de ANOVA para diámetro de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. al día once de seguimiento.	66
Tabla 21. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de Tukey del Diámetro de crecimiento para el día dos de seguimiento.	69
Tabla 22. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de Tukey del Diámetro de crecimiento para el día once de seguimiento.	69
Tabla 23. Resumen de resultados de vida útil en todas las formulaciones evaluadas	82
Tabla 24. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de maíz en refrigeración	85
Tabla 25. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de maíz en cuarto ambiente.	85
Tabla 26. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de maíz en refrigeración.	86

Tabla 27. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de maíz en cuarto ambiente.	86
Tabla 28. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de yuca en refrigeración.	88
Tabla 29. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de yuca en cuarto ambiente.	88
Tabla 30. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de yuca en refrigeración.	90
Tabla 31. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de yuca en cuarto ambiente.	90
Tabla 32. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de maíz al inicio del tiempo de seguimiento.	93
Tabla 33. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de maíz a la mitad del tiempo de seguimiento.	93
Tabla 34. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de maíz al final del tiempo de seguimiento	93
Tabla 35. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de maíz al inicio del tiempo de seguimiento.	94
Tabla 36. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de maíz a la mitad del tiempo de seguimiento.	94
Tabla 37. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de maíz al final del tiempo de seguimiento.	94
Tabla 38. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de yuca al inicio del tiempo de seguimiento.	95
Tabla 39. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de yuca a la mitad del tiempo de seguimiento.	95
Tabla 40. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de yuca al final del tiempo de seguimiento.	95
Tabla 41. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de yuca al inicio del tiempo de seguimiento.	96
Tabla 42. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de yuca a la mitad del tiempo de seguimiento.	96
Tabla 43. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de yuca al final del tiempo de seguimiento.	96
Tabla 44. Resultados de vida útil y de porcentaje de contaminación con mohos en prueba de inoculación directa	98

Listado de Gráficas

	Pág.
Gráfica 1. Efecto antifúngico en medio de cultivo de los hidrolizados y conservantes tradicionales evaluados sobre <i>Penicillium</i> sp.	62
Gráfica 2. Promedio de Inhibición de crecimiento micelial por tratamiento.	65
Gráfica 3. Boxplot del Diámetro de crecimiento para el día dos de seguimiento.	66
Gráfica 4. Boxplot del Diámetro de crecimiento para el día once de seguimiento.	67
Gráfica 5. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día dos de seguimiento.	71
Gráfica 6. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día once de seguimiento.	72
Gráfica 7. Resultados del seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de maíz con moho durante 50 días de seguimiento en refrigeración.	74
Gráfica 8. Resultados del seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de maíz con moho durante 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.	75
Gráfica 9. Resultados de seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de yuca con moho durante 50 días de seguimiento en refrigeración.	78
Gráfica 10. Resultados de seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de yuca con moho durante 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.	78
Gráfica 11. Condiciones de pH y humedad relativa en cuarto ambiente.	81
Gráfica 12. Condiciones de pH y humedad relativa en cuarto refrigeración.	81
Gráfica 13. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en refrigeración.	84
Gráfica 14. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en cuarto ambiente.	84
Gráfica 15. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en refrigeración.	86
Gráfica 16. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en cuarto ambiente.	86
Gráfica 17. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en refrigeración.	89
Gráfica 18. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en cuarto ambiente.	89
Gráfica 19. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en refrigeración.	91
Gráfica 20. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en cuarto ambiente.	91
Gráfica 21. Resultados de inoculación directa de <i>Penicillium</i> sp. en arepas de maíz.	99
Gráfica 22. Resultados de inoculación directa de <i>Penicillium</i> sp. en arepas de yuca.	99

Listado de Anexos

	Pág.
Figura A1. Resultados de Minitab 17 para ANOVA del diámetro de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. al día dos de seguimiento.	103
Figura A2. Resultados de Minitab 17 para ANOVA del diámetro de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. al día once de seguimiento.	104
Figura A3. Resultados de Minitab 17 para método de Tukey del diámetro de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. al día dos de seguimiento.	105
Figura A4. Resultados de Minitab 17 para método de Tukey del diámetro de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. al día once de seguimiento.	105
Figura A5. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de maíz en refrigeración.	106
Figura A6. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de maíz en cuarto ambiente.	106
Figura A7. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de maíz en refrigeración.	107
Figura A8. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de maíz en cuarto ambiente.	107
Figura A9. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de yuca en refrigeración.	108
Figura A10. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de yuca en cuarto ambiente	108
Figura A11. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de yuca en refrigeración.	109
Figura A12. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de yuca en cuarto ambiente.	109
Figura A13. Resumen de resultados fisicoquímicos obtenidos en arepas de maíz	110
Figura A14. Resumen de resultados fisicoquímicos obtenidos en arepas de yuca.	110
Figura A15. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de maíz en cuanto a sabor.	111
Figura A16. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de maíz en cuanto a acidez.	112
Figura A17. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de yuca en cuanto a sabor.	113
Figura A18. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de yuca en cuanto a acidez.	114

Introducción

La arepa es un alimento tradicional en Colombia elaborado a base de maíz que se consume con frecuencia en todo el territorio nacional, principalmente durante el desayuno. Según las estadísticas de Nielsen, el 73% de los colombianos incluye una arepa en su primer alimento del día, aunque también es común en el almuerzo y la cena, lo que la convierte en un elemento importante en la dieta de los colombianos (Quintero, 2018). Desde el punto de vista económico, el mercado de las arepas en Colombia está valorado en \$448.000 millones de pesos anuales, con una penetración del 80% en hogares. Las regiones de mayor consumo son Antioquia, con el 64%, y Bogotá, con el 18% (C. Gómez, 2021).

Al igual que otros productos a base de cereales, la calidad de este producto se ve afectada por la aparición de hongos, que hacen que la vida útil del mismo sea corta, lo que dificulta su distribución y trae como consecuencia una alta incidencia de devoluciones del producto, una problemática de gran relevancia para las empresas productoras al implicar millonarias pérdidas. Existen diferentes causales por las cuales se produce la contaminación de las arepas con hongos, entre ellas se destaca la alta actividad de agua y humedad del producto (NTC 5372: Arepas de Maíz Refrigeradas. Especificaciones de Producto., 2007), la contaminación cruzada durante el proceso productivo, teniendo en cuenta que las materias primas como el maíz y el queso empleados para su elaboración también se ven afectadas por la contaminación con mohos (A. Gómez, 2007; González-Forte et al., 2019). De igual forma, es un alimento que requiere por lo general refrigeración, por lo que la pérdida de la cadena de frío se considera otra causal de relevancia, siendo este problema frecuente cuando el producto se distribuye en tiendas o mercados pequeños cuya infraestructura no garantiza que esta cadena se mantenga, bien sea por ausencia de control térmico en los refrigeradores, fallas técnicas o mal uso de estos equipos (Corpas & Tapasco, 2012, 2013).

Actualmente, la extensión de la vida útil de los alimentos perecederos como las arepas es un reto de alta prioridad para la industria de alimentos, por la retribución económica que conlleva en relación a un ahorro en los costos implícitos en la logística de distribución, y por la posibilidad de expandir estos productos en el mercado internacional, teniendo en cuenta que las arepas al igual que otros productos del sector agroindustrial, a la fecha tienen una vida útil corta considerando que tienen como principal forma de transporte la vía marítima (participación del 61,7% al 2013), y los principales países destino son por ejemplo Estados Unidos, Perú y Puerto Rico; el tiempo de transporte por esta vía oscila entre los 4 y 15 días (ProColombia, 2014), sumado al tiempo que se demora en su distribución desde los puertos a los puntos de venta, lo que implica que lleguen productos con fecha corta a los anaqueles y hace que sean poco atractivos para la inversión extranjera. En torno a dichos intereses se han evaluado en los últimos años estrategias para la extensión de la vida útil de los alimentos perecederos, muchas de ellas mediante la aplicación de aditivos que contrarrestan principalmente la contaminación microbiana

del producto, o nuevas tecnologías de empaque que permiten controlar la atmósfera en contacto con el alimento (Qian et al., 2021a).

Adicional a los problemas económicos que conlleva la contaminación de las arepas por mohos, existen otros problemas asociados principalmente ambientales y de salud pública; los problemas ambientales se derivan del desperdicio del producto contaminado tanto en los puntos de venta como en los hogares, lo que aumenta la cifra de desperdicio de alimentos en Colombia, que según el Departamento de Planeación Nacional (DNP) equivale a 3,5 millones de toneladas al año, lo que representa un 12,3% de la oferta nacional disponible de alimentos; una cifra que debe reducirse a la mitad en aras de cumplir con la meta Objetivo de Desarrollo Sostenible 12.3, correspondiente a la reducción del desperdicio y pérdida de alimentos. Por otro lado, la contaminación con mohos se asocia con un incremento en la prevalencia de micotoxinas en los alimentos, lo que incurre en un problema de salud pública, teniendo en cuenta que estas toxinas pueden provocar diferentes afectaciones en la salud como daño hepático, neuropatías e incluso cáncer (A. Gómez, 2007); de igual forma, la alta incidencia de contaminación por mohos en arepas, ha ocasionado que algunas pequeñas industrias opten por incrementar la cantidad de conservantes excediendo los límites permitidos bajo normativa colombiana (Resolución 4125 de 1991).

En Colombia, para mitigar la contaminación de las arepas con mohos actualmente se están empleando estrategias como empaques al vacío, la congelación del producto y el uso de conservantes tradicionales. Dentro los conservantes frecuentemente empleados se encuentra el ácido sórbico y el propionato de calcio; sin embargo, hoy en día se buscan alternativas que favorezcan la naturalidad del producto, por lo que estos al asociarse con ingredientes sintéticos no son bien vistos por los consumidores. De igual forma, el efecto antifúngico de estos conservantes tradicionales es muy dependiente de las características fisicoquímicas del producto, por lo que si no se tiene presente estos factores el conservante no funcionará pese a la adición de altas concentraciones (Mani-López et al., 2018). Por tal motivo, se hace indispensable la búsqueda de nuevos conservantes principalmente de origen natural que pueden alargar la vida útil de los alimentos igual o aún más que la alcanzada por los conservantes tradicionales. En este contexto, se ha demostrado que el lactosuero cuando se hidroliza con proteasas, se generan diferentes péptidos que se han asociado con potencial antimicrobiano y antifúngico, lo que hace interesante el aprovechamiento de este subproducto como un posible conservante en los alimentos (Brandelli et al., 2015).

El lactosuero es un subproducto que se obtiene durante la producción de quesos. Este líquido contiene lactosa (4.5-5% p/v), proteínas solubles (0.6-0.8% p/v), lípidos (0.4-0.5% p/v), sales minerales (8-10% del peso seco), así como urea, ácido úrico y vitaminas del complejo B (Parra, 2008). Debido a su alta carga orgánica, su descarte sin tratamiento conlleva una contaminación significativa, al presentar una demanda biológica de oxígeno (DBO) de 30-50 g O₂/L y una demanda química de oxígeno (DQO) de 60-80 g O₂/L (Parra, 2008). Es por ello que la industria láctea

debe procesarlo antes de su vertimiento, lo que supone costos considerables asociados al funcionamiento de una planta de tratamiento de agua residual. No obstante, en los últimos años, se ha estado aprovechando este subproducto para diferentes aplicaciones, como su uso en bioprocesos en los que se emplea como sustrato para la producción de diversos metabolitos de interés industrial, tales como ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido galactónico, bioetanol, bioplásticos, goma xantana, biomasa de microalgas y enzimas. Asimismo, se ha empleado en la elaboración de fertilizantes en agricultura (Mehra et al., 2021).

En la industria alimentaria, el lactosuero es un subproducto muy valorado, ya que se utiliza para elaborar una amplia variedad de bebidas no fermentadas y fermentadas, muchas de ellas funcionales debido a la inclusión de probióticos, prebióticos, vitaminas y minerales (Ayed et al., 2023). Además, este subproducto se emplea como estrategia de microencapsulación de algunos microorganismos probióticos para aumentar su resistencia a los tratamientos térmicos típicos en la producción de alimentos (Tkaczewska, 2020). También se utiliza para separar la lactosa y las proteínas hidrolizadas, que funcionan como endulzante, suplemento dietario o bebidas para deportistas (Parra, 2008). Tal como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha estudiado su uso como conservante, ya que tiene efecto antimicrobiano y antifúngico, especialmente cuando se fermenta con bacterias ácido lácticas (Mehra et al., 2021). Sin embargo, también se ha demostrado que los péptidos generados en la hidrólisis de las proteínas con proteasas pueden tener también el efecto antimicrobiano y antifúngico deseado (Brandelli et al., 2015; Tkaczewska, 2020).

Dado el potencial que presenta el lactosuero en cuanto a su efecto antifúngico, en la presente investigación se evalúa el efecto antifúngico del lactosuero WPC 80 pretratado mediante hidrólisis con proteasas, sobre el hongo *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca. A la fecha son limitados los estudios de nuevos aditivos que permitan alargar la vida útil y prevenir el crecimiento de mohos en alimentos tan tradicionales como lo son las arepas, pese a las millonarias pérdidas que se asocian a esta problemática, por lo cual, este estudio resulta de interés puesto que contribuye con la generación de nuevo conocimiento en un tema de tanto impacto para la industria de alimentos como lo es la extensión de la vida útil de los productos alimenticios. Igualmente, el uso de estrategias no convencionales para el alargamiento de vida útil, en especial, a través de la valorización de subproductos de la misma industria de alimentos es de relevancia al contribuir con la economía circular necesaria en toda la cadena de suministro, producción y distribución de los alimentos en Colombia.

1. Marco teórico

1.1 Breve historia de la arepa

El maíz fue el cereal indígena por excelencia en las épocas previas a la conquista e incluso después de ella, siendo por tanto la principal fuente de alimentación indígena reconocida por los españoles con su llegada a América; como muestra de ello se pueden evidenciar algunos fragmentos de textos del siglo XVI, hechos por colonizadores españoles, en donde se hace referencia reiteradamente a alimentos como el maíz, la yuca, el ají, la ahuyama, la papa y el pescado. Pese a que había variaciones en la alimentación de un territorio a otro, en centro y sur América el maíz era siempre el común denominador de todos los asentamientos indígenas (Saldarriaga, 1999). Otro de los aspectos que se describen en las crónicas escritas por los españoles que se asentaron en el nuevo mundo, era la forma en como el maíz era consumido, destacando formas simples como el maíz tierno y tostado y formas complejas como cocinado, fermentado y amasado (Saldarriaga, 1999).

En el nuevo mundo, principalmente en las zonas correspondientes hoy en día a Colombia y Venezuela, el maíz se consumía principalmente en forma de “pan”, pero que según los relatos de los españoles era un pan diferente puesto que no tenía el mismo proceso de panificación que se realizaba por ejemplo con el trigo, por lo que se interpreta que este alimento correspondía a lo que se conoce hoy en día como arepa (Saldarriaga, 1999). Uno de los primeros comentarios que se registran en torno a la palabra arepa data de 1548 en un escrito de Pedro Ruiz de Tapia que hablaba sobre una visita a los indios de la pesquería de perlas que se hacían en la costa del río de La Hacha, cerca de Venezuela; escrito en el cual afirmó: “*se acostumbraba a darle de comer a cada indio tres arepas de maíz, una a almorzar, otra a comer y otra a cenar, los cuales panes se hacen, para sustentarse bien un indio y tener bien de comer, entre cuatro, un almud de maíz*” (Saldarriaga, 1999). Igualmente, en otro relato de la época hecho por Fray Pedro Simón se da una definición a la palabra arepa, quien la definió como: “*Arepa, es el pá[n] que se haze de la massa del maíz, que echa en forma de tortillas delgadas, se cuecen en unos tiestos en fuego manso, y sirve de los mismo que el pan de trigo, suelen hazerse muy regaladas con guevos, manteca, y otras cosas que les hechan*”(Saldarriaga, 1999).

En cuanto a las características de la arepa que fueron descritas por los relatos españoles de la época se destaca que tenían un peso considerable siendo en promedio de casi una libra, lo que difiere a la arepa que se conoce a hoy día. Los territorios en los cuales predominaba la arepa como principal forma de preparación del maíz era del río grande de la Magdalena hacía el oriente y en cercanías a la costa (Saldarriaga, 1999). Sin embargo, la arepa comenzó a alcanzar nuevos territorios del Nuevo Reino, mediante diferentes rutas; su avance por cada uno de estos territorios implicó variaciones en su preparación, que comenzaron a ser típicas de cada territorio, tal como se puede percibir actualmente en las distintas regiones de Colombia (Saldarriaga, 1999).

1.2. Definición y características de las arepas

Según la NTC 5372:2007 “Arepas de maíz refrigeradas. Especificaciones de producto” la arepa se define como: “producto para consumo obtenido a partir de la masa de maíz blanca, amarilla o mezcla de ambas previamente cocida, mezclada con otros ingredientes tales como sal, queso, entre otros y que debe ser almacenada en refrigeración de 4 °C a 10 °C”. El maíz base para su elaboración puede ser proveniente del maíz trillado cocido y molido o de la harina de maíz precocida; Sin embargo, en otras definiciones del producto se destaca que además del maíz pueden contener también como ingrediente principal el almidón de yuca y la harina de trigo (ICBF & FAO, 2020). Para la preparación tradicional de las arepas el maíz cocido y molido o la harina de maíz es mezclada con los demás ingredientes, luego de ello se moldea la masa para dar la forma circular característica de las arepas y finalmente, se pasa por una cocción que puede ser completa, cuando el producto va listo para consumir o incompleta cuando el producto se vende como precocido (Rivas Alfonso, 2014).

A nivel industrial, el proceso de producción de arepas inicia con la cocción del maíz empleando marmitas atmosféricas o en algunos casos equipos que permiten hacer un control de la presión para agilizar los tiempos de cocción. Una vez cocinado, el maíz se pasa por molinos industriales para facilitar la formación de las masas de arepa; Después de eso, se mezcla el maíz molido con otros ingredientes que cumplen diferentes funcionalidades como, por ejemplo: aditivos que potencien o confieran nuevos sabores, quesos y margarinas que mejoran la palatabilidad de las masas, gomas que evitan el partimiento o desmoronamiento del producto y conservantes que permiten alargar la vida útil del mismo. Posteriormente, estas mezclas se pasan por troqueles con moldes de los diámetros deseados para el producto final. Por último, se someten a un nuevo proceso de cocción principalmente en hornos a los cuales se les ajusta la temperatura y tiempo de residencia para garantizar la precocción del producto. El producto precocido pasa a través de cavas de enfriamiento que disminuyen rápidamente su temperatura para finalmente empacarse.

Los lineamientos sobre los cuales se hace por lo general el control de calidad de las arepas en términos de características fisicoquímicas y microbiológicas, se encuentran en la Norma Técnica Colombiana NTC 5372:2007 “Arepas de maíz refrigeradas. Especificaciones de producto”. En la **Tabla 1**, se puede visualizar las características microbiológicas, en donde se destaca el nivel máximo permitido de mohos y levaduras, siendo este de 1000 UFC/g, adicionalmente la norma establece que si las arepas contienen en fórmula queso debe cumplir con la ausencia de *Salmonella* spp./25 g. Además de las características microbiológicas mencionadas en la NTC 5372:2007, en Colombia se cuenta con la Resolución 1407 de 2022, la cual presenta los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas para consumo humano; los criterios presentados en la resolución difieren de la norma técnica, puesto que amplían en su mayoría los niveles máximos permitidos de algunos microorganismos comunes en arepas, entre ellos los mohos y levaduras (**Tabla 2**). En la **Tabla 3** se presentan las características fisicoquímicas

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

dadas por la NTC 5372:2007 y se puede evidenciar que estas varían considerablemente de acuerdo a los ingredientes que contiene el producto final.

Tabla 1. Características microbiológicas según NTC 5372.

Dónde n corresponde al tamaño de la muestra; c número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M; m el índice máximo permisible para identificar el nivel de buena calidad y M el índice máximo permisible para identificar el nivel aceptable de calidad.

Microorganismo	n	c	m	M
Mohos y Levaduras (UFC/g)	5	1	100	1000
<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	5	0	Ausente	-
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	100	1000
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	5	2	100	1000
Bacterias aerobias mesófilas (UFC/g) (como control a 24 h -48 h post-producción)	5	2	1000	10000

Tabla 2. Criterios microbiológicos para arepas según la Resolución 1407 de 2022. Dónde n, c, m y M tienen la misma definición que la tabla 1.

Microorganismo	n	c	m	M
Mohos y Levaduras (UFC/g)	5	2	1000	3000
<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	5	0	<10	-
<i>Staphylococcus coagulasa positiva</i> (UFC/g)	5	2	<100	1000
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	5	2	300	1000

Tabla 3. Características fisicoquímicas según NTC 5372.

^a Siendo 6,25 el factor de conversión para determinar el porcentaje de proteína en cualquier tipo de arepa.

Requisito	Arepas sencillas (blancas, amarillas o mezcla de ambas tipo antioqueñas e integrales)		Arepas con queso en la masa (con margarina y/o mantequilla)		Arepas rellenas de queso (con margarina y/o mantequilla)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Proteína en fracción de masa en base seca, en porcentaje ^a	3,2	-	5	-	8	-
Humedad en fracción de masa en base seca, en porcentaje	55	68	42	65	55	65
Aflatoxinas (µg/kg)	-	10	-	10	-	10

Actualmente, el mercado de las arepas continúa experimentando un crecimiento significativo. Se han introducido nuevas líneas de productos que, si bien mantienen

la esencia tradicional de este plato, incorporan ingredientes innovadores que se adaptan a los gustos y necesidades del consumidor actual (Rodríguez et al., 2018). Entre las nuevas opciones disponibles en el mercado de las arepas, destaca la línea funcional, que se caracteriza por incluir ingredientes como cereales integrales, semillas como la chía y pseudocereales como la quinoa. Por otro lado, las arepas elaboradas a base de almidón de yuca también están ganando popularidad debido a su sabor distintivo. Además, el choclo es otra variante muy demandada en el mercado colombiano. La inclusión de estos nuevos ingredientes en la elaboración de las arepas implica cambios en las características fisicoquímicas del producto. Por ejemplo, las arepas de la línea funcional presentan un mayor contenido de proteínas y fibra, mientras que las arepas de yuca se caracterizan por tener un menor contenido de humedad. Por su parte, las arepas de choclo se distinguen por una mayor cantidad de azúcares totales. Estos cambios representan un desafío para la industria alimentaria, ya que deben garantizar que estos productos mantengan su calidad y frescura a lo largo de su vida útil, por lo que se hace indispensable el estudio del uso de conservantes tradicionales y nuevos conservantes en estos tipos de producto (Rodríguez et al., 2018).

1.3. Retos en el mercado nacional e internacional de las arepas

Las arepas son un alimento muy popular y tradicional en la cocina colombiana, y su consumo es extendido en todo el país. Son consideradas un ícono de la gastronomía colombiana y se consumen tanto en el desayuno como en otras comidas durante el día. El mercado de las arepas en Colombia es bastante dinámico y ha experimentado cambios en los últimos años; al 2021 dicho mercado estaba avaluado en \$448000 millones de pesos al año, con una penetración del 80% en los hogares, siendo las regiones de mayor consumo Antioquia con el 64% y Bogotá con el 18% (C. Gómez, 2021). Las marcas que lideran la categoría de arepas son: Don Maíz, Bimbo y arepas pan, pese a ello, existe una gran cantidad de empresas pequeñas y familiares que se encargan de la fabricación y venta de las mismas, lo que deja en evidencia el gran impacto que tiene este alimento en la economía del país.

Aunque tradicionalmente las arepas han sido consumidas principalmente a nivel local, en los últimos años existe un creciente interés en la exportación de este producto. Colombia ha logrado posicionar las arepas en algunos mercados internacionales, especialmente en países con una diáspora colombiana significativa, como Estados Unidos, España y Canadá. Estos países cuentan con una demanda establecida de productos colombianos y una familiaridad con la cultura y la cocina del país (ProColombia, 2019). La exportación de arepas implica enfrentar desafíos logísticos, ya que se trata de un producto perecedero que debe conservar su calidad y frescura durante el transporte. Además, es importante adaptarse a los requisitos y regulaciones sanitarias y de etiquetado de cada país importador (ProColombia, 2014). Algunas empresas colombianas han incursionado con éxito en la exportación de arepas, ofreciendo variedades tradicionales y también innovadoras, adaptadas a los gustos y preferencias de los consumidores internacionales. La promoción de la arepa como un producto auténtico y versátil de

la cocina colombiana ha contribuido a su reconocimiento y aceptación en el ámbito internacional (Rodríguez et al., 2018).

Es importante tener en cuenta que el mercado de exportación de arepas aún está en desarrollo y existen oportunidades para expandir la presencia de este producto en otros países. Sin embargo, es necesario realizar estudios de mercado, establecer alianzas estratégicas y cumplir con los estándares de calidad y seguridad alimentaria para tener éxito en la exportación de arepas desde Colombia (Rodríguez et al., 2018). A su vez, se hace inminente la necesidad de evaluar estrategias que permitan mejorar la vida útil de las arepas sin implicar cambios en sus características fisicoquímicas y sensoriales, destacando el posible uso de nuevos conservantes y de nuevas tecnologías de empaque, considerando los largos tiempos involucrados en el transporte de este tipo de productos, el cual se hace principalmente por vía marítima (ProColombia, 2014).

1.4. Estrategias de conservación para la extensión de la vida útil de los alimentos tipo panadería

La vida útil de un alimento se define como el tiempo que dura un producto sin el deterioro visible por mohos, levaduras o bacterias; mientras que, la estabilidad en almacenamiento se define como, el tiempo en el cual el producto conserva las características de calidad que se relacionan con la frescura del mismo, destacándose aroma, sabor, apariencia y textura (McDonough et al., 2015). Para el estudio de vida útil de las arepas, se suele tomar como referencia por lo general el grupo de productos horneados o de panadería, pese a que no son elaboradas necesariamente con harina de trigo (Cauvain & Young, 2010); o también se toma como referencia otros productos a base de maíz como las tortillas.

Los alimentos horneados tipo panadería e incluso las tortillas de maíz tienen por lo general los mismos cambios físicos, químicos y microbiológicos durante su vida útil; a nivel de la estabilidad en almacenamiento se observa un deterioro principalmente de la textura, el sabor y la apariencia (Cauvain & Young, 2010), siendo este último cambio promovido por el crecimiento de microorganismos en la vida útil del producto, principalmente mohos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* y *Neurospora*, de los cuales *Penicillium* es el más frecuente; de bacterias se pueden observar aquellas del género *Bacillus* como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*; en el caso de las levaduras se suele encontrar especies como *Hyphopichia burtonii* y *Saccharomycopsis fibuligera*, que se asocian al fenómeno de contaminación llamado moho de tiza (García et al., 2019; Qian et al., 2021). En la **Figura 1** se puede evidenciar algunos microorganismos que afectan los productos horneados a lo largo de su vida útil.

Para los alimentos horneados, se han desarrollado diferentes estrategias de conservación como: métodos físicos en los cuales se incorporan diferentes tecnologías en el proceso de elaboración como luz ultravioleta, infrarrojo, calor por microondas, ultra altas presiones (Axel et al., 2017; Qian et al., 2021) y CO₂ supercrítico (Kapoor et al., 2021), pese a ello se ha evidenciado que presentan

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

algunos inconvenientes como dificultad para alcanzar el interior del producto horneado además de su alto costo (Qian et al., 2021); otra estrategia consiste en los métodos convencionales de conservación en los cuales se usan conservantes como el ácido sórbico y propionato de calcio junto con la adición de reguladores de acidez, que si bien pueden prevenir el crecimiento de microorganismos presentan algunos problemas como baja solubilidad, impacto sensorial negativo al dejar residuales amargos en el producto (McDonough et al., 2015), pueden inactivarse e incluso evaporarse o migrar rápidamente (Qian et al., 2021), además de estos problemas la tendencia del consumidor actual está enfocada en la búsqueda de alimentos con etiquetas limpias por lo que este tipo de conservantes no está bien visto, por tal motivo, se ha investigado el uso de biopreservantes que cumplen la misma función pero no son sintéticos, destacando por ejemplo el uso bacterias ácido lácticas, aceites esenciales o metabolitos del plantas entre otros (Axel et al., 2017).



Figura 1. Evidencia de especies que contaminan productos horneados en vida útil. Tomado y adaptado de García et al. (2019).

Finalmente, otra estrategia que está en auge es el uso de nuevas tecnologías de empaque en donde se ha explorado el uso de empaques activos (envases antimicrobianos, antioxidantes, absorbentes de humedad, emisores de etanol y emisores de CO₂) y empaques inteligentes (envases con biosensores, indicadores

de frescura, identificación por radiofrecuencia, entre otros) (Han et al., 2018). Esta nueva tecnología de empaque tiene diferentes ventajas como un menor impacto en las características sensoriales del producto además que no requiere el uso de altas concentraciones de conservantes tradicionales; sin embargo, en algunos países como Colombia el uso de esta nueva tecnología de empaques se limita a muy pocas industrias (Caicedo-Perea et al., 2022). Según cifras del 2018 en América latina el mercado de empaques activo e inteligentes estaba avaluado en \$4,5 mil millones y se espera que a finales del 2023 esta cifra incremente a \$6,28 mil millones (Qian et al., 2021b).

1.5. Estrategias de conservación en arepas

Las arepas tienen algunas características fisicoquímicas que las hacen propensas a su contaminación con mohos, entre estas se destaca su alta actividad de agua la cual suele oscilar entre 0,980 y 0,999 (Restrepo Flórez et al., 2012) siendo valores óptimos para el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras (Vilgis, 2015) (**Figura 2**), además que presentan por lo general valores de pH entre 5,5 y 6,5 (Restrepo Flórez et al., 2012), cifras que siguen siendo muy altas para prevenir el crecimiento microbiano. Adicionalmente, tal como se mencionó anteriormente, las nuevas tendencias en el uso por ejemplo de semillas y pseudocereales, así como también del almidón de yuca como materia prima para su elaboración, las hace propensas al deterioro microbiano teniendo en cuenta que estos alimentos son fuente de esporas de mohos y de bacterias patógenas como *Bacillus cereus* (Pino, 2020); sumado a que el maíz y el queso que son ingredientes típicos en su elaboración también son fuente principalmente de mohos y sus esporas.

Actualmente, existen pocas estrategias para la conservación de las arepas, por lo que se hace necesario realizar estudios que permitan encontrar métodos que alarguen su vida útil correspondiendo a la necesidad de soportar los cambios que se dan en la cadena de frío en Colombia y la necesidad de incrementar el mercado de exportación de este producto. Entre las estrategias que hoy en día se utilizan para alargar la vida útil de las arepas se destacan el uso de conservantes tradicionales, en algunos casos de biopreservantes, tecnologías de empaque y condiciones de congelación del producto que, si bien es una de las formas más efectivas para prevenir el crecimiento de microorganismos, afecta la textura y el sabor del producto. A continuación, se describen las estrategias más relevantes de extensión de vida útil empleadas en arepas.

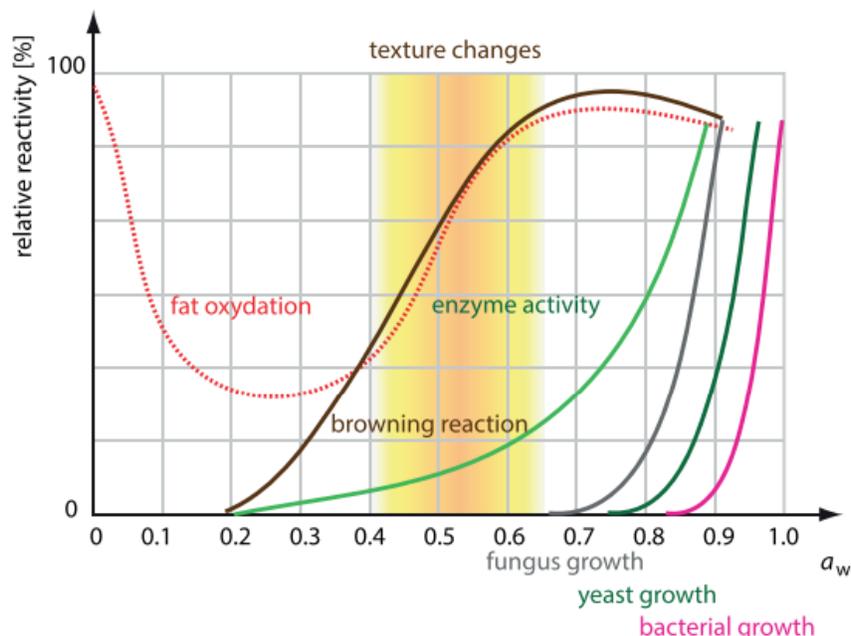


Figura 2. Actividad de agua y procesos en alimentos. Tomado de Viglis (2015).

1.5.1. Estrategia de extensión de vida útil en arepas: conservantes tradicionales y biopreservantes

Normalmente en el transcurso de la vida útil de los alimentos estos sufren diferentes cambios debido a reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbianas; los conservantes actúan inhibiendo microorganismos patógenos que deterioran la calidad del producto durante su vida útil. Estos aditivos se encuentran regulados, por lo cual deben emplearse en bajas cantidades específicamente partes por millón y no pueden exceder del 1 al 3% en peso del producto (García-García & Searle, 2015). En la legislación colombiana actual, Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social, los conservantes se definen como: “sustancias o mezclas de sustancias que impiden o retardan el proceso biológico de alteración, producido en los alimentos por los microorganismos o las enzimas”; los conservantes permitidos y las cantidades máximas admitidas en los alimentos según dicha normativa se pueden evidenciar a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cantidades máximas de los conservantes admitidos en alimentos según la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social.

Conservante permitido	Cantidad máxima permitida (mg/kg)
Ácido benzoico y sus sales de calcio, potasio y sodio	1000
Ácido propiónico y sus sales de calcio, potasio y sodio	3000
Ácido sórbico y sus sales de calcio, potasio y sodio	1000
Ascorbato de calcio	1000

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Conservante permitido	Cantidad máxima permitida (mg/kg)
Dióxido de azufre y sus sales, bisulfito, metabisulfito y sulfito de calcio, potasio y sodio	1500
Hexametenotetramina	600
Nisina	12,5
Nitratos de potasio y sodio	500
Nitritos de potasio y sodio	200
Parahidroxibenzoatos de etilo, metilo y propilo	1000

Además de los conservantes mencionados en la **Tabla 4** existen otros tipos de conservantes, en la **Tabla 5** se puede observar una breve clasificación de los mismos; pese a ello, la selección de un conservante o la combinación de los mismos para incluirla en una arepa u otro alimento debe ser previamente validado, puesto que, la eficacia o el efecto real de este aditivo depende de muchos factores como: el tipo de microorganismo que crece típicamente en la matriz alimenticia, el pH de la matriz, la composición e incluso el tiempo de vida útil que se desea alcanzar en el producto (García-García & Searle, 2015). A continuación, se detallan algunos de los conservantes frecuentemente empleados en arepas y productos de panadería, así como nuevas tendencias que tienen un uso potencial en productos como las arepas.

Tabla 5. Clasificación de algunos conservantes empleados para alimentos. Tomado y adaptado de Surekha & Reddy (2014).

Conservantes naturales	Conservantes Sintéticos	Bacteriocinas
Sal Humo Picantes Vinagre Alcoholes	<p>Orgánicos</p> <p>Ácido acético, acetatos y diacetatos Ácido sórbico y sus sales Ácido benzoico y sus sales Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico ésteres y sus sales Ácido bórico y boratos Ácido cítrico y sus sales Ácido fórmico y formatos Ácido láctico y sus sales Ácido propiónico y sus sales</p> <p>Inorgánicos</p> <p>Poli aminoácidos Ácido carbónico (CO₂) Ácido sulfuroso y sulfitos (SO₂) Nitritos y nitratos Fosfatos Peróxido de hidrógeno</p>	Nisina

❖ **Conservantes tradicionales: ácidos orgánicos en conjunto con acidulantes**

Algunos ácidos orgánicos tienen un efecto antimicrobiano destacable y son considerados como seguros (GRAS) por la FDA, por lo que comúnmente se emplean como conservantes en los alimentos (Moro et al., 2022). Entre los conservantes más empleados se encuentran los ácidos orgánicos lipofílicos débiles y sus sales como el sorbato, benzoato y propionato. El efecto antimicrobiano de estos conservantes se asocia a su naturaleza lipofílica que les permite en un principio difundir en su forma no disociada a través de la membrana celular; cuando ingresan a la célula al presentar el citoplasma pH cercanos a la neutralidad, se disocian conduciendo a la reducción del pH citoplasmático lo cual desencadena problemas en el plegamiento de las proteínas, producen inhibición enzimática y causa alteraciones metabólicas generalizadas (García-García & Searle, 2015). A su vez, la reducción del pH interno neutraliza el gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática lo cual dificulta el transporte activo de muchos nutrientes esenciales (García-García & Searle, 2015).

El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos lipofílicos débiles, es muy dependiente de las características fisicoquímicas del alimento, principalmente de su pH (Campos, 1995; Moro et al., 2022; Surekha & Reddy, 2014) puesto que, la forma activa de estos ácidos corresponde generalmente a su forma no disociada; entre más bajo sea el pH o más cercano esté al valor del pKa del ácido hay un mayor porcentaje de ácido sin disociar que puede atravesar la membrana celular, y generar los efectos antimicrobianos en mención (Campos, 1995). En este contexto, es importante mencionar que en general los sorbatos tienen como ventaja el hecho de ser más efectivos aún en el rango de pH comprendido entre 6,0 - 6,5, a diferencia de otros conservantes como el propionato y el benzoato cuyo pH máximo para inhibir el crecimiento microbiano está entre 5,0 - 5,5 y 4,0 - 4,5, respectivamente (Campos, 1995). Adicionalmente, se sabe que los sorbatos o ácido sórbico tienen una actividad antimicrobiana que es más efectiva contra mohos que contra bacterias, mientras que, el propionato tiene un mayor efecto antimicrobiano frente a bacterias (McDonough et al., 2015; Moro et al., 2022). Por tal motivo, en productos horneados se suele recomendar el uso de sorbatos o ácido sórbico con propionatos o ácido propiónico (McDonough et al., 2015).

El ácido sórbico es uno de los conservantes más ampliamente empleado en la industria de alimentos. Este es un compuesto natural obtenido en 1859 por A.H Hoffman a partir del aceite de serba inmadura. Sin embargo, en 1900 fue obtenido de forma sintética y cuarenta años después se descubrió su efecto antimicrobiano, demostrando que inhibe el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, siendo más efectivo para hongos y levaduras que contra bacterias (Campos, 1995). El efecto antimicrobiano de este conservante en los alimentos es altamente dependiente de sus propiedades químicas como su solubilidad, reactividad y estabilidad. En cuanto a su solubilidad, se sabe que es mucho más soluble en lípidos que en agua, y que en general dicha solubilidad aumenta si se incrementa la temperatura del alimento; pese a ello es importante resaltar que las sales de este

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

ácido son mucho más solubles en agua que en forma de ácido. Con respecto a su estabilidad se sabe que esta puede variar por efecto de la degradación del mismo y esta degradación se puede dar por autooxidación, en donde la oxidación se produce principalmente cuando está en solución acuosa; por efectos del proceso por ejemplo las altas temperaturas y calentamientos prolongados así como también la irradiación favorecen su degradación (Campos, 1995; Thomas & Delves-Broughton, 2014), además de su reacción con otros moléculas presentes en el alimento (**Tabla 6**); a su vez se ha evidenciado que pueden degradarse también por efectos microbianos (Thomas & Delves-Broughton, 2014).

Tabla 6. Factores implicados en la degradación del ácido sórbico.
Recopilación a partir de Campos (1995); Thomas & Delves-Broughton (2014).

Factores que favorecen degradación del ácido sórbico		Factores que limitan degradación del ácido sórbico	
Compuestos o componentes del alimento	Condiciones ambientales/proceso	Compuestos o componentes del alimento	Condiciones ambientales/proceso
-EDTA -Glicina	-Altas temperaturas en tiempos prolongados -Disminución de pH (Principalmente cuando está en solución acuosa)	-Antioxidantes -Cloruro de sodio o de potasio	-Empaque vacío -Menor actividad de agua y porcentaje de humedad del producto a conservar
-Sulfato y fosfato de sodio, potasio y amonio -Metabisulfito de sodio -Dióxido de azufre -Aminoácidos (principalmente aquellos con grupo sulfhidrilo libres) -Glicerol	-Irradiación -Exposición prolongada a la luz (Principalmente cuando está en solución acuosa) -Algunas especies de bacterias, mohos y levaduras	-Alcoholes como etanol	

En diferentes estudios se ha observado que algunas bacterias tienen la capacidad de degradar el ácido sórbico y sorbatos, esto ocurre porque metabolizan dicho compuesto principalmente cuando se encuentra en concentraciones subletales y el grado de contaminación del alimento con estas bacterias es muy alto; las bacterias que tienen la capacidad de metabolizar este conservante son algunas ácido lácticas como *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* (Campos, 1995), que tienen la capacidad de fermentar el sorbato produciendo sorbato de etilo, ácido 4-hexenoico, 1-etoxihexa-2,4-dieno y 2-etoxihexa-3,5-dieno. Algunas especies de levaduras del género *Candida* también pueden metabolizar este conservante (Thomas & Delves-Broughton, 2014).

En mohos, se ha documentado que ciertas especies del género *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor* y *Penicillium* pueden metabolizar el sorbato por una reacción de descarboxilación que forma 1,3-Pentadieno (con olor a queroseno), por esterificación produciendo sorbato de etilo o por reducción generando 4-hexenol y ácido 4-hexenoico (Campos, 1995). Adicionalmente, se sabe que existen especies de levaduras de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* así como mohos del género *Penicillium* que tienen la capacidad de tolerar el sorbato, puesto que pueden expulsar los aniones que causan la disminución del pH citoplasmático, o pueden generar poros diminutos en la membrana que se asocian con contracción celular e incluso, pueden proteger sus enzimas de los bajos pH mediante producción de polioles u otros solutos (Thomas & Delves-Broughton, 2014).

Otro ácido orgánico lipofílico débil que es frecuentemente empleado para la conservación de alimentos es el ácido propiónico y sus sales. Desde el punto de vista fisicoquímico, este ácido y sus sales son solubles en agua (Kagliwal et al., 2014). En cuanto a su efecto antimicrobiano se ha demostrado que es efectivo frente a bacterias, mohos, pero en levaduras no presenta un buen efecto inhibitorio, lo que lo hace adecuado para su uso en productos de panadería que emplean la levadura para la fermentación (Kagliwal et al., 2014). Si bien se conoce el efecto antifúngico frente a varias especies de mohos, se ha evidenciado que en algunas especies del género *Penicillium* este ácido y sus sales no inhiben su crecimiento, por ejemplo, *P. roqueforti*, *P. paneum* y *P. commune* no son inhibidos por el propionato de calcio incluso cuando se usa en altas concentraciones (García et al., 2019; Moro et al., 2022; Suhr & Nielsen, 2004). En algunos estudios con *P. roqueforti* se ha demostrado que el propionato puede estimular el crecimiento de esta especie, principalmente a altas actividades de agua ($a_w > 0,97$) y pH alto ($pH > 4,8$) además que estimula la producción de metabolitos secundarios como ácido micofenólico (Suhr & Nielsen, 2004), que presenta actividades antibacteriales, antivirales, anticancerígenas e inmunosupresoras; por lo que fue aprobado por la FDA como medicamento inmunosupresor (Siebert et al., 2020).

Por otro lado, en algunos estudios se ha relacionado el propionato con efectos nocivos en la salud humana cuando se consume de forma constante; hasta el momento se sabe que puede causar niveles elevados de glucosa además de resistencia a la insulina y alteraciones del ciclo circadiano (Perry et al., 2016; Tirosh et al., 2019; Xu et al., 2022). Dichos estudios se han realizado en organismos modelo como ratones y pez cebra, siendo este último un organismo modelo muy comúnmente empleado para estudios de toxicología teniendo en cuenta que este tiene un 87% de similitud genética con los humanos (Xu et al., 2022). Pese a los resultados obtenidos en dichos estudios, los propionatos siguen siendo ampliamente usados en la industria alimentaria dado que las entidades regulatorias de salud no tienen evidencia suficiente para demostrar dicha toxicidad. Hoy en día en Colombia, los propionatos se usan de forma extendida en la mayoría de productos de panadería.

El ácido benzoico y sus sales se han empleado como conservantes en los alimentos desde hace muchos años, aspecto que se puede evidenciar en la primera legislación de alimentos en la que se nombran los conservantes, la cual fue elaborada por salud pública en Reino Unido durante 1925. En esta legislación se nombra el ácido benzoico y sus sales como un conservante efectivo y seguro para su uso en alimentos (Ogbadu, 2014). Estos conservantes se caracterizan a nivel fisicoquímico porque en forma de ácido presentan una baja solubilidad en soluciones acuosas, mientras que las sales de este ácido son solubles en agua (García-García & Searle, 2015; Ogbadu, 2014). Su efecto antimicrobiano se produce principalmente a bajos pH (2,5-4,0) por lo que se usa en alimentos ácidos, aunque también es muy efectivo en alimentos con alto contenido de azúcares siendo muy común en mermeladas, jaleas, helados y chicles. Dado que funciona a bajos pH tiene un buen efecto inhibitorio frente a bacterias que toleran ambientes ácidos; de igual forma, también pueden presentar efecto inhibitorio frente a mohos y levaduras, por lo cual no se recomienda en alimentos que impliquen una fermentación con levadura (Ogbadu, 2014).

Adicional al bajo pH, la deficiencia de nitrógeno también refuerza el efecto del ácido benzoico y sus sales, dado que este conservante inhibe el mecanismo de macroautofagia que es típico en los microorganismos cuando están expuestos a deficiencia de nitrógeno. Pese al buen efecto inhibitorio de este ácido y sus sales contra levaduras y mohos principalmente, existen algunas especies que pueden tolerar incluso altas concentraciones de estos conservantes; levaduras como *Zygosaccharomyces bailii* (Ogbadu, 2014; Stratford et al., 2013) *Zygosaccharomyces Rouxii* y *Saccharomyces cerevisiae* y mohos como *Aspergillus parasiticus*. Si bien, muchas bacterias no crecen en ambientes tan ácidos como a los que es más efectivo el ácido benzoico y sus sales, bacterias formadoras de esporas como *Bacillus coagulans* y bacterias ácido lácticas no deseadas en algunos alimentos, pueden inhibirse con estos conservantes (Ogbadu, 2014).

Pese a que los ácidos lipofílicos débiles mencionados anteriormente tienen un efecto inhibitorio frente a bacterias, mohos y levaduras, este efecto se ve potenciado si se añade un acidulante a la matriz alimenticia. Los acidulantes son ácidos que cumplen diferentes funciones en el alimento, entre estas funciones se destaca: la modificación del sabor, puesto que, cada tipo de ácido tiene per se unas características gustativas (tiempo de inicio de la percepción de la acidez, intensidad de la acidez y el regusto persistente) que modifican o intensifican las sensaciones de sabor generadas por otros compuestos en el alimento, por ejemplo, con su acidez enmascaran regustos o residuales que dejan algunos compuestos como los edulcorantes no calóricos o en reducciones de sodio elimina el amargor del cloruro de potasio dando el sabor salado típico del cloruro de sodio (Dziezak, 2015; Gurtler & Mai, 2014); función tecnológica puesto que regula el pH, retardando reacciones enzimáticas como el pardeamiento, controla la gelificación de ciertos hidrocoloides y estandariza el pH en procesos de fermentación; sirve como agente quelante, acomplejando iones metálicos como como cobre, hierro, manganeso, níquel,

estaño y zinc, los cuales catalizan reacciones de oxidación en el alimento, dejándolos no disponibles para dichas reacciones (Dziezak, 2015; Gurtler & Mai, 2014).

Además de las funciones mencionadas anteriormente, los acidulantes tienen un efecto antimicrobiano, puesto que en los alimentos estos ácidos aumentan la concentración de protones, disminuyendo el pH, lo cual afecta negativamente las paredes celulares, membranas celulares y proteínas superficiales de diferentes microorganismos. A diferencia de los ácidos lipofílicos débiles, estos no pueden atravesar las membranas celulares por lo que no están implicados en la disminución del pH citoplasmático, sin embargo, al disminuir el pH de la matriz alimenticia favorecen que los ácidos lipofílicos débiles se encuentren en un mayor porcentaje en su forma no disociada, que es la que principalmente se asocia con la actividad antimicrobiana, por lo que se afirma que estos ácidos tienen un efecto sinérgico con los ácidos lipofílicos débiles, por lo cual para alargar la vida útil de los alimentos siempre se utilizan ambos (García-García & Searle, 2015). Dentro de los ácidos que más se emplean en los alimentos, se destacan: el ácido acético, adípico, cítrico, fumárico, láctico, málico, fosfórico, tartárico y la glucono delta lactona (Dziezak, 2015).

Si bien los ácidos empleados como conservantes ayudan a disminuir la proliferación de microorganismos en los alimentos, estos deben ser utilizados en cantidades específicas teniendo en cuenta pueden cambiar significativamente las características organolépticas, principalmente sabor en los alimentos, siendo este efecto más pronunciado cuando se hace uso excesivo de los acidulantes (Gurtler & Mai, 2014); por ejemplo, con poca cantidad de ácido fumárico se puede alcanzar una sensación ácida alta equivalente a si se empleara una alta cantidad de ácido cítrico o ácido láctico. La glucono delta lactona es un acidulante muy comúnmente empleado, y se caracteriza porque tiene una tasa muy lenta de acidificación; cuando este acidulante está en presencia de agua se hidroliza para formar una mezcla en equilibrio entre el ácido glucónico y las d- y g-galactonas, esta reacción ocurre de forma lenta, pero aumenta la cinética cuando se incrementa la temperatura (Dziezak, 2015). A medida que la glucono delta lactona se convierte paulatinamente en ácido glucónico las características gustativas cambian de dulce a neutro hasta alcanzar un ligero sabor ácido; la ligereza de este acidulante como su elevada acción quelante de metales hace que se emplee en muchos productos como chocolate, tofu, pudines de leche, cárnicos entre otros (Dziezak, 2015). En los productos de panadería y a base de maíz como las tortillas se suele usar como acidulantes el ácido cítrico, ácido láctico y ácido fumárico (Serna-Saldivar & Rooney, 2015). En la **Tabla 7** se puede evidenciar los acidulantes con mayor uso en la industria de alimentos, sus principales características y sus aplicaciones.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tabla 7. Acidulantes, descripción y usos en la industria de alimentos. Recopilado de Gurtler & Mai (2014); Dziezak (2015).

Acidulante	Características	Alimentos en los que se usa
Ácido adípico	Poco higroscópico, acidez persistente que tiene muy buen desempeño en productos con sabor a uva y frutales. Es más agrio que el ácido cítrico. De todos los acidulantes en solución este es el menos ácido, pero tiene una gran capacidad amortiguadora en el rango de pH de 2,5 a 3,0.	Quesos análogos, grasas, mezclas de bebidas y de pasteles en polvo.
Ácido cítrico	Alta solubilidad en agua, buen agente quelante, tiene un efecto tampón en un amplio rango de pH (2,5-6,5). Previene de forma efectiva la inversión de la sacarosa y el pardeamiento.	Postres, confitería, gelatinas, bebidas carbonatadas, embutidos y carnes frescas y secas.
Ácido acético	Tienen un buen efecto antimicrobiano pero su sabor y olor característico hace que su uso se limite a unos cuantos tipos de alimentos.	Encurtidos, chutney, ensaladas cremas, mayonesas, aderezos y salsas.
Ácido fumárico	Poco higroscópico, baja solubilidad en agua, para lograr la sensación ácida se requiere de menos cantidad que otros acidulantes como el ácido cítrico. Presenta un sabor frutal.	Pan de centeno, jaleas, mermeladas, bebidas, dulces, agentes emulsionantes de agua en aceite, grasas y acondicionadores de masa.
Ácido málico	Higroscópico. Con sabor ácido, amargo y suave que genera permanencia en boca por lo que sirve para enmascarar residuales.	Se prefiere en alimentos que contienen manzana, como sidras, debido a su sabor. Bebidas carbonatadas, en polvo jugos, mermeladas, jaleas, frutas y vegetales enlatados, y confitería.
Ácido láctico	Tiene acidez suave por lo que no enmascara otros sabores presentes en el alimento y un buen efecto antimicrobiano.	Confitería, productos de panadería, cerveza, vino, bebidas, productos lácteos, las claras de huevo deshidratadas y los productos cárnicos.
Ácido fosfórico	Ácido inorgánico que produce el pH más bajo de todos los acidulantes alimentarios.	Se usa principalmente en bebidas carbonatadas.
Ácido tartárico	Es el más soluble en agua de todos los acidulantes en polvo. Genera un sabor agrio fuerte, realzando los sabores frutales. Tiene poco efecto antimicrobiano si se compara con otros acidulantes.	Bebidas, postres de gelatina, mermeladas, jaleas y productos agrídulces.
Gluono delta lactona	Presenta acidificación gradual, sabor suave y es muy buen quelante de iones metálicos.	Productos de chocolate, tofu, pudines de leche y aderezos cremosos.

❖ **Conservantes tradicionales: parabenos**

Las arepas al ser un producto tradicional que se elabora principalmente a mediana y pequeña escala, no contienen por lo general conservantes diferentes a los ácidos lipofílicos débiles y acidulantes que son los ampliamente utilizados en la industria de alimentos; sin embargo, existen otros conservantes que tienen un buen efecto antimicrobiano y se usan también en productos similares como los alimentos horneados y las tortillas de maíz, por ejemplo, los parabenos (McDonough et al., 2015). Los parabenos desde el punto de vista químico, se pueden describir como un grupo de moléculas esterificadas de ácido hidroxibenzoico en la posición C-4 (García-García & Searle, 2015). Este tipo de moléculas son ampliamente empleadas en las industrias farmacéuticas y de alimentos debido a que tienen una alta estabilidad química, bajo costo además que se consideran como antimicrobianos de amplio espectro y tienen bajo riesgo de inducir reacciones alérgicas (García-García & Searle, 2015).

Desde el punto de vista fisicoquímico los parabenos son solubles en alcohol, en éter y acetona, físicamente son cristales o polvos cristalinos a temperatura ambiente. Se ha demostrado que sus propiedades antimicrobianas mejoran con el aumento de la longitud de la cadena de alquilo y, por lo tanto, la hidrofobicidad del compuesto (Wei et al., 2021). Su efecto antimicrobiano se puede evidenciar en un amplio rango de pH, sólo se ha visto poco efectivo únicamente a valores de pH superiores a 8. Algunos estudios asocian su efecto antimicrobiano al afectar la membrana celular y la funcionalidad de las enzimas presentes (García-García & Searle, 2015). Los parabenos más empleados industrialmente son el metil-, etil-, propil-, butil- y bencilparabeno; sin embargo, en alimentos la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social en Colombia permite únicamente el uso del metil-, etil- y propilparabeno; si se compara los parabenos con los ácidos orgánicos débiles, se afirma que son más efectivos contra las levaduras y los mohos; pero en el caso de las bacterias principalmente las Gram-negativas ocurre el caso contrario (García-García & Searle, 2015; McDonough et al., 2015; Wei et al., 2021).

Si bien los parabenos son reconocidos como GRAS por la FDA, la comunidad europea y otras entidades regulatorias de peso, en algunas investigaciones recientes se ha puesto en entrevisto los efectos que pueden tener estos en el cuerpo humano; por ejemplo, en algunos estudios se plantea que el propilparabeno puede presentar un potencial como estrógeno (García-García & Searle, 2015; Hossaini et al., 2000). Pese a ello es importante resaltar que los estudios que concluyen sobre su toxicidad por lo general se basan en estudios *In vivo* e *In vitro*, que en la mayoría de casos se efectúan con concentraciones que no son realistas y los efectos evidenciados puede que no necesariamente se presenten en los humanos. Por tal motivo, faltan aún más estudios con resultados que sean realmente concluyentes y que sean extrapolables a los seres humanos (Wei et al., 2021).

❖ Biopreservantes

Adicional a los conservantes tradicionales, hoy en día existe una fuerte influencia en el uso de conservantes naturales; esta tendencia está ganando cada vez más fuerza e impulsa a los consumidores a buscar alimentos sin aditivos, es decir, con etiquetas limpias. Igualmente, la divulgación de estudios sobre la posible toxicidad de algunos conservantes tradicionales también ha provocado que los consumidores pongan en duda la calidad de los alimentos que los contienen. Por tal motivo, la industria de alimentos está inclinándose cada vez más hacia las investigaciones sobre el estudio de nuevas moléculas que puedan presentar efectos antimicrobianos, y que incluso puedan prevenir o retardar los daños oxidativos que se evidencian normalmente en los alimentos durante su vida útil (Masyita et al., 2022). Las moléculas que actúan como conservantes naturales, se extraen por lo general de fuentes como plantas, hongos, bacterias y algas (García-García & Searle, 2015). Entre los conservantes naturales que mayor relevancia tienen a hoy día se encuentran las bacteriocinas y los aceites esenciales; a continuación, se describen algunas de las características de estas sustancias consideradas como conservantes.

Bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como péptidos bacterianos con potencial antimicrobiano sintetizados ribosomalmente. Estos péptidos pueden ser producidos por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cotter et al., 2005; Daba & Elkhateeb, 2020; Riley & Wertz, 2002); sin embargo, existe un mayor estudio en los péptidos provenientes de bacterias Gram positivas principalmente aquellos de bacterias ácido lácticas, debido al uso extensivo de estas bacterias en la industria de alimentos además que muchas de estas y sus productos han sido reconocidos por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) como seguros (GRAS) para su uso como ingredientes alimentarios (Daba & Elkhateeb, 2020). A nivel industrial existen tres formas para la aplicación de las bacteriocinas: el uso del microorganismo productor de este péptido mediante inoculación directa en el alimento, la adición de la bacteriocina completa o parcialmente purificada como aditivo en el alimento, o usando como ingrediente durante el procesamiento del alimento un producto que fue previamente fermentado con bacterias productoras de bacteriocinas (Daba & Elkhateeb, 2020; Silva et al., 2018).

Al 2020 solo dos bacteriocinas habían sido reconocidas y aceptadas por la FDA como conservantes de alimentos, siendo estas: la nisina E234 y la pediocina PA1. Sin embargo, a partir de estas se han desarrollado diferentes productos comerciales para su uso en alimentos (Daba & Elkhateeb, 2020). En Colombia, bajo la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social está admitido hasta la fecha el uso de nisina a 12,5 ppm. En la industria de alimentos, como bacteriocina parcialmente purificada en el mercado se encuentra la Nisaplina™, la cual contiene 2,5% de nisina y se caracteriza por ser soluble en agua, termoestable y con acción bactericida contra bacterias patógenas como *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, además de presentar una actividad bacteriostática contra esporas

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

bacterianas (Daba & Elkhateeb, 2020; Oshima et al., 2014). Como ingrediente que fue fermentado previamente con bacterias productoras de bacteriocinas y se usa como aditivo en alimentos, hoy en día se comercializa MicroGARD™ ALTA 2341 que contiene pediocina PA1, además de otras líneas de la misma marca que incluyen otras bacteriocinas, y se ha demostrado que estos productos son más efectivos que la misma nisina frente a *S. aureus* y *L. monocytogenes* además de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *Escherichia coli* (Daba & Elkhateeb, 2020; Riley & Wertz, 2002).

Por otro lado, en la industria alimentaria, como cultivos de bacterias productoras de bacteriocinas de aplicación directa en el alimento, se pueden encontrar comercialmente las siguientes marcas: BioSafe™ que contiene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BS-10 que produce nisina A y se utiliza para la conservación de quesos; Bactoferm™ B-SF- 43 que tiene *Leuconostoc carnosum* productor de leucocina, Bactoferm™ B-2 que presenta *Latilactobacillus sakei* productor de sakacina y Bactoferm™ B-FM que tiene *Staphylococcus xylosus* y *L. sakei*, toda la marca siendo aplicada para el control de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos almacenados al vacío; HOLDBAC™ que tiene *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 706 y *Lacticaseibacillus rhamnosus* DSM 7061 que se usa para controlar los mohos y psicrótrofos en el queso; Bactoferm™ F-LC que contiene *Pediococcus acidilactici*, *Latilactobacillus curvatus* y *Staphylococcus xylosus* productores de pediocina PA1/AcH y sakacina respectivamente, y se usa para conservar carne evitando su contaminación con *L. monocytogenes*; ALCMix1 que tiene *Lactiplantibacillus plantarum* y *Staphylococcus carnosus* productores de plantaricina y carnocina respectivamente, también empleados para el control *L. monocytogenes* en carne (Chikindas et al., 2018; Daba & Elkhateeb, 2020). En la **Tabla 8** se puede observar un resumen de estos productos empleados en alimentos.

Tabla 8. Productos comerciales con bacteriocinas empleados en la industria de alimentos. Tomado y adaptado de Chikindas et al. (2018); Daba & Elkhateeb (2020).

Marca comercial	Tipo de aplicación	Microorganismo involucrado	Bacteriocina involucrada	Aplicación Industrial
Nisaplina™ E234	Bacteriocina parcialmente purificada	N.A.	Nisina A	Uso principalmente en productos lácteos; controla <i>Bacillus cereus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> , así como esporas bacterianas.
MicroGARD™ ALTA 2341	Producto que se usa como aditivo alimentario y contiene la bacteriocina; fue producido a partir de un proceso de fermentación previa con un microorganismo productor de la bacteriocina	N.A.	Pediocina PA1	Uso en diferentes matrices alimenticias, incluyendo productos horneados. Tiene efecto inhibitorio frente a <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Escherichia coli</i> .

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Marca comercial	Tipo de aplicación	Microorganismo involucrado	Bacteriocina involucrada	Aplicación Industrial
BioSafe™	Cultivo de microorganismos productores bacteriocinas que se aplican directamente al alimento	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BS-10	Nisina A	Uso para conservación de quesos; ayuda a evitar hinchazón tardía y sabores desagradables generados por el género <i>Clostridium</i> .
Bactoferm™ B-SF- 43		<i>Leuconostoc carnosum</i>	Leucocina	Uso en productos cárnicos empacados al vacío como control de <i>L. monocytogenes</i> .
Bactoferm™ B-2		<i>Lactocaseibacillus casei</i>	Sakacina	
Bactoferm™ F-LC		<i>Staphylococcus xylosum</i> y <i>L. sakei</i>	Sakacina	
ALCMix1		<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> y <i>Staphylococcus carnosus</i>	Plantaricina Carnocina	Uso en productos cárnicos para control de <i>L. monocytogenes</i> .
HOLDBAC™		<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSM 706 y <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> DSM 7061	No definidos	Uso en quesos para controlar los mohos y psicrótrofos.

La capacidad antimicrobiana de las bacteriocinas depende del tipo de bacteriocina y de su estructura; algunas bacteriocinas como las lantibióticas lineales, rompen la membrana celular, mientras que, las lantibióticas globulares inhiben algunas reacciones enzimáticas que ocurren al interior de las células. Otra clase de bacteriocinas tiene la capacidad de inducir la formación de poros en las membranas celulares lo que conlleva a la muerte celular y otra clase de bacteriocinas son en sí mismas enzimas bacteriolíticas que actúan a nivel de la pared celular (Mani-López et al., 2018). De igual forma, muchas bacteriocinas se caracterizan porque están cargadas positivamente lo que facilita su interacción con los lípidos aniónicos de las membranas de las bacterias Gram positivas, lo que conlleva a la generación de poros; a través de estos poros se afecta la fuerza protón motriz, que implica cambios en el pH y en el potencial eléctrico de la membrana, este último mecanismo antimicrobiano es el que se ha asociado a las bacteriocinas más estudiadas como la nisina (Mani-López et al., 2018).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden definir como líquidos altamente hidrófobos concentrados que pueden obtenerse de una gran variedad de plantas, definidos en base a sus propiedades físicas y químicas. Entre los efectos de interés para la industria de alimentos y farmacéutica se destaca su capacidad antimicrobiana, antihelmíntica, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria, insecticida, larvicida e inmunomoduladora (Masyita et al., 2022). Estos aceites esenciales se caracterizan

desde el punto de vista químico por contener terpenos y terpenoides; los primeros son compuestos con estructuras hidrocarbonadas simples, mientras que, los segundos en sus cadenas hidrocarbonadas presentan diversos grupos funcionales. Estas moléculas se han relacionado directamente con su capacidad antimicrobiana tanto en bacterias resistentes como no resistentes, y antifúngica debido a su capacidad para promover ruptura celular y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, a ciertas concentraciones (Masyita et al., 2022).

El efecto antimicrobiano de los aceites esenciales se ha evidenciado directamente en alimentos como productos de panadería; en este tipo de alimentos horneados los aceites se han aplicado de dos formas para evidenciar su efecto antifúngico principalmente frente a mohos: mediante el uso del aceite volátil durante el empaque del producto o directamente como un ingrediente en la mezcla para la elaboración del mismo. De estas dos formas, se ha demostrado que su uso durante el empaque tiene un mayor efecto antifúngico, además que evita los residuales y el impacto en sabor que puede presentar el uso de estos aceites directamente en las masas (Magan et al., 2003).

El uso de aceites esenciales como volátiles en empaques ha puesto en evidencia el efecto antifúngico frente especies de *Penicillium* resistentes a los conservantes tradicionales como por ejemplo *Penicillium roquefortii* y *Penicillium commune*, de los aceites esenciales de mostaza, canela, ajo y clavo (Magan et al., 2003; Nielsen & Rios, 2000); este efecto podría acentuarse si usan pads en los empaques que estén impregnados con estos aceites de tal manera que se liberen lentamente en el interior del empaque y más aún si se combina con una atmósfera modificada. En las aplicaciones en las cuales se usa como ingrediente directo en la masa, se ha observado en distintos estudios que se requiere de concentraciones mucho más altas que las que se usan en los estudios *In vitro*, además que, si bien unas concentraciones pueden producir el efecto antifúngico deseado, bajo otras concentraciones se puede estimular el crecimiento o la producción de micotoxinas en mohos (Magan et al., 2003).

Finalmente, es de relevancia mencionar que a la fecha no existen estudios en donde se evidencie el uso de bacteriocinas o aceites esenciales en productos tradicionales como las arepas; sin embargo, dado a las pérdidas económicas constantes que se producen por efecto del crecimiento de mohos, vale la pena que estos nuevos métodos sean explorados e investigados tanto en la academia como en la industria.

1.5.2. Estrategias de extensión de vida útil en arepas: tecnologías de empaque

Tal como se mencionó anteriormente, en la actualidad existen diferentes tecnologías de empaque que se ha demostrado que pueden ser muy efectivas para extender la vida útil de los alimentos sin incurrir en cambios drásticos en las características fisicoquímicas y sensoriales de los mismos. En Colombia, tradicionalmente las arepas se han empacado en bolsas principalmente de polietileno de baja densidad; sin embargo, su alta probabilidad de contaminación con mohos ha hecho que la industria opte por nuevos sistemas de empaque,

principalmente el empaque a vacío con o sin atmósfera modificada. Este sistema de empaque se puede observar en algunas marcas nacionales, pese a ello, es más frecuente encontrarlas en los productos que están destinados a exportación.

A la fecha, ya se ha evaluado la efectividad que tiene el sistema de empaque al vacío en arepas; por ejemplo, Restrepo Flórez et al. (2012) analizaron el impacto en vida útil sistemas combinados de conservación de arepas de maíz utilizando mezclas de gases (100% CO₂, 40% CO₂/60% N₂ y Vacío), estructuras de empaque de barrera intermedia y alta a gases, y el control de la temperatura de almacenamiento; concluyendo que el empaque de las arepas empleando una atmósfera 100% CO₂, permite alargar la vida útil del producto independientemente de si el empaque es de alta o intermedia barrera e independiente de si la temperatura es en refrigeración (5°C ± 2°C), ambiente (25° C ± 2°) o fluctuante (25° C ± 2°C por 12 horas y 5°C ± 2°C por 12 horas). Con este sistema de conservación, los autores obtuvieron 9 días de vida útil en temperatura ambiente, 28 días en temperatura fluctuante y 55 días en refrigeración (Restrepo Flórez et al., 2012).

1.6. Mohos predominantes en productos a base de maíz y arepas

El maíz presenta de forma natural microorganismos principalmente hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Penicillium*, siendo estos mohos productores de micotoxinas (Carvajal-Moreno, 2022; Corpas & Tapasco, 2012; Fernandez, 2021). La presencia de estos mohos y de las micotoxinas en el cultivo del maíz aumentan su afluencia en las temporadas de altas temperaturas y humedad, condiciones que son típicas en países de climas tropicales como Colombia. Por tal motivo, es común encontrar una alta probabilidad de contaminación de las arepas con mohos (Corpas & Tapasco, 2012), más aún si en las empresas productoras no cumplen con buenas prácticas de manufactura y si no se tienen un control adecuado de la temperatura de almacenamiento del producto (García et al., 2019). De los mohos frecuentemente evidenciados en arepas, se destacan las especies del género *Penicillium*, debido a que muchas de estas pueden presentar resistencia a los conservantes tradicionales frecuentemente empleados en este tipo de productos.

1.6.1. Caracterización del género *Penicillium* sp.

Penicillium sp. es un género de hongos pertenecientes a la división de ascomicetos, y comprende más de 300 especies de las cuales una gran mayoría son habitantes del suelo, pero pueden crecer en diversos sustratos como granos de cereal, paja, frutas entre otros. Muchas de las especies se caracterizan por producir metabolitos que son de interés industrial, como la penicilina (Martínez, 2003). Además de los metabolitos de interés industrial, estos hongos también resultan de relevancia dado que, afectan la alimentación humana y animal al causar deterioro de los alimentos y al producir micotoxinas (Carvajal-Moreno, 2022). A nivel taxonómico, el género *Penicillium* pertenece al reino Fungi, filo *Ascomycota*, clase *Eurotiomycetes* y Familia *Aspergillaceae* (Oxford, 2020).

Este género se caracteriza principalmente a nivel microscópico por la estructura que presenta el conidióforo (estructura de reproducción asexual) el cual se asemeja a la forma de un pincel; por tal motivo, recibió el nombre de *Penicillium* que se deriva del latín *Penicillius* y significa pincel (Martínez, 2003). Los conidios se pueden visualizar formando cadenas que se derivan de una célula especializada denominada fiálide. Las fiálides pueden tener 2 formas características: ampuliformes que se asemejan a la forma de una botella o acerosas que son similares a la forma de una aguja (**Figura 3**); esta forma permite subdividir este género en subgéneros: *Aspegilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* y *Biverticillium*, en donde los tres primeros tienen fiálides ampuliformes y el último tiene fiálides acerosas. Cuando se divide el núcleo de la fiálide, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada (Carrillo, 2003; Martínez, 2003). El segmento de la pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas se denomina conectorio, y en algunas especies se puede ver claramente con el microscopio óptico. Los conidios son esféricos o elipsoidales, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris (Carrillo, 2003).

Los conidióforos pueden presentar ramificaciones las cuales se disponen formando verticilos; según esta característica se pueden clasificar en: monoverticilados, biverticilados, terverticilado o cuaterverticilado, lo que también permite dividir el género en subgéneros, por ejemplo, si son monoverticilados se clasifican en el subgénero *Aspegilloides*, si son biverticilados se pueden clasificar en los subgéneros *Furcatum* o *Biverticillium*, mientras que, si son ter o cuaterverticilados se incluyen en el subgénero *Penicillium* (Martínez, 2003) (**Figura 4**). A nivel general en el conidióforo se puede reconocer otras partes como el estípote, la rama y la métula tal como se evidencian en la **Figura 5**. También es de relevancia mencionar que algunas especies del género *Penicillium* presentan reproducción sexual, por lo que tienen unas estructuras en las cuales se forman las ascosporas o esporas sexuales (Carrillo, 2003; Martínez, 2003).

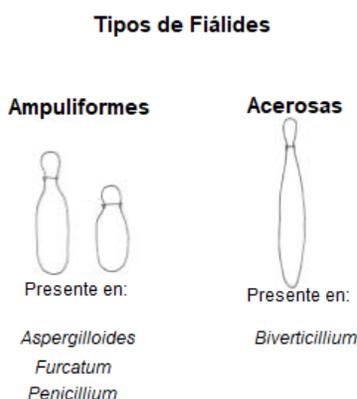


Figura 3. Tipos de fiálides en el género *Penicillium*. Tomado y adaptado de Martínez (2003).

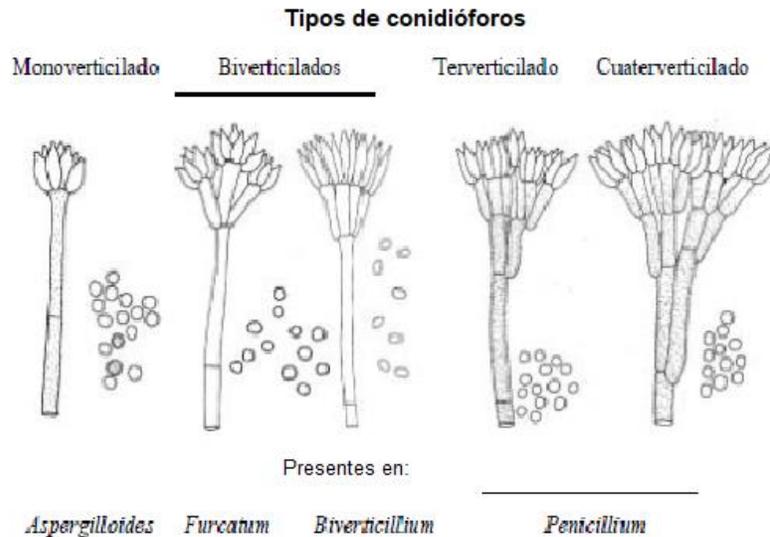


Figura 4. Tipos de conidióforos en el género *Penicillium*. Tomado y adaptado de Martínez (2003).

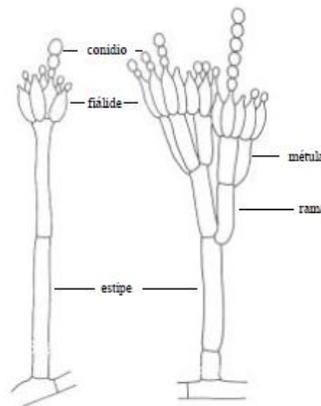


Figura 5. Partes del conidióforo en el género *Penicillium*. Tomado de Martínez (2003).

A nivel macroscópico el género *Penicillium* es muy diverso; las colonias de este género de hongos son por lo general circulares, ovoides, crecen de forma muy rápida y comienza siendo de color blanco. Dependiendo de la especie o factores abióticos como el sustrato de crecimiento, pueden las colonias presentar coloraciones verdes, verde azuladas, grises, rosadas entre otros. Los bordes por lo general son blancos, pero algunas especies pueden presentar bordes de coloraciones amarillas, anaranjadas, púrpuras o café claro (Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2020). En términos de la textura de la colonia, pueden ser planas o con surcos; pueden tener una apariencia algodonosa o velutinosa. Se ha demostrado también que algunas especies pueden producir exudados y el color cambia de una especie a otra. Adicionalmente, algunas especies producen pigmentos solubles que se difunden hacia el medio de cultivo y el color de estos pigmentos, al igual que el color de los exudados, también sirve como una característica que permite discriminar una especie de otra (Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2020) (**Figura 6**).

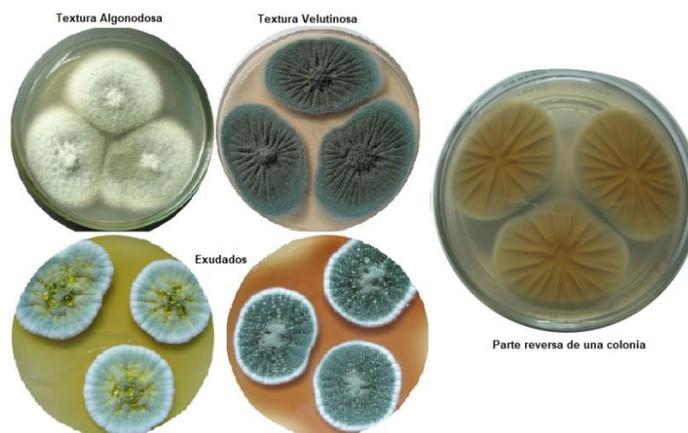


Figura 6. Ejemplos de características macroscópicas de colonias de *Penicillium*. Tomado y adaptado de proyecto Mohos productores de micotoxinas, UNAM (2020)

1.6.2. Factores abióticos óptimos de crecimiento para *Penicillium* sp.

El crecimiento de *Penicillium* sp., así como la producción de micotoxinas es dependiente de varios factores como la composición del sustrato, la temperatura, el pH, la actividad de agua y la interacción con otros microorganismos. A pesar de que existen variaciones de una especie a otra, el crecimiento y la producción de micotoxinas se da de forma óptima a temperaturas cercanas a los 25°C y a altos valores de actividad de agua (Casquete et al., 2018). Sin embargo, se ha evidenciado que diferentes especies pueden crecer a bajas temperaturas, pero con una menor velocidad de crecimiento e incluso, a actividades de agua cercanas a 0,8. En cuanto al pH, se ha visto que también es dependiente de la especie, pero en general pueden llegar a tolerar amplios rangos de pH, principalmente de 3 a 9; lo que demuestra la capacidad que tienen estos mohos para sobrevivir a condiciones adversas (Carrillo, 2003). Es de relevancia mencionar que las condiciones de crecimiento óptimo en todos los casos no son exactamente las condiciones óptimas de la producción de micotoxinas, por lo cual para cada especie se estudia ambas condiciones por separado (Carrillo, 2003; Casquete et al., 2018; Martínez, 2003). En la **Tabla 9** se puede evidenciar las temperaturas y actividades de agua óptimas para el crecimiento de algunas especies de este género.

Tabla 9. Condiciones de crecimiento de algunas especies del género *Penicillium*. Tomado de Carrillo (2003).

Especies	Temperatura (°C)		Actividad del agua	
	Rango	Óptimo	Mínima	Óptima
<i>P. aurantiogriseum</i>	-2 a 32	23	0,81 a 0,83	0,98
<i>P. brevicompactum</i>	12 a 30	23	0,80 a 0,82	0,99
<i>P. citrinum</i>	<5 a 37	26 a 30	0,80 a 0,84	-
<i>P. commune</i>	0 a 37	25	0,85	-
<i>P. digitatum</i>	6 a 37	20 a 25	0,90	0,99
<i>P. expansum</i>	-3 a 35	25 a 26	0,82 a 0,83	0,99

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Especies	Temperatura (°C)		Actividad del agua	
	Rango	Óptimo	Mínima	Óptima
<i>P. islandicum</i>	10 a 42	31	0,83 a 0,86	-
<i>P. roquefortii</i>	<5 a 35	25	0,83	0,99
<i>P. verrucosum</i>	0 a 31	20	0,80	-

Desde el punto de vista metabólico, el género *Penicillium* es heterótrofo capaz de degradar y usar como fuente de carbono la lignina, la celulosa, el almidón, monosacáridos y disacáridos como la glucosa, la sacarosa, la lactosa y la maltosa, por lo cual pueden crecer en el suelo, cereales, leguminosas, frutas, así como también en otros alimentos. En cuanto a la fuente de nitrógeno para su crecimiento, estos hongos pueden aprovechar diferentes fuentes, en el caso del medio de cultivo se suele emplear por ejemplo fosfato o sulfato de amonio y nitrato de sodio o de potasio, pese a ello se ha visto que la limitación de este macronutriente favorece la conidiogénesis para algunas especies (Tibasosa, 2014). Por otro lado, este género puede crecer con bajas concentraciones de oxígeno y se ha visto que a altas concentraciones de CO₂ se puede inhibir el crecimiento; sin embargo, esta característica depende de la especie, por ejemplo, *P. roquefortii* puede tolerar altas concentraciones de CO₂, pero se ha observado que atmósferas con 80% CO₂ y <1% O₂ inhiben su crecimiento (Carrillo, 2003; Martínez, 2003).

1.6.3. Patogenicidad de *Penicillium* sp. en alimentos

Como se mencionó con anterioridad, varias especies de este género producen distintos metabolitos secundarios, entre ellos ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, cicloclorotina, citroviridina, citrinina, griseofulvina, ocratoxina A, patulina y penitrem A. Todos estos metabolitos tienen como función la defensa en su ambiente natural y sirven como método de competencia frente a otros organismos por el sustrato (Carrillo, 2003). Las micotoxinas como la Ocratoxina A se encuentran reguladas por normativas puesto que pueden causar distintas afecciones en salud, destacando que se comportan como carcinogénicas, y son muy frecuentes encontrarlas en granos de cereales como el maíz, teniendo en cuenta que además de *Penicillium* otros géneros como *Aspergillus* pueden producir también estas toxinas (Soares et al., 2013). En la **Tabla 10** se presentan las micotoxinas producidas por *Penicillium* más frecuentemente encontradas en los alimentos (Marqués, 2015; Pitt, 2002), mientras que, en la **Tabla 11** se evidencian las implicaciones en salud que pueden generar las micotoxinas de diferentes mohos que crecen comúnmente en los alimentos (Pawlowska et al., 2012).

Tabla 10. Micotoxinas producidas por *Penicillium* frecuentemente encontradas en alimentos.

Tomado de Marqués (2015) y Pitt (2002).

Micotoxina	Alimento implicado
Ácido penicílico	Cebada, centeno, judía, maíz, manzana, queso
Ácido secalónico D	Arroz, cebada, maíz, sorgo, trigo, soya
Luteosquirina	Arroz, yogurt

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Micotoxina	Alimento implicado
Penitremos	Carne, crema, fruta, huevos, nuez, queso
Roquefortina A, B, C y D	Quesos, ensilados
Rubratoxinas	Maíz, trigo
Toxina islandi	Arroz
Patulina	Manzanas
Citrinina	Arroz, trigo, cebada, maíz, cacahuate, pistacho

Tabla 11. Micotoxinas en alimentos y su efecto en salud.
Tomado de Pawlowska et al. (2012).

Micotoxinas	Hongo micotoxigénico	Alimento contaminado	Efecto en salud
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Cereales, maíz, nueces, leche y productos lácteos	Carcinógeno, mutagénico, teratogénico, inmunosupresivo, Kwashiorkor (desnutrición proteica)
Fumomisin	<i>Fusarium</i> spp.	Cereales, maíz, higos, te herbal, leche bovina, ensilaje	Apoptosis, carcinógeno, hepatotóxico, nefrotóxico, inmunosupresivo, enfermedad de Kashin-Beck, leucoencefalomacia, edema pulmonar, hidrotórax, defectos en el tubo neural.
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereales, maíz, café, cacao, uvas, vino, hierbas, cerdo	Carcinógeno, nefrotóxico, inmunosupresivo, teratogénico
Patulina	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Byssochlamys</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium expansum</i>	Frutas, ensilaje	Apoptosis, carcinógeno, genotóxico, inmunosupresivo, estrés oxidativo
Tricotecenos	<i>Fusarium</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Stachybotrys</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Trichotecium</i> spp.	Cereales	Inmunosupresivo
zearalenona	<i>Fusarium</i> spp.	Cereales	Hiperestrogénico

1.7. Caracterización del lactosuero

Se estima que el 85% de la leche empleada para la producción de quesos es descartada como lactosuero; este subproducto contiene el 55% de los nutrientes presentes en la leche, por lo que este efluente presenta un alto potencial para su uso en diversas aplicaciones biotecnológicas teniendo en cuenta dicha composición nutricional. Pese a ello, al 2016 se estimaba que solo el 50% del lactosuero

generado en el mundo era tratado para su aprovechamiento, y de este porcentaje el 50% se empleaba de forma líquida, 30% en forma de lactosuero en polvo, el 15% como lactosa y otros componentes y un 5% como concentrado proteico (Tavares & Malcata, 2015). A nivel industrial, al lactosuero hoy en día se le ha valorizado principalmente por su contenido de proteína, por lo que es usado para el desarrollo de suplementos proteicos; al 2019 se estimaba que el mercado de estos suplementos alcanzaba los 7871.5 millones de dólares (Chourasia et al., 2022). Pese a ello, en la industria de alimentos se usa también para diferentes aplicaciones en productos de panadería, lácteos, cárnicos, alimentos funcionales y confitería; por ejemplo, en el caso de productos de panadería se emplea como emulsificante, reemplazo del huevo, para dar cuerpo a la masa e incrementar el valor nutricional; en bebidas se emplea como gelificante y para mejorar propiedades organolépticas, entre otras funciones (Poveda, 2013).

Existen dos tipos de lactosuero; ambos se producen durante la coagulación de las proteínas que finalmente constituyen el queso y difieren en la forma en cómo se obtienen; el lactosuero dulce se produce por la coagulación enzimática de las proteínas de la leche en la que se emplea la enzima renina normalmente a pH 6.5, mientras que, el ácido se obtiene por la coagulación realizada mediante la adición directa de ácidos o la fermentación, por ejemplo, durante la elaboración de quesos tipo cottage (Chourasia et al., 2022). En la **Tabla 12** se puede observar la composición nutricional de cada tipo de lactosuero; de esta se evidencia que tienen diferencias composicionales, pese a ello, se destaca en ambos su contenido de lactosa y de proteína (Parra, 2008).

Tabla 12. Composición nutricional de ambos tipos de lactosuero
Tomado de Panesar et al. (2007), Parra (2008).

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Proteína	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

Las proteínas son de los componentes nutricionales que más hace atractivo al lactosuero, puesto que, además de su aporte nutricional esta fracción proteica puede generar diversos efectos benéficos en la salud. Igualmente, la calidad de las proteínas presentes se considera alta debido a su alta puntuación DIAAS (Aminoácidos indispensables digeribles), lo que hace que este sea una fuente barata de aminoácidos de buena calidad (Chourasia et al., 2022). Dentro de las proteínas presentes en el lactosuero se destacan la β -lactoglobulina que constituye alrededor del 50% de las proteínas del suero, y es fuente de aminoácidos esenciales como la leucina; la α -lactoalbúmina es el 20% de las proteínas del lactosuero y se caracteriza porque contiene un alto valor nutritivo debido a la presencia de

aminoácidos esenciales como triptófano, lisina y cisteína. Otras proteínas que constituyen el suero son las lactoferrinas, caseino-macropéptidos (CMP), inmunoglobulinas (Ig), lactoperoxidasas, albúmina de suero bovino (BSA), osteopontinas y proteasa peptona 3 (PP3) (Chourasia et al., 2022).

Además del alto valor nutricional de las proteínas presentes en el lactosuero, estas son de gran utilidad en la industria de alimentos por su funcionalidad tecnológica puesto que sirven como agentes emulsificantes, gelificantes y para formación de espuma. Por tal motivo, en la valorización del lactosuero está en auge el aprovechamiento de las proteínas presentes en el mismo mediante su separación principalmente por ultrafiltración. En el mercado estas proteínas están disponibles en tres presentaciones: concentrado de suero (WPC), aislado del suero (WPI) y suero hidrolizado (WPH) (Dinika et al., 2020). El WPC es la forma más común en la que se comercializa la proteína del lactosuero y se caracteriza porque contiene alrededor de 70%-80% de proteína; el WPI es más bajo en grasa y en lactosa, pero contiene un 90% o más de proteína, mientras que, el WPH se caracteriza porque la proteína presente se ha hidrolizado en parte para producir péptidos que son de mayor digestión además que tienen una mayor bioactividad (Mehra et al., 2021).

En diferentes estudios se ha demostrado que la hidrólisis de las proteínas del lactosuero conlleva a la formación de péptidos que incrementan la actividad biológica del mismo, además que confiere distintas propiedades benéficas en la salud y algunas funcionalidades en los alimentos, por ejemplo, los péptidos derivados de la lactoferrina se asocian a una actividad antioxidante, anticancerígena, inmunomoduladora, antiviral y bacteriostática (Mehra et al., 2021); igualmente, los péptidos producto de la hidrólisis de la lactoperoxidasa se asocian con propiedades antibacterianas. Adicionalmente, estos péptidos también se han relacionado con efecto antifúngico, por lo que el lactosuero constituye una alternativa interesante para inhibir el crecimiento de hongos causantes del deterioro de muchos alimentos (Madureira et al., 2010).

1.7.1. Péptidos bioactivos del lactosuero para extensión de vida útil en alimentos

Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos proteicos que se encuentran inactivos en la secuencia de sus precursores pero, cuando son liberados mediante la hidrólisis enzimática, quedan libres para interactuar con los receptores apropiados y regular principalmente funciones fisiológicas en el cuerpo humano, generando un efecto positivo en la salud (Tkaczewska, 2020) ya que se relacionan por lo general con propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras, antihipertensivas actuando como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, anticoagulantes, además que tienen muchos de ellos un marcado efecto antimicrobiano, antifúngico y antiviral (Dinika et al., 2020; Tkaczewska, 2020).

Los péptidos bioactivos del lactosuero se pueden generar principalmente por tratamiento enzimático con proteasas como la tripsina, papaína, bromelina, alcalasas y mezclas de proteasas que se comercializan frecuentemente para

aplicaciones tecnológicas en la industria láctea; o por fermentación microbiana con bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis*, siendo ambos métodos sencillos y económicamente viables de aplicar en una escala industrial (Dinika et al., 2020). En la industria alimentaria estos péptidos bioactivos tienen potencial aplicación como estrategia para la extensión de vida útil de alimentos perecederos por su propiedad antioxidante, que evitaría la oxidación de nutrientes que producen cambios sensoriales en el mismo, su propiedad antimicrobiana y antifúngica, que evitaría el deterioro del alimento causado por bacterias, levaduras y mohos (Brandelli et al., 2015).

La bioactividad así como la cantidad de péptidos generados mediante la hidrólisis de las proteínas presentes en el lactosuero depende del tipo de enzima empleado (Dinika et al., 2020; Monari et al., 2019); por ejemplo, en el estudio realizado por Monari et al. (2019) se evaluó el efecto diferencial que tiene los péptidos generados mediante 9 tipos de proteasas: pancreatina, papaína, bromelina, tripsina, quimiotripsina, Flavourzyme®, Alcalase®, Neutralse® y Protamex® sobre el lactosuero del queso ricotta previamente ultrafiltrado; encontrando que basado en el rendimiento de proteína digerida, bioactividad de los péptidos y costos del procesamiento, los mejores tratamientos fueron los de pancreatina (3% enzima; incubación a 37°C por 1 hora) y papaína (5% enzima, incubación 60°C por 1 hora), adicionalmente se evidenció que el tratamiento con papaína produjo la mayor cantidad de péptidos de bajo peso molecular con una alta actividad antioxidante y antitirocinasa.

De igual forma, la bioactividad y la cantidad de péptidos obtenidos de la hidrólisis del lactosuero también son dependientes de la cantidad de enzima empleada (Morais et al., 2015); por ejemplo, Morais et al. (2015), evaluó la hidrólisis del lactosuero WPC con 4 proteasas: pancreatina, Corolase LAP®, Alcalase® y Flavourzyme®, identificando la relación enzima:sustrato que mayor rendimiento y funcionalidad de los péptidos permitía obtener; concluyendo que para las enzimas pancreatina, Corolase LAP® y Flavourzyme® dichos parámetros evaluados (rendimiento y funcionalidad de los péptidos) se optimizaban cuando se emplea las relaciones enzima:sustrato más bajas, mientras que, para Alcalase® estos parámetros se optimizaban con las mayores relaciones de enzima:sustrato,. Por otro lado, se ha evidenciado que la funcionalidad de los péptidos se aprovecha aún más para su uso en alimentos cuando luego de la hidrólisis se hace un proceso de concentración o purificación de dichos péptidos mediante técnicas de ultrafiltración o cuando se hace la hidrólisis directamente en un reactor de membrana (Dinika et al., 2020).

De la hidrólisis del lactosuero bovino se han identificado diferentes péptidos bioactivos entre ellos: albutensina A, lactoferrina, serorfina, α -lactorfina, β -lactorfina y β -lactotensina; la mayoría de estos y otros péptidos se producen por la hidrólisis enzimática de las proteínas α -lactoalbúmina (α -LA) y β -lactoglobulina (β -LG) (Dinika et al., 2020); sin embargo, se ha identificado también péptidos

provenientes de la hidrólisis de la albúmina del suero bovino, lactoperoxidasa, lactoferrina e inmunoglobulina. A nivel del potencial antimicrobiano, se ha estudiado de forma amplia los péptidos derivados de la hidrólisis de la lactoferrina, principalmente el péptido lactoferricina, que tiene efecto frente a bacterias Gram positivas como *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus* spp.; Gram negativas como *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* spp.; levaduras como *Trichosporum cutaneum* y *Candida albicans* además de un efecto inhibitorio frente a otros hongos e incluso virus (Dinika et al., 2020; Madureira et al., 2010).

Existen diferentes mecanismos que se asocian con el potencial antimicrobiano de la hidrólisis de la lactoferrina, entre ellos, unión a la superficie celular, ruptura de membranas celulares, rupturas de membranas externas por liberación de lipopolisacáridos y alteración de la membrana celular por formación de canales iónicos (Dinika et al., 2020; Farnaud & Evans, 2003; Jenssen & Hancock, 2009). Pese a los diferentes estudios que existen en torno al potencial antimicrobiano de la lactoferricina, también se ha demostrado el efecto en otros péptidos provenientes de la hidrólisis de proteínas del lactosuero como la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, pero que no han sido tan ampliamente estudiados como la lactoferricina (Chatterton et al., 2006; Dinika et al., 2020; Hernández-Ledesma et al., 2011).

El efecto antifúngico de los péptidos provenientes de la hidrólisis de proteínas presentes en el lactosuero también ha sido estudiado; sin embargo, no tan ampliamente como se ha evidenciado en torno al efecto antimicrobiano (Luz et al., 2020). Del efecto antifúngico se ha evaluado los péptidos provenientes de la hidrólisis de proteínas de lactosuero bovino, caprino y de camello, mediante estudios *In vitro* y aplicaciones directamente en alimentos; por ejemplo, Luz et al. (2020) evaluaron el efecto antifúngico y antimicotoxigénico del lactosuero de cabra hidrolizado con un tratamiento enzimático de tripsina (333 mg/L; incubado a 37°C por 24, 48 y 72 horas) sobre especies de hongos correspondientes al género *Penicillium* sp.; obteniendo como resultado que este subproducto exhibe dicho efecto de interés, igualmente, al aplicarlo en panes pita se observó que mejoró el desempeño del producto en vida útil del mismo.

De igual forma, se ha evidenciado el efecto antifúngico que tienen los hidrolizados de la lactoferrina bovina y caprina (Dopazo et al., 2023; Liceaga-Gesualdo et al., 2001), por ejemplo, Liceaga-Gesualdo et al. (2001) evidenciaron que un hidrolizado de la lactoferrina bovina aislada del lactosuero, generado mediante la hidrólisis con pepsina porcina (3% p/p enzima:sustrato, incubado a 37°C por 4 horas) es capaz de inhibir la germinación y el crecimiento micelial de las esporas del hongo *Penicillium* sp. Adicionalmente, Dopazo et al. (2023) evidenciaron que un hidrolizado del lactosuero de cabra generado mediante fermentación con *Lactiplantibacillus plantarum* 5L1 logró aumentar la vida útil de una fórmula de pan en comparación con una misma fórmula de pan pero con propionato de calcio,

inhibiendo el crecimiento de mohos como *Penicillium verrucosum*, sin afectar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales características del producto.

Actualmente, no se evidencian estudios en los cuales se evalúe el efecto antifúngico del lactosuero o de hidrolizados del lactosuero en productos tradicionales como las arepas, pese a las altas afectaciones que tienen estas por la contaminación con mohos. No obstante, si existen estudios en los cuales se ha evaluado el uso de preservantes naturales para la extensión de su vida útil (Gamba et al., 2016) principalmente al inhibir del crecimiento de mohos, siendo este el caso de la investigación realizada por Gamba et al. (2016), en la cual se evaluó el efecto antifúngico sobre una cepa de *Aspergillus* sp. de la leche fermentada con kéfir, obteniendo como resultado que si existe dicho efecto antifúngico y que cuando se aplica en arepas esto mejora su desempeño en la vida útil, comparado con arepas elaboradas con conservantes tradicionales como el ácido sórbico.

2. Problema de investigación y objetivos

2.1. Planteamiento del problema

El crecimiento de hongos es un desafío para las empresas que se dedican a la producción de arepas y otros alimentos a base de maíz. Esta problemática conlleva importantes pérdidas económicas, asociadas a devoluciones de producto, alcanzando en algunos casos pérdidas alarmantes que oscilan entre los 200 y 700 millones de pesos mensuales, siendo estas cifras reportadas por una de las empresas productoras de arepas con mayor participación en el mercado colombiano. A su vez, esta problemática tiene un impacto negativo en las ventas, ya que afecta la credibilidad y la imagen de la marca. Adicionalmente, la alta susceptibilidad de estos productos a la contaminación con mohos hace que la vida útil sea corta, un aspecto que a la fecha sigue siendo de los principales obstáculos para que productos a base de maíz, tradicionales como las arepas ganen mayor participación en el mercado internacional, pese a que la exportación trae consigo ganancias económicas significativas tanto para las empresas productoras como para la economía del país en general.

Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* entre otros mohos se encuentran presentes de forma habitual en el maíz (Carvajal, 2022), y su crecimiento se ve favorecido en condiciones de alta humedad y temperatura, siendo condiciones climáticas típicas en muchas regiones de Colombia donde se cultiva este cereal; de igual forma, las malas condiciones de almacenamiento y la trilla del grano favorece la proliferación de estos mohos, por lo que la probabilidad con la cual ingresa maíz contaminado a las empresas productoras de arepas y de otros alimentos a base de maíz es muy alta. Adicionalmente, las arepas, son alimentos que tienen alta humedad y actividad de agua, pese a que se ofertan en el mercado como productos precocidos, lo que las hace más susceptibles a la contaminación microbiológica; sin embargo, reducir el porcentaje de humedad es una alternativa poco factible al implicar una disminución en los rendimientos y la productividad, así como problemas en el desempeño del producto asociados con partimiento y cambios en las características sensoriales del mismo (Corpas & Tapasco, 2012, 2013); por otro lado, las pérdidas de la cadena de frío durante el suministro y transporte de los alimentos implican un aumento de la temperatura del producto, favoreciéndose a su vez el crecimiento de microorganismos.

En las empresas productoras de arepas normalmente se suele emplear conservantes tradicionales destacando el ácido sórbico y propionato de calcio, pese a ello se ha visto que estos conservantes son muy dependientes de las condiciones fisicoquímicas del producto como por ejemplo el pH, puesto que, a algunos valores el efecto de estos conservantes se puede ver disminuido, incluso se ha evidenciado que la adición en conjunto de varios conservantes pueden reducir el efecto de los mismos (Corpas & Tapasco, 2012, 2013). A su vez, aumentar la proporción de conservantes en las formulaciones para evitar el crecimiento de hongos, tampoco resulta una alternativa viable considerando que la cantidad de estos aditivos en los alimentos está altamente regulada en el mercado nacional e internacional, además

que su aumento conlleva a la generación de notas metálicas residuales que afectan el perfil sensorial típico del producto. Por tal motivo, se quiere evaluar nuevos conservantes naturales que presenten un alto efecto antifúngico, no afecten el perfil sensorial del producto y que preferiblemente su efecto no se vea disminuido durante pérdidas en la cadena de frío.

2.2. Objetivos

2.1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico del lactosuero WPC 80 pretratado mediante hidrólisis con proteasas, sobre el hongo *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca.

2.1.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antifúngico sobre el hongo *Penicillium* sp. del lactosuero WPC 80 pretratado mediante hidrólisis con diferentes tipos de proteasas.
- Evaluar el impacto de los hidrolizados del lactosuero WPC 80 seleccionados, sobre la estabilidad fisicoquímica, sensorial y microbiológica durante el tiempo de vida útil habitual de formulaciones de arepas de maíz y de yuca en ambientes con y sin refrigeración.

2.3. Hipótesis

El lactosuero WPC 80 pretratado mediante hidrólisis con proteasas tiene efecto antifúngico frente al hongo *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca.

3. Metodología

3.1. Materiales y reactivos

Reactivos

El medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) empleado para la evaluación del efecto antifúngico fue adquirido de Condalab (Madrid, España). El lactosuero WPC 80 (ISO Chill® 8010) utilizado en los diferentes ensayos de hidrólisis enzimática fue adquirido de Agropur Inc. (Canadá). Algunas de las enzimas empleadas para la hidrólisis del lactosuero fueron previstas por Novozyme (Dinamarca) siendo estas: Formea® LT 1200 BG, Alcalase® Pure 2.4 L y Protamex®. La papaína (Papaína 4000 DB) fue obtenida de Proenzymas S.A.S (Cali, Colombia), mientras que, la Tripsina (Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino) se obtuvo de Sigma-Aldrich.

Material biológico

El moho de estudio se obtuvo del cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional; una cepa previamente aislada e identificada como *Penicillium* sp.

Ingredientes

Para la elaboración de las arepas todos los ingredientes fueron previstos por Don Maíz S.A.S, una compañía colombiana. Las marcas y características de los ingredientes empleados no son detallados por confidencialidad de la compañía.

3.2. Activación de la cepa

Previo a la activación de la cepa se realizó una identificación microscópica de la misma mediante la técnica de microcultivo; para tal propósito se cortó un cuadro de agar PDA de 1 cm x 1cm y se colocó sobre un portaobjetos, posteriormente se inoculó este cuadro con micelio del hongo, tomado de una caja con *Penicillium* sp. incubada por 5 días a 27°C; la inoculación se hizo en las 4 esquinas y el centro del cuadro. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre el cuadro de agar PDA inoculado y se transfirió a una caja Petri que contenía dos bases de apoyo sobre las cuales se dispuso el portaobjetos. Una vez dispuesto el portaobjetos, se adicionó glicerina hasta alcanzar las bases del portaobjetos, sin que la glicerina tocara el cuadro de agar inoculado. Una vez adicionada la glicerina a la caja Petri se colocó la tapa superior de la misma y se llevó a incubación por 3 días a 27°C. Culminados los 3 días de incubación se tomó el cubreobjetos con una pinza y se colocó encima de un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Luego de ello, esta placa fue observada al microscopio óptico para identificar las estructuras características (conidióforo) del *Penicillium* sp. a estudiar. El montaje empleado para el microcultivo se puede observar en la **Figura 7**. Para la activación de la cepa de *Penicillium* sp. se hicieron siembras sucesivas en agar PDA, las cuales a su vez fueron de utilidad para la caracterización macroscópica de la cepa.

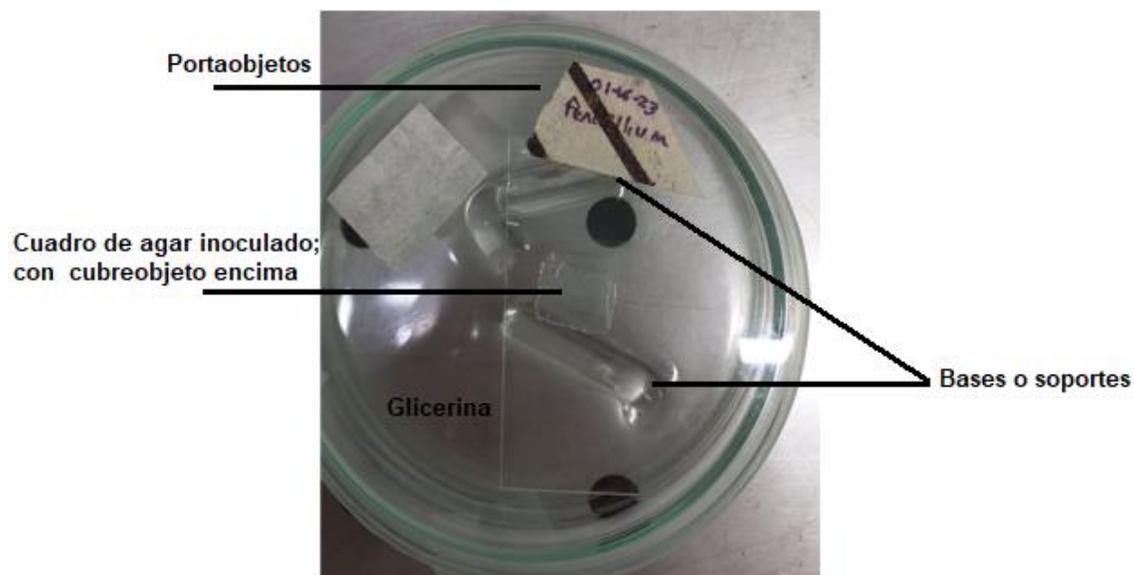


Figura 7. Montaje de microcultivo.

3.3. Hidrólisis enzimática del lactosuero

El lactosuero WPC 80 fue reconstituido con agua destilada para preparar una solución a una concentración de 100 g/L. Posteriormente, fue sometido a un tratamiento térmico en Thermomix, a una temperatura de 70°C por 4 minutos con agitación constante. El lactosuero reconstituido se transfirió a un cuarto frío con una temperatura de -10°C por 20 minutos. Posteriormente, se realizó la hidrólisis enzimática de acuerdo al diseño experimental evidenciado en la **Tabla 13**. Es de relevancia mencionar que los valores de pH, temperatura de incubación y la relación Enzima:Sustrato se definieron de forma independiente para cada enzima, teniendo en cuenta las recomendaciones mencionadas en las fichas técnicas de las mismas, en aras de garantizar las condiciones óptimas para el mayor porcentaje de hidrólisis de las proteínas del lactosuero. Una vez finalizado el tiempo de incubación en cada tratamiento, se inactivó la enzima por calor en un baño maría a 90°C por 5 min. Luego de ello, cada tratamiento fue almacenado 24 horas a -80°C y posteriormente liofilizado. Los liofilizados fueron almacenados a -20°C hasta su uso en los ensayos posteriores.

Tabla 13. Tratamientos de hidrólisis enzimática evaluados.

Tratamiento	Enzima	pH de hidrólisis	Temperatura incubación (°C)	Tiempo de incubación (h)	Relación Enzima:Sustrato
1	Formea® LT 1200 BG	8,0	60	6	1:120
2	Formea® LT 1200 BG	8,0	60	24	1:120
3	Alcalase® Pure 2.4 L	8,0	60	6	1:120
4	Alcalase® Pure 2.4 L	8,0	60	24	1:120
5	Protamex®	8,0	60	6	1:120
6	Protamex®	8,0	60	24	1:120
7	Papaína 4000 DB	6,5	37	24	1:200

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tratamiento	Enzima	pH de hidrólisis	Temperatura incubación (°C)	Tiempo de incubación (h)	Relación Enzima:Sustrato
8	Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino	8,0	37	24	1:240

3.4. Evaluación de la actividad antifúngica en medio de cultivo

Para la evaluación del efecto antifúngico se preparó medio de cultivo PDA y se ajustó su pH a 5, posteriormente se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizado el medio de cultivo, se adicionaron de forma independiente los hidrolizados obtenidos según el literal anterior a una concentración de 6667 ppm. Igualmente, se adicionaron de forma independiente los conservantes tradicionales frecuentemente empleados para la elaboración de arepas a su máxima concentración permitida, bajo la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social, en este caso: ácido sórbico a una concentración de 1000 ppm, propionato de calcio a 3000 ppm y una mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio a 874 ppm y 499 ppm, respectivamente. Una vez disuelto el hidrolizado o conservante tradicional en el medio PDA aún líquido, se sirvió 15 mL de medio con cada tratamiento en cajas Petri de 100x15 mm. Luego de ello, se sembró en el centro de las cajas Petri un explante discoidal de 1cm de diámetro, el cual fue tomado con un sacabocados de una caja Petri con *Penicillium* sp. con 5 días de incubación a 27°C. Cada tratamiento se realizó por triplicado; como control se empleó el medio de cultivo PDA sin ningún aditivo y a su vez se evaluó el medio de cultivo PDA con lactosuero sin hidrolizar adicionado a la misma concentración que los hidrolizados en estudio.

Una vez sembradas las cajas Petri correspondientes a cada tratamiento, se incubaron a 27°C por 11 días evaluado el crecimiento del moho; para ello se midió diariamente en cada unidad experimental el diámetro del micelio, y se identificaron los cambios en las características macroscópicas observadas en cada tratamiento a lo largo de los 11 días de estudio. Para cuantificar el efecto inhibitorio de cada tratamiento sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. se calculó la inhibición del crecimiento micelial (MGI), que es una relación matemática porcentual que mide la diferencia entre los diámetros de crecimiento del control con respecto al de los tratamientos evaluados; su expresión matemática se puede evidenciar en la ecuación (1), donde DC corresponde al diámetro de las colonias en el medio control y DO el diámetro de las colonias en los tratamientos (Marqués, 2015). Los detalles del diseño experimental realizado se pueden evidenciar a continuación en la **Tabla 14**.

$$\text{Inhibición de crecimiento micelial (MGI)}(\%) = \left(\frac{DC-DO}{DC} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Tomado de Marqués (2015).

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tabla 14. Diseño experimental para evaluación de actividad antifúngica.

N° Unidad experimental	N° Tratamiento	Conservante evaluado
1	1	Hidrolizado de Formea® LT 1200 BG 6 horas; 6667 ppm
2		
3		
4	2	Hidrolizado de Formea® LT 1200 BG 24 horas; 6667 ppm
5		
6		
7	3	Hidrolizado de Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas; 6667 ppm
8		
9		
10	4	Hidrolizado de Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas; 6667 ppm
11		
12		
13	5	Hidrolizado de Protamex® 6 horas; 6667 ppm
14		
15		
16	6	Hidrolizado de Protamex® 24 horas; 6667 ppm
17		
18		
19	7	Hidrolizado de Papaína 4000 DB 24 horas; 6667 ppm
20		
21		
22	8	Hidrolizado de Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas; 6667 ppm
23		
24		
25	9	Ácido sórbico 1000 ppm
26		
27		
28	10	Propionato de calcio 3000 ppm
29		
30		
31	11	Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm
32		
33		
34	12	Lactosuero sin hidrolizar
35		

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

N° Unidad experimental	N° Tratamiento	Conservante evaluado
36		
37	13	Control
38		
39		

3.5. Análisis estadístico para selección del hidrolizado

Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, en términos del efecto antifúngico, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) teniendo los diámetros obtenidos en el día 2 y día 11 de incubación. De igual forma, se efectuaron posteriormente unas pruebas que permitieron identificar los tratamientos que diferían significativamente, así como agrupar los tratamientos con un comportamiento semejante, en este caso, empleando el método de Tukey. Por último, se realizó otra prueba de comparación múltiple usando el método MSB de Hsu, el cual permite identificar el mejor tratamiento y según esto, definir cuáles tratamientos difieren de forma significativa con respecto al mejor tratamiento, siendo este método más preciso que el de Tukey. Para dichos análisis estadísticos se utilizó el software Minitab 17, teniendo en cuenta un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5%.

3.6. Evaluación del impacto en vida útil del lactosuero hidrolizado seleccionado en arepas de maíz y de yuca

Del diseño experimental realizado se seleccionó el hidrolizado con mayor efecto antifúngico y se evaluó el impacto de uso como conservante en arepas de maíz y de yuca. Para este propósito se prepararon 5 formulaciones de arepa de maíz que diferían cada una en el conservante empleado, siendo estas: formulación sin adición de conservantes, formulación con adición de ácido sórbico y propionato de calcio a 874 ppm y 499 ppm, respectivamente, formulación con adición de ácido sórbico a 500 ppm, formulación con adición del hidrolizado seleccionado a 6667 ppm y formulación con adición de ácido sórbico y el hidrolizado ambos a 500 ppm. De igual forma, se prepararon 5 formulaciones iguales a las mencionadas anteriormente, pero con una masa base para arepas de yuca. Los ingredientes empleados para su preparación se especifican en la **Tabla 15**; sin embargo, el detalle de las cantidades empleadas no se especifica al ser parte de secreto empresarial.

Para la elaboración de las arepas, todos los ingredientes mencionados fueron mezclados en una amasadora por 8 minutos (4 minutos en velocidad mínima y 4 minutos en velocidad máxima). El maíz empleado para la elaboración de las formulaciones fue maíz trillado del Valle del Cauca, el cual fue previamente cocinado y molido mediante los métodos típicos de cocción y molienda industrial empleados en Don Maíz S.A.S. De igual forma, el queso utilizado en las formulaciones fue previamente molido en molino industrial para facilitar su homogenización durante el amasado. Luego del amasado, se realizó el troquelado (formado) de las arepas utilizando un molde de 9,5 cm, de tal manera que las arepas tanto de maíz como de

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

yuca quedaron con un diámetro de 9 cm, un espesor de 0,5 cm y un peso de 40 g, luego de la precocción. Una vez formadas las arepas, estas pasaron por un proceso de precocción que se hizo en plancha, alcanzando una temperatura interna de producto mínima de 75°C, por 9 minutos para las arepas de maíz y 7 minutos para las arepas de yuca. Finalizado el proceso de precocción, se hizo un choque térmico mediante el almacenamiento de las arepas en cuarto frío a 4°C por 23 minutos. Todas las arepas fueron finalmente empacadas de forma individual en bolsas de polietileno de baja densidad, selladas con cinta.

De cada formulación se prepararon 19 arepas que se almacenaron de la siguiente manera: 8 fueron almacenadas a temperatura ambiente del laboratorio de Don Maíz S.A.S (Cuarto con temperatura que oscila entre 19°C y 25°C con una humedad relativa que varía entre 41% a 76%), otras 8 fueron almacenadas en cava de refrigeración de Don Maíz S.A.S (Cuarto con temperatura que oscila entre 1,6°C y 5,7°C) y 3 se destinaron para la prueba de actividad antifúngica con inoculación directa. En aras de evidenciar el impacto del uso del hidrolizado seleccionado en la vida útil de las arepas de maíz y de yuca, se evaluó por 50 días la aparición de mohos mediante inspección visual de todas las formulaciones elaboradas, determinando diariamente el porcentaje de arepas contaminadas con mohos.

Para evaluar el impacto en las propiedades fisicoquímicas se midió en todas las formulaciones el pH y el porcentaje de humedad. El pH fue medido con tester de pH para pan y masas HI 981038 marca HANNA® previamente calibrado, introduciendo el electrodo al interior de la arepa y esperando su estabilización para tomar el dato real de pH; el porcentaje de humedad fue medido en termobalanza marca OHAUS® serie B823966029 Modelo MB120 previamente calibrado para su aplicación en masas y en arepas de producto terminado; para esta medición se emplearon 5 g del producto el cual fue previamente desmoronado de forma manual para reducir el tamaño de partícula y facilitar la medición. La termobalanza estaba configurada para un secado a 160°C por el tiempo requerido hasta la no detección de variación en el peso de la muestra. Las mediciones de pH y porcentaje de humedad se realizaron al inicio, mitad y final de los 50 días de duración del estudio en arepas refrigeradas; mientras que, en las arepas almacenadas en cuarto ambiente se midió al inicio y final de los 50 días de seguimiento.

A su vez, se evaluó el impacto sensorial mediante prueba preferencial con cinco personas integrantes del panel entrenado de Don Maíz S.A.S., a los mismos tiempos que los definidos para las pruebas fisicoquímicas, principalmente a las arepas en refrigeración que representaban un menor riesgo de contaminación microbiana, previniendo posibles ETAs (Enfermedades Transmitidas por los Alimentos). Para dicha prueba preferencial, a cada panelista se le entregaba una bandeja con las cinco formulaciones de arepas identificadas con números de tres cifras así: 465, formulación con mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio a 874 ppm y 499 ppm, respectivamente; 780, formulación con ácido sórbico a 500 ppm, 652, formulación ácido sórbico y el hidrolizado ambos a 500 ppm; 345, formulación con el hidrolizado a 6667 ppm y 234 para la formulación sin adición de

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

conservantes. Al tiempo en que se le entregaba las bandejas con muestra se envía un formulario en formato virtual en el cual podían responder en tiempo real preguntas referentes a la mejor fórmula en cuanto a sabor general, así como categorizar la acidez de cada formulación, al ser esta última característica la que más variación presenta y la que mayor impacto genera en el sabor de una arepa durante su vida de anaquel; en la **Figura 8** se evidencia el formato virtual en mención. Finalmente, es importante resaltar que, para evitar sesgos de los panelistas, en un día se realizaba el panel con las formulaciones de arepas de maíz y al siguiente se realizaba el panel con las arepas de yuca.

Tabla 15. Listado de ingredientes empleados en las formulaciones de arepas de maíz y de yuca.

Los porcentajes de inclusión de cada ingrediente en fórmula no se especifican por ser parte de secreto empresarial.

Ingredientes por formulación	
Arepa de yuca	Arepa de maíz amarillo con queso en masa
Queso tipo costeño	Maíz amarillo
Queso doble crema	Maíz Blanco
Queso semiblando	Queso doble crema
Almidón de yuca	Margarina
Maíz blanco	Sal
Margarina	Azúcar
Azúcar	Glucono Delta Lactona
Sal	Carboximetilcelulosa
Glucono Delta Lactona	-

3.7. Análisis estadístico para determinación del impacto en vida útil

Para determinar si existe un comportamiento diferente entre las formulaciones evaluadas de arepas de maíz y yuca durante su vida útil, en cuanto a las características fisicoquímicas de pH y porcentaje de humedad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías usando como factores el tipo de formulación y el tiempo transcurrido en vida útil. Adicionalmente, se evaluó si existían diferencias significativas entre las características sensoriales de las formulaciones en los tres tiempos de seguimiento al cual se realizaron dichas pruebas, mediante el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. Estos análisis estadísticos se efectuaron en el software Minitab 17 teniendo en cuenta un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5%.

3.8. Evaluación de la actividad antifúngica mediante inoculación directa de las arepas de maíz y de yuca

Con el fin de evaluar el efecto antifúngico del hidrolizado seleccionado y compararlo con los conservantes tradicionales empleados en arepas de maíz y de yuca, se inoculó de forma directa esporas de *Penicillium* sp. La suspensión de esporas se preparó mediante raspado de las esporas provenientes de una caja Petri con el moho incubada por 15 días a 27°C; este raspado se hizo con asa estéril y se suspendieron las esporas en una solución de NaCl con Tween 80 al 0,1% V/V previamente autoclavada. De esta suspensión se hicieron diluciones seriadas para determinar su concentración usando la Cámara de Neubauer. La concentración de esporas se definió en $1,41 \times 10^8$ conidios/mL, utilizando para su conteo la ecuación (2) (Sánchez, 2021). La inoculación de las arepas se hizo en cabina de flujo laminar, colocando 500 μ L de la suspensión sobre toda la superficie del producto; una vez inoculadas las arepas se almacenaron en el cuarto de incubación de la Universidad Nacional a 29°C por 50 días. Durante los 50 días se realizó diariamente la inspección visual del producto identificando el crecimiento de *Penicillium* sp. y determinando el porcentaje de arepas contaminadas con dicho moho.

$$\text{Concentración de esporas } \left(\frac{\text{conidios}}{\text{mL}} \right) = \bar{X}c \times F_d \times 16 \times 10000 \text{ (2)}$$

Tomada y adaptada de Sánchez (2021).

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Ranking de preferencia

Pensando en el sabor típico de una arepa de maíz responde las siguientes preguntas:

sensorialdm@gmail.com [Cambiar de cuenta](#)

No compartido

* Indica que la pregunta es obligatoria

Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. *

	1	2	3	4	5
345	<input type="checkbox"/>				
780	<input type="checkbox"/>				
652	<input type="checkbox"/>				
234	<input type="checkbox"/>				
465	<input type="checkbox"/>				

Escriba qué característica destaca en la muestra que más le gustó, y qué característica destaca en la muestra que menos le gustó.

Tu respuesta

Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. *

	1	2	3	4	5
465	<input type="checkbox"/>				
234	<input type="checkbox"/>				
345	<input type="checkbox"/>				
652	<input type="checkbox"/>				
780	<input type="checkbox"/>				

[Enviar](#) [Borrar formulario](#)

Nunca envías contraseñas a través de Formularios de Google.

[Este contenido no ha sido creado ni aprobado por Google.](#) [Notificar uso inadecuado](#) [Términos del Servicio](#) [Política de Privacidad](#)

Figura 8. Ejemplo del Formulario de panel sensorial empleado.

4. Resultados y discusión

4.1. Activación de la cepa

Durante la activación de la cepa se realizó una caracterización microscópica y macroscópica de la misma, en aras de corroborar la identificación previamente realizada en el cepario. De las características microscópicas se pudo evidenciar a grandes rasgos el conidióforo en forma de pincel que es típico de *Penicillium* sp. (**Figura 9**), identificando a su vez que es monoverticilado y que presenta también fiálides ampuliformes, por lo que es un indicio de que dicha cepa puede pertenecer al subgénero *Aspergilloides*, sin embargo, mediante esta caracterización no se puede concluir con certeza si pertenece o no a este subgénero y tampoco son datos suficientes para clasificarla hasta especie. De las características macroscópicas que exhibió esta cepa en medio de cultivo PDA se destaca que su crecimiento es rápido, y el micelio adquiere una coloración blanca en los primeros días de crecimiento y se torna azul luego de 5 días de incubación; posteriormente, luego de un mes de incubación se observa de color verde oliva con evidencia de esporulación que llena toda la caja Petri. En cuanto a la textura del micelio se evidenció la presencia de surcos principalmente en los primeros días de incubación, y luego se identificó una apariencia semejante a la velutinosa; no se evidenció presencia de exudados o pigmentos durante su crecimiento. En la **Figura 10** se puede observar las características macroscópicas en mención.

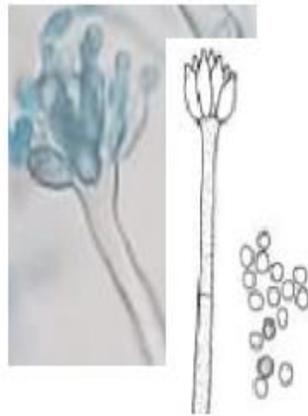


Figura 9. Conidióforo de la cepa de estudio comparada con imagen de literatura (conidióforo monoverticilado visto previamente en Figura 4).



Figura 10. Apariencia macroscópica de la cepa en medio PDA.

4.2. Evaluación de la actividad antifúngica en medio de cultivo

El crecimiento de mohos como *Penicillium* sp. representa un reto no sólo para las industrias que producen arepas, sino que también para todas aquellas que elaboran productos panificados en general, atribuyéndose anualmente a esta problemática millonarias pérdidas, que como se mencionó en algunos casos de la industria de arepas estas pueden alcanzar las módicas sumas de 700 millones de pesos mensuales; lo cual ha obligado a la industria a buscar soluciones rápidas y efectivas a dicha problemática. Entre las soluciones que más se usan en la industria de arepas por términos de costos es la aplicación de conservantes tradicionales en las masas crudas, principalmente el ácido sórbico y propionato de calcio. Sin embargo, la necesidad de desarrollar productos más naturales que no contengan altas concentraciones de conservantes sintéticos además que, permitan alargar o igualar la vida útil de los productos que emplean conservantes tradicionales, incentiva la investigación de nuevos conservantes de origen natural.

Entre las opciones de conservantes naturales se ha evaluado en investigaciones previas el uso del lactosuero hidrolizado con proteasas, ya que diferentes péptidos provenientes de la hidrólisis se asocian con un potencial antimicrobiano y antifúngico; pese a ello, no todos los péptidos que se generan en la hidrólisis pueden presentar dicho potencial, por lo que el efecto antifúngico que puede exhibir el lactosuero WPC 80 hidrolizado con proteasas es muy dependiente del tipo de enzima empleado (Morais et al., 2015). En la presente investigación se evaluó el efecto de la hidrólisis del lactosuero WPC 80 con cinco clases de proteasas, donde tres de estas: Formea®, Alcalase® y Protamex®, se emplean comúnmente en alimentos principalmente en la industria láctea, puesto que, generan hidrolizados de proteína que tienen mayor digestibilidad y menor alergenicidad (Novozymes, 2023). Otra de las enzimas empleadas fue la papaína, que también se utiliza comúnmente en alimentos destacando su uso en cárnicos como una forma de ablandar las carnes (Ozhelvaci & Steczkiewicz, 2023), y a su vez se empleó en este estudio una tripsina de páncreas bovino, que no es frecuentemente utilizada en alimentos, pero sí en aplicaciones biotecnológicas (Sigma-Aldrich, 2023).

Luego de la hidrólisis del lactosuero WPC 80 con cada una de las enzimas evaluadas, se obtuvieron cinco hidrolizados que fueron posteriormente liofilizados, con el fin de determinar su actividad antifúngica en medio de cultivo y compararla con la actividad de los conservantes tradicionales ácido sórbico y propionato de calcio. De este ensayo se observó que sí existen diferencias en cuanto a la actividad antifúngica entre los cinco hidrolizados en estudio y los conservantes tradicionales ácido sórbico y propionato de calcio, al afectar de forma diferencial el crecimiento del *Penicillium* sp. en los 11 días de seguimiento; tal como se evidencia en la **Gráfica 1** y **Tabla 15**, los conservantes tradicionales presentaron un mejor efecto antifúngico al ralentizar el crecimiento del moho, si se compara con el efecto observado en los hidrolizados. Adicionalmente, de los tratamientos que incluían conservantes tradicionales, la mejor actividad antifúngica observada fue la del ácido sórbico a 1000 ppm al impedir el crecimiento del moho durante 10 días de

incubación, mientras que, la peor actividad fue la evidenciada por el propionato de calcio, en donde el crecimiento se da a tan sólo 2 días de incubación.

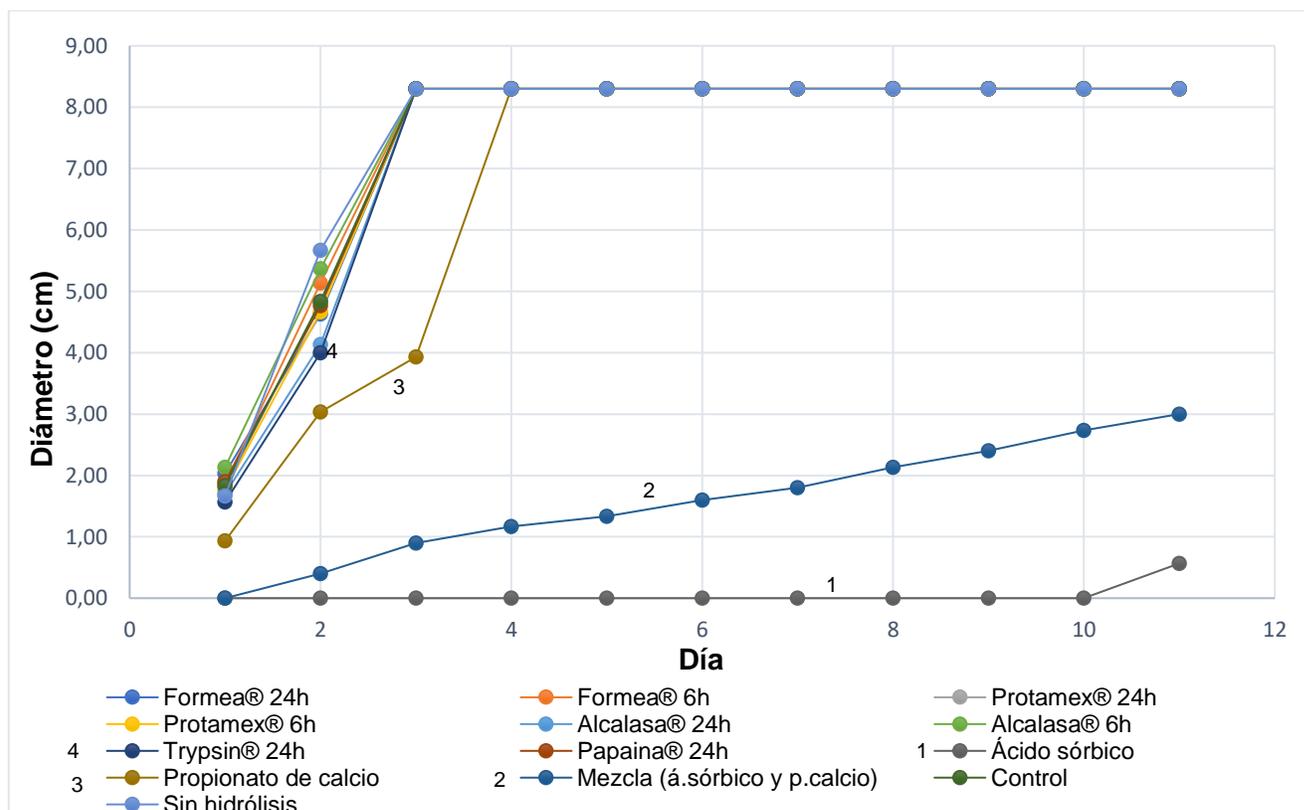
Los resultados en mención, confirman lo reportado en literatura por diferentes autores que indican que el ácido sórbico es el conservante ácido lipofílico débil que más efecto presenta frente a mohos, si se compara con otros conservantes ácidos como el ácido propionico y sus sales y el ácido benzoico y sus sales (Campos, 1995; McDonough et al., 2015; Moro et al., 2022). Por otro lado, la baja actividad antifúngica del propionato de calcio puede estar asociada al pH del medio, puesto que el pH 5 está en su límite máximo requerido para inhibir el crecimiento microbiano (Campos, 1995); de igual forma, diferentes autores han reportado que especies del género *Penicillium* como *P. roqueforti*, *P. paneum* y *P. commune* no son inhibidos por el propionato de calcio incluso cuando se usa en altas concentraciones (Garcia et al., 2019; Moro et al., 2022; Suhr & Nielsen, 2004), tal como se evidencia en la presente investigación en donde el propionato de calcio se empleó a una concentración de 3000 ppm que es la máxima admitida para alimentos, según la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social. En el caso de la mezcla de conservantes (ácido sórbico 874 ppm y propionato de calcio 499 ppm), se puede inferir que el efecto antifúngico se debe principalmente a la presencia del ácido sórbico; no obstante, dicho efecto es inferior al presentado por el tratamiento con sólo ácido sórbico, puesto que, tiene una menor concentración del mismo. En esta prueba, la mezcla de conservantes resultó ser el segundo tratamiento con mejor efecto antifúngico evidenciado.

En la prueba de evaluación del efecto antifúngico en medio de cultivo se observó a su vez que entre los hidrolizados en estudio se puede identificar un efecto antifúngico diferente principalmente en el hidrolizado de tripsina, al ser el que mayor efecto presentó en cuanto a la ralentización del crecimiento del moho de estudio, (**Gráfica 1, Tabla 16**) siendo su comportamiento inhibitorio cercano al presentado por el conservante tradicional propionato de calcio. La diferencia en la ralentización del crecimiento de *Penicillium* sp. entre los hidrolizados puede estar asociada tal como se mencionó anteriormente al tipo de péptidos generados por la hidrólisis enzimática, lo cual se debe a que la actividad catalítica de cada enzima puede ser distinta teniendo en cuenta que aunque todas son proteasas difieren en el tipo de residuo catalítico y en su origen. Por ejemplo, Formea® y Alcalase® son endoproteasas microbianas tipo serina proteasa, Protamex® es una mezcla de endoproteasas microbianas (Novozymes, 2023), la papaína actúa como endo y exoproteasa del tipo cisteína proteasa (Ozhelvaci & Steczkiewicz, 2023), mientras que, la tripsina empleada es una endoproteasa tipo serina proteasa proveniente del páncreas bovino (Sigma-Aldrich, 2023). Adicionalmente, los resultados obtenidos en esta prueba se asemejan a los presentados por otros autores que también sugieren que la hidrólisis del lactosuero bovino o incluso caprino con tripsina, pueden generar péptidos que presentan dicho efecto antifúngico, como es el caso del estudio realizado por Luz et al, (2020), en el cual demuestran que la hidrólisis del lactosuero caprino con tripsina permitió la obtención de péptidos con efecto antifúngico, los cuales fueron útiles para alargar la vida útil de panes pita.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Una razón que puede justificar a su vez el bajo efecto antifúngico evidenciado en los hidrolizados del lactosuero WPC 80 comparado con los conservantes tradicionales, es que dichos hidrolizados aunque pueden contener péptidos con potencial antifúngico, la concentración a la cual se encuentran estos péptidos es baja debido a que luego de la hidrólisis enzimática no se realizó ninguna etapa de concentración o purificación de estos péptidos; a comparación con el ácido sórbico y el propionato de calcio utilizados, los cuales si se encuentran prácticamente puros al presentar una pureza declarada del 99% (Según ficha técnica de proveedores). Además, una desventaja de los hidrolizados del lactosuero WPC 80, es la presencia de lactosa (**Tabla 17**), que en vez de inhibir el crecimiento de mohos como *Penicillium* sp. puede por el contrario favorecer su crecimiento al servir de fuente de carbono (Tibasosa, 2014), lo cual explica el por qué en la mayoría de hidrolizados se ve un rápido crecimiento del moho. De igual forma, en esta prueba se observó que el tratamiento enzimático del lactosuero WPC 80 si es de utilidad para alcanzar un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Penicillium* sp., lo que se puede evidenciar si se compara el crecimiento del control y del tratamiento con lactosuero sin hidrolizar, en donde, se destaca que el crecimiento es más rápido en este último tratamiento.

Gráfica 1. Efecto antifúngico en medio de cultivo de los hidrolizados y conservantes tradicionales evaluados sobre *Penicillium* sp.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tabla 16. Diámetro promedio en cm por día en cada tratamiento evaluado.

En esta tabla cada dato reportado corresponde al diámetro promedio de las tres réplicas de cada tratamiento; las celdas coloreadas de amarillo corresponden a los cuatro valores de diámetros más bajos reportados por día de seguimiento.

Tratamiento	Diámetro (cm)/Día										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hidrolizado de Formea® LT 1200 BG 24 horas; 6667 ppm	2,0	4,6	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Formea® LT 1200 BG 6 horas; 6667 ppm	1,9	5,1	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Protamex® 24 horas; 6667 ppm	1,8	4,8	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Protamex® 6 horas; 6667 ppm	1,8	4,7	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas; 6667 ppm	1,7	4,1	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas; 6667 ppm	2,1	5,4	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas; 6667 ppm	1,6	4,0	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Hidrolizado de Papaína 4000 DB 24 horas; 6667 ppm	1,9	4,8	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Ácido sórbico 1000 ppm	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Propionato de calcio 3000 ppm	0,9	3,0	3,9	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	0,0	0,4	0,9	1,2	1,3	1,6	1,8	2,1	2,4	2,7	3,0
Control	1,8	4,8	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
Lactosuero sin hidrolizar	1,7	5,7	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3

Tabla 17. Análisis fisicoquímico del lactosuero WPC 80 empleado, ISO Chill®8010; declarado en la ficha técnica del producto.

Análisis fisicoquímico	Método	Valor mínimo	Valor máximo
Cenizas (%)	AOAC 930.30	-	5,0
Grasa (%)	AOAC 989.05	-	10,0
Lactosa (%)	AOAC 984.15 / 986.25	-	10,0
Humedad (%)	AOAC 927.05 / 990.20	-	6,0
pH, 10% Sol. a 20°C	AOAC 945.27		7,0

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Análisis fisicoquímico	Método	Valor mínimo	Valor máximo
Proteína, (N x 6,38) (%)	AOAC 990.03 / 991.20	75,0	
Proteína, (N x 6,38) como base seca (%)	AOAC 990.03 / 991.20	80,0	

Adicionalmente, con los resultados obtenidos en la prueba de evaluación de la actividad antifúngica se calculó la Inhibición del Crecimiento Micelial (MGI) en cada uno de los tratamientos evaluados. En la **Tabla 18** se observa el resultado de este cálculo para cada tratamiento en los 11 días de estudio así como el valor promedio de este parámetro. En la **Gráfica 2** se puede evidenciar los tratamientos con mayor índice de inhibición de crecimiento micelial. De estos resultados se concluyó que los porcentajes más altos de inhibición lo presentaron: el ácido sórbico con un 99,38%, la mezcla de conservantes con un 80,55%, el propionato de calcio con 12,63% y el hidrolizado de tripsina con un 2,89%. De igual forma, se observó que en algunos tratamientos el crecimiento del hongo fue favorecido en vez de ser inhibido, por lo que el valor del porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial fue negativo, siendo el caso del lactosuero sin hidrolizar (-0,74%), de los tratamientos con la enzima Formea® (-0,73 para el hidrolizado de 6 horas y -0,62% para el de 24 horas) y del tratamiento con Alcalase® con 6 horas de hidrólisis (-2,49%). Resultados que a su vez soportan los análisis presentados anteriormente.

Tabla 18. Resultados del cálculo de Inhibición de Crecimiento Micelial (MGI).

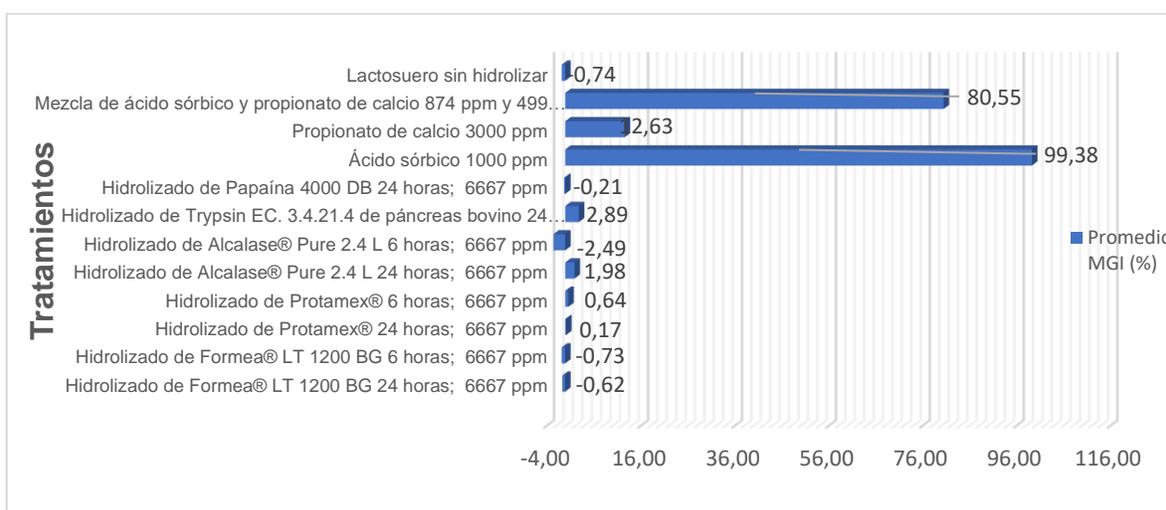
En esta tabla cada dato reportado corresponde al MGI promedio de las tres réplicas de cada tratamiento; las celdas coloreadas de amarillo corresponden a los valores de MGI más altos reportados por día de seguimiento.

Tratamiento	MGI (%)/Día											Promedio MGI (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Formea® LT 1200 BG 24 horas; 6667 ppm	-10,9	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,6
Hidrolizado de Formea® LT 1200 BG 6 horas; 6667 ppm	-1,8	-6,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7
Hidrolizado de Protamex® 24 horas; 6667 ppm	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Hidrolizado de Protamex® 6 horas; 6667 ppm	3,6	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Hidrolizado de Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas; 6667 ppm	7,3	14,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
Hidrolizado de Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas; 6667 ppm	-16,4	-11,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-2,5
Hidrolizado de Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas; 6667 ppm	14,5	17,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tratamiento	MGI (%)/Día											Promedio MGI (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Hidrolizado de Papaína 4000 DB 24 horas; 6667 ppm	-3,6	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2
Ácido sórbico 1000 ppm	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	93,2	99,4
Propionato de calcio 3000 ppm	49,1	37,2	52,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,6
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	100,0	91,7	89,2	85,9	83,9	80,7	78,3	74,3	71,1	67,1	63,9	80,6
Lactosuero sin hidrolizar	9,1	-17,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,7

Gráfica 2. Promedio de Inhibición de crecimiento micelial por tratamiento.



Con el fin de evaluar la significancia estadística de la diferencia observada entre los tratamientos de estudio se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor (conservante evaluado) para los diámetros de crecimiento de los días dos y once del seguimiento realizado, considerando tal como se había mencionado anteriormente un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5%. De esta prueba estadística se obtuvieron los resultados presentados en la **Tabla 19 y 20, Gráfica 3 y 4 y Figura A1 y A2** de la sección de anexos. En dichos resultados se evidenció que sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (Valor $p \leq 0,05$) a los días dos y once del seguimiento; además, de ambas predicciones se puede inferir que alrededor del 92% de la variación en el diámetro de crecimiento del moho analizado, es explicado por el tipo de conservante o hidrolizado empleado en el medio de cultivo, es decir, que la adición de conservantes o hidrolizados es el factor que más afecta el crecimiento del moho y este crecimiento no es significativamente afectado por variables externas no controladas en el experimento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

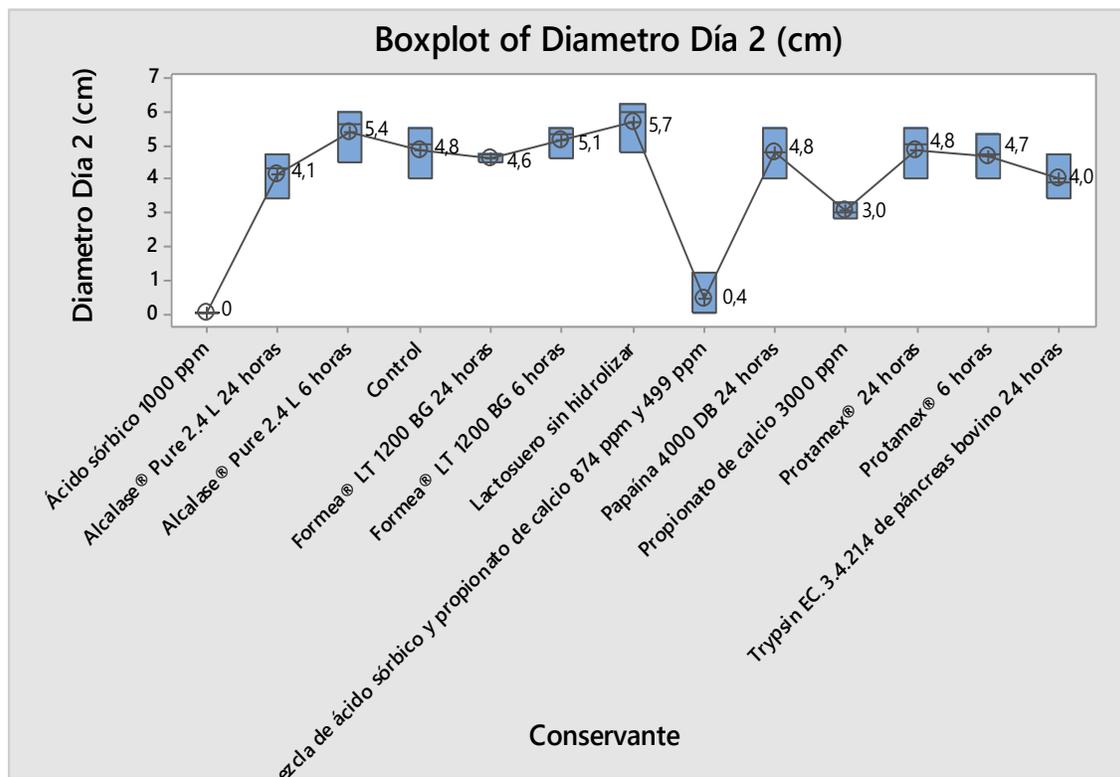
Tabla 19. Resultados de ANOVA para diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. al día dos de seguimiento.

Resultados de ANOVA Día 2			
Valor p	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,000	0,619139	92,08%	88,43%

Tabla 20. Resultados de ANOVA para diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. al día once de seguimiento.

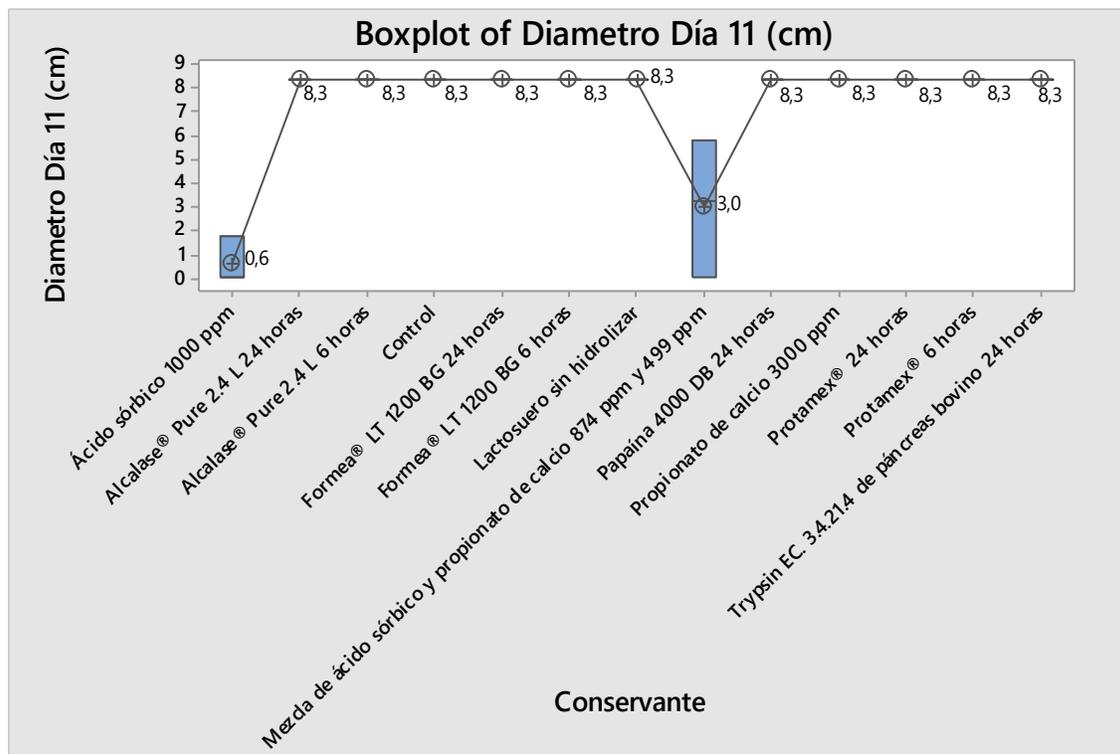
Resultados de ANOVA Día 11			
Valor p	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,000	0,850490	92,27%	88,70%

Gráfica 3. Boxplot del Diámetro de crecimiento para el día dos de seguimiento. Los valores evidenciados en las cajas de cada tratamiento corresponden al valor medio.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 4. Boxplot del Diámetro de crecimiento para el día once de seguimiento. Los valores evidenciados en las cajas de cada tratamiento corresponden al valor medio.



Adicionalmente, se puede observar en las **Gráficas 3 y 4** los valores de la media obtenidos en cada tratamiento, de estos valores se observa que hay una diferencia entre los días dos y once analizados, puesto que, en el día dos se evidencia que los tratamientos con menor crecimiento del moho son: el ácido sórbico a 1000 ppm, la mezcla de conservantes ácido sórbico 874 ppm y propionato de calcio 499 ppm, el propionato de calcio a 3000 ppm y el hidrolizado con tripsina de páncreas bovino a 6667 ppm; mientras que, al día once los únicos tratamientos con menor crecimiento del moho son únicamente el ácido sórbico y la mezcla de conservantes. De estas observaciones se infiere que todos los tratamientos a excepción de los que contenían ácido sórbico, no tienen un buen efecto inhibitorio del crecimiento del moho cuando existe una alta concentración de esporas del mismo, al alcanzar el máximo crecimiento (diámetro total de la caja petri) a tan sólo el segundo o tercer día de incubación. No obstante, los tratamientos como el de propionato de calcio y del hidrolizado con tripsina de páncreas bovino, si podrían exhibir un buen efecto inhibitorio del crecimiento de *Penicillium* sp., si la concentración de esporas o la cantidad de micelio que se evalúa en el ensayo es mucho menor a la empleada en el presente experimento, lo que sugiere que si se aplica en vida útil de un producto sin inoculación directa de esporas o micelio, estos tratamientos podrían presentar un buen efecto inhibitorio.

De igual forma en el análisis estadístico realizado se observa que, si se compara los tratamientos de sólo ácido sórbico con la mezcla de conservantes, se evidencia

que únicamente cuando se usa el ácido sórbico a la máxima concentración permitida en alimentos bajo la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social, se logra inhibir significativamente el crecimiento del moho *Penicillium* sp., teniendo en cuenta altas concentraciones de esporas del mismo. Aspecto que a su vez permite inferir que, si bien los conservantes tradicionales como el ácido sórbico son efectivos para inhibir el crecimiento de mohos como *Penicillium* sp. en alimentos, sólo serán efectivos al cien por ciento si la concentraciones de esporas del ambiente o las fuentes de contaminación son bajas, lo que sugiere que además de la adición de conservantes para evitar el crecimiento de mohos como *Penicillium* sp. se hace indispensable garantizar la inocuidad de los procesos productivos, en este caso mediante la aplicación de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y programas rigurosos de limpieza y desinfección en las plantas de procesamiento, tal como se sugirió también en los estudios realizados por García et al. (2019), en los cuáles se hizo una evaluación completa de las causales que se asocian al problema de hongos en las industrias de panificados, que presentan un comportamiento similar al de arepas.

A partir de las ANOVAS mencionadas se realizaron pruebas de comparación múltiple para identificar cuáles de los tratamientos son los que estadísticamente presentan efecto antifúngico diferente, en este caso empleando el método de Tukey. Los resultados obtenidos en esta prueba se pueden evidenciar en las **Tablas 21 y 22** y **Figuras A3 y A4** de la sección de anexos. En la **Tabla 21** se evidencia que para el día dos del seguimiento según la similitud existente entre las medias de los tratamientos se pueden agrupar en tres grupos, siendo estos: el de mayor promedio de crecimiento que incluye a los tratamientos Lactosuero sin hidrolizar, Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas y Formea® LT 1200 BG 6 horas; el de crecimiento intermedio el cual agrupa el control y todos los demás hidrolizados y el de crecimiento bajo, que incluye a la mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm, respectivamente y, el ácido sórbico a 1000 ppm. Sin embargo, en el día once (**Tabla 22**) se observó un comportamiento diferente, en el cual los tratamientos se agruparon únicamente en dos grupos: el de mayor crecimiento que incluye el lactosuero sin hidrolizar, el control, el propionato de calcio y todos los hidrolizados, y el de menor crecimiento que incluye al ácido sórbico a 1000 ppm y la mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio, 874 ppm y 499 ppm, respectivamente. Resultados que corroboran que estos dos últimos tratamientos en mención son los únicos que estadísticamente demuestran una actividad antifúngica, tal como se mencionó anteriormente. Esta prueba, también permite inferir que no existe diferencias significativas entre los hidrolizados con Alcalase®, Formea® y Protamex®, de 6 horas con respecto a los de 24 horas, por lo que se infiere que a las 6 horas estas enzimas finalizan su acción catalítica, por ende, a las 24 horas, no se evidenciará péptidos diferentes y con mayor potencial antifúngico.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tabla 21. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de Tukey del Diámetro de crecimiento para el día dos de seguimiento.

En esta tabla los tratamientos que no comparten la letra del superíndice son significativamente diferentes.

Conservante	Promedio	Desviación estándar
Lactosuero sin hidrolizar	5,667	0,757 ^A
Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas	5,367	0,777 ^A
Formea® LT 1200 BG 6 horas	5,133	0,473 ^A
Control	4,833	0,764 ^{AB}
Protamex® 24 horas	4,833	0,764 ^{AB}
Papaína 4000 DB 24 horas	4,767	0,751 ^{AB}
Protamex® 6 horas	4,667	0,651 ^{AB}
Formea® LT 1200 BG 24 horas	4,633	0,116 ^{AB}
Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas	4,133	0,666 ^{AB}
Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas	4,000	0,656 ^{AB}
Propionato de calcio 3000 ppm	3,033	0,252 ^B
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	0,400	0,693 ^C
Ácido sórbico 1000 ppm	0,000	0,000 ^C

Tabla 22. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de Tukey del Diámetro de crecimiento para el día once de seguimiento.

En esta tabla los tratamientos que no comparten la letra del superíndice son significativamente diferentes.

Conservante	Promedio	Desviación estándar
Lactosuero sin hidrolizar	8,300	0,000 ^A
Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas	8,300	0,000 ^A
Formea® LT 1200 BG 6 horas	8,300	0,000 ^A
Control	8,300	0,000 ^A
Protamex® 24 horas	8,300	0,000 ^A
Papaína 4000 DB 24 horas	8,300	0,000 ^A
Protamex® 6 horas	8,300	0,000 ^A
Formea® LT 1200 BG 24 horas	8,300	0,000 ^A
Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas	8,300	0,000 ^A
Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas	8,300	0,000 ^A

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Conservante	Promedio	Desviación estándar
Propionato de calcio 3000 ppm	8,300	0,000 ^A
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	3,000	2,910 ^B
Ácido sórbico 1000 ppm	0,000	0,981 ^B

Además de la prueba de comparación múltiple por el método de Tukey se realizó una prueba de mayor precisión en este caso por el método MSB de Hsu. De esta prueba se obtuvieron los resultados que se evidencian a continuación en las **Figuras 11 y 12** y **Gráficas 5 y 6**. De estos resultados se analizó que si se compara la media de todos los tratamientos evaluados con respecto a la media del tratamiento con mejor efecto antifúngico reportado, en este caso, el de ácido sórbico 1000 ppm, el único tratamiento que se asemeja en términos del efecto antifúngico es la mezcla de conservantes ácido sórbico con propionato de calcio, de resto todos los demás difieren significativamente tanto en el día dos de seguimiento como en el día 11; lo cual corrobora los resultados obtenidos por el método de Tukey.

Hsu Multiple Comparisons with the Best (MCB)

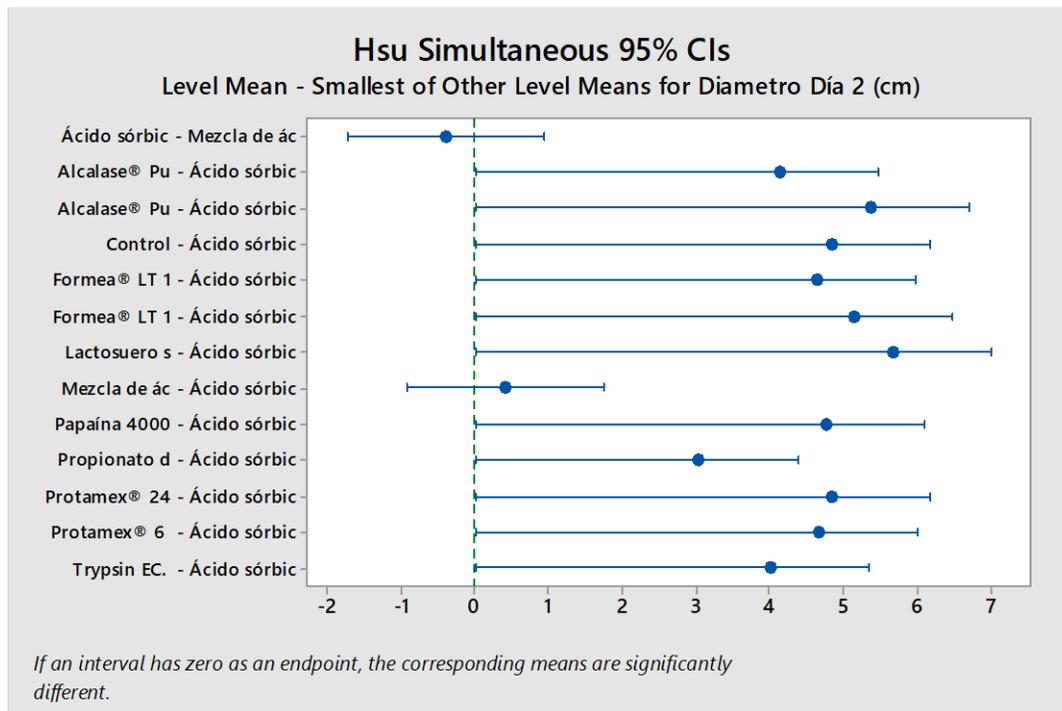
Hsu Simultaneous Tests for Level Mean - Smallest of Other Level Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
Ácido sórbic - Mezcla de ác	-0,400	0,506	(-1,741; 0,941)	-0,79	0,671
Alcalase® Pu - Ácido sórbic	4,133	0,506	(0,000; 5,474)	8,18	0,000
Alcalase® Pu - Ácido sórbic	5,367	0,506	(0,000; 6,707)	10,62	0,000
Control - Ácido sórbic	4,833	0,506	(0,000; 6,174)	9,56	0,000
Formea® LT 1 - Ácido sórbic	4,633	0,506	(0,000; 5,974)	9,17	0,000
Formea® LT 1 - Ácido sórbic	5,133	0,506	(0,000; 6,474)	10,15	0,000
Lactosuero s - Ácido sórbic	5,667	0,506	(0,000; 7,007)	11,21	0,000
Mezcla de ác - Ácido sórbic	0,400	0,506	(-0,941; 1,741)	0,79	0,671
Papaína 4000 - Ácido sórbic	4,767	0,506	(0,000; 6,107)	9,43	0,000
Propionato d - Ácido sórbic	3,033	0,506	(0,000; 4,374)	6,00	0,000
Protamex® 24 - Ácido sórbic	4,833	0,506	(0,000; 6,174)	9,56	0,000
Protamex® 6 - Ácido sórbic	4,667	0,506	(0,000; 6,007)	9,23	0,000
Trypsin EC. - Ácido sórbic	4,000	0,506	(0,000; 5,341)	7,91	0,000

Figura 11. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día dos de seguimiento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 5. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día dos de seguimiento.



Hsu Multiple Comparisons with the Best (MCB)

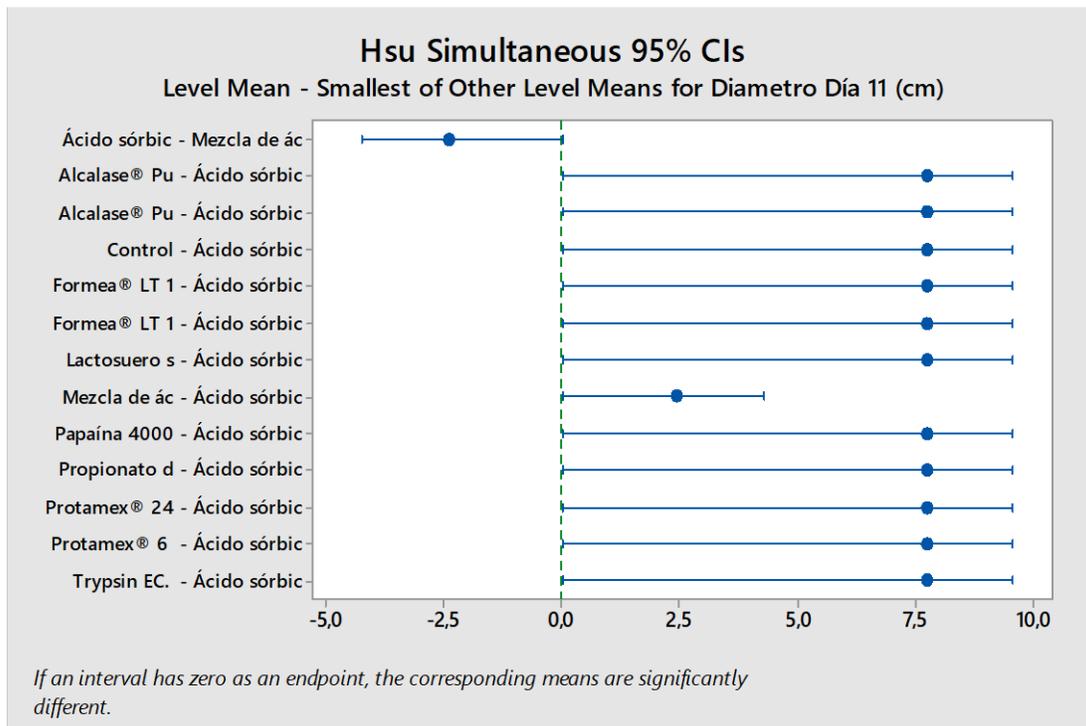
Hsu Simultaneous Tests for Level Mean - Smallest of Other Level Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
Ácido sórbic - Mezcla de ác	-2,433	0,694	(-4,275; 0,000)	-3,50	0,007
Alcalase® Pu - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Alcalase® Pu - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Control - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Formea® LT 1 - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Formea® LT 1 - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Lactosuero s - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Mezcla de ác - Ácido sórbic	2,433	0,694	(0,000; 4,275)	3,50	0,007
Papaína 4000 - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Propionato d - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Protamex® 24 - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Protamex® 6 - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000
Trypsin EC. - Ácido sórbic	7,733	0,694	(0,000; 9,575)	11,14	0,000

Figura 12. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día once de seguimiento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 6. Resultados de prueba de comparación múltiple por método de MSB Hsu con respecto a la ANOVA del día once de seguimiento.



4.3. Evaluación del impacto en vida útil del lactosuero hidrolizado seleccionado en arepas de maíz y de yuca

Como se pudo evidenciar anteriormente, el hidrolizado con tripsina de páncreas bovino fue el único que presentó actividad antifúngica frente a *Penicillium* sp. en medio de cultivo; por lo cual se evaluó su impacto en vida útil de arepas de maíz y yuca. De igual forma, tal como se mencionó anteriormente, en esta prueba se evaluaron 5 formulaciones, que diferían únicamente en los conservantes adicionados. Tanto para arepas de maíz como de yuca, dichas formulaciones evaluadas fueron: fórmula con mezcla de conservantes (ácido sórbico a 874 ppm y propionato de calcio a 499 ppm), fórmula con sólo ácido sórbico (500 ppm), fórmula sórbico más lactosuero (ácido sórbico a 500 ppm e hidrolizado del lactosuero WPC 80 con Tripsina de páncreas bovino a 500 ppm), fórmula lactosuero (hidrolizado del lactosuero WPC 80 con Tripsina de páncreas bovino a 6667 ppm) y fórmula sin conservantes. Durante los 50 días de seguimiento se evaluó el porcentaje de mohos presentes en las formulaciones, los cambios fisicoquímicos de porcentaje de humedad y pH, y los cambios sensoriales, teniendo en cuenta también las condiciones de almacenamiento, por lo que se compara para arepas de maíz y de yuca la vida útil tanto en cuarto refrigeración como en cuarto con condiciones de temperatura y humedad relativa variables. Entendiendo la vida útil como el tiempo al cual ninguna de las formulaciones presentó hongo visible.

En cuanto al porcentaje de mohos presentes en las arepas de maíz durante los 50 días de seguimiento, se pudo observar un comportamiento diferente entre las formulaciones almacenadas en cuarto refrigeración con respecto a las almacenadas en cuarto ambiente. En las arepas de maíz en cuarto refrigeración se evidenció que de las cinco formulaciones evaluadas, la que presentó un mejor desempeño fue la fórmula de sórbico más lactosuero, seguida por la mezcla de conservantes (**Gráfica 7, Figuras 13 y 14**), destacando que la formulación de sórbico más lactosuero no presentó moho visible en los 50 días de seguimiento. Adicionalmente, se observó que las arepas de maíz de la fórmula de sórbico con lactosuero lograron incrementar en 7 días la vida útil de este tipo de arepas, con respecto a la fórmula con la mezcla de conservantes tradicionales ácido sórbico y propionato de calcio; así como logró incrementar en 19 días la vida útil de este tipo de arepas pero con respecto a la fórmula que contenía sólo el ácido sórbico como conservante tradicional empleado. Por otro lado, la formulación con peor desempeño fue la de sólo ácido sórbico, siendo el porcentaje de moho mucho mayor al evidenciado incluso en la fórmula sin conservantes.

Los resultados obtenidos en cuanto al recuento de mohos en las arepas de maíz almacenadas en cuarto refrigeración permiten demostrar que el hidrolizado del lactosuero WPC 80 con tripsina, sí presenta un efecto antifúngico y dicho efecto se potencializa cuando se combina este hidrolizado con el ácido sórbico. Sin embargo, se evidencia también que altas concentraciones de este hidrolizado no permiten obtener un buen efecto antifúngico, lo que se puede atribuir a la baja concentración a la cual se encuentran los péptidos con potencial antifúngico, sumado al contenido de lactosa que sirve como fuente de carbono (Tibasosa, 2014) para el crecimiento de mohos como *Penicillium* sp., un aspecto que podría evitarse si luego de la hidrólisis enzimática del lactosuero WPC 80 con tripsina, se hace un tratamiento de concentración o purificación previo a su uso en el alimento. A su vez, estos resultados demuestran que la mezcla del ácido sórbico con el lactosuero resulta tener un mayor efecto antifúngico que la mezcla de ácido sórbico con propionato de calcio, siendo esta última la habitualmente empleada en panificados y en arepas (Axel et al., 2017; Corpas & Tapasco, 2012); lo cual se puede justificar teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente en donde se afirma que el conservante tradicional propionato de calcio no presenta un buen efecto inhibitorio frente a mohos.

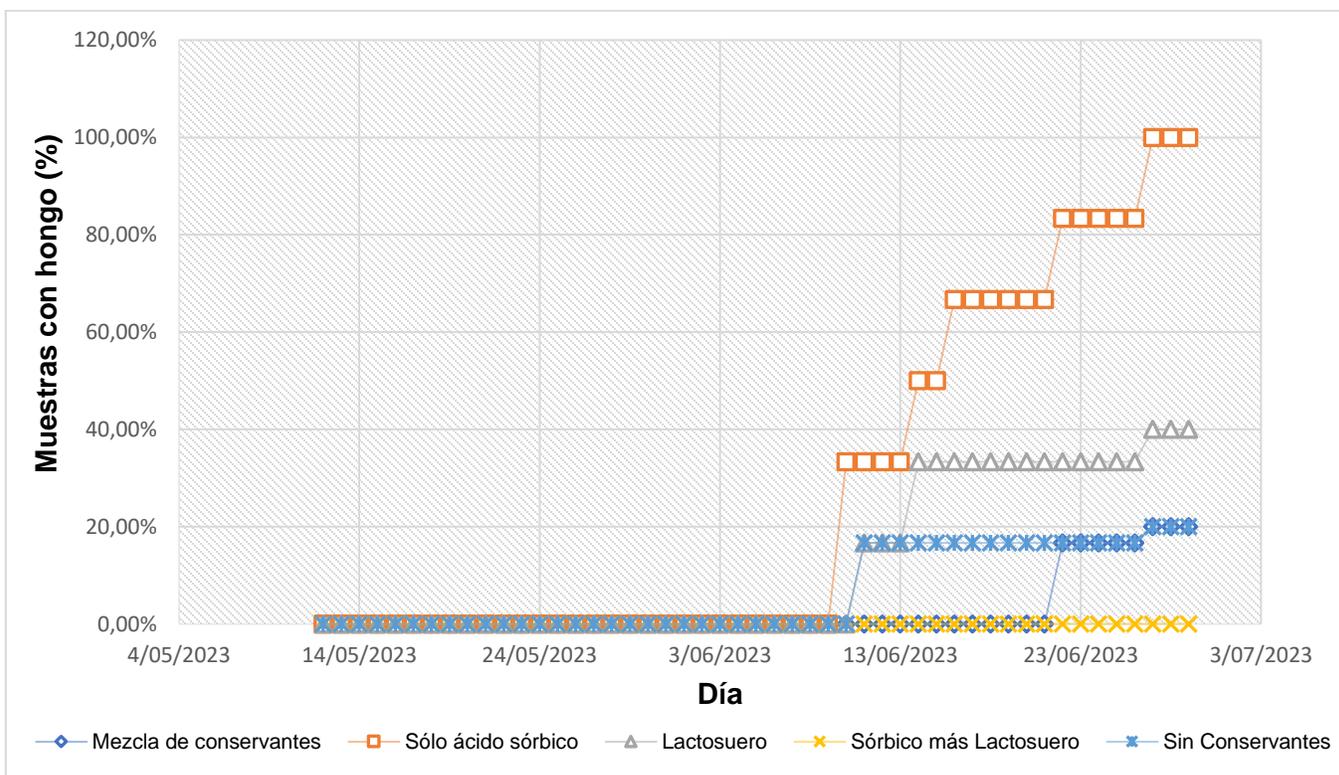
Por otro lado, dichos resultados dejan en evidencia que el uso de ácido sórbico a bajas concentraciones como 500 ppm sin la aplicación concomitante de otro conservante, en arepas de maíz que contienen queso en masa, no permite exhibir el efecto antifúngico característico del ácido sórbico. Lo que permite inferir que el conservante ácido sórbico sólo tiene un buen efecto antifúngico en arepas de maíz cuando se usa a concentraciones cercanas a la máxima permitida, bajo la Resolución 4125 de 1991 del Ministerio de salud y protección social (1000 ppm); lo que se asocia con los resultados obtenidos en otras investigaciones como la de Corpas y Tapasco (2012) y (2013), en donde comparan la vida útil de arepas de maíz sin adición de queso en masa, usando diferentes conservantes tradicionales

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

llegando a la conclusión que el único que permite obtener la mayor vida útil es el ácido sórbico, pero adicionado a una concentración de 1000 ppm. La razón por la cual se puede requerir altas concentraciones de este ácido para presentar un buen efecto antifúngico en arepas de maíz, se debe a que, como se mencionó anteriormente, el efecto de este conservante puede verse afectado por diversos factores como baja solubilidad, o por la degradación del mismo ocasionada por la interacción con otros ingredientes del alimento (Campos, 1995; Thomas & Delves-Broughton, 2014).

En las arepas de maíz en cuarto ambiente, se evidenció que todas las formulaciones presentaron una vida útil mucho más baja que la registrada en las arepas de maíz almacenadas en cuarto de refrigeración. No obstante, bajo estas condiciones se observó también que la formulación con mejor desempeño fue la de sórbico con lactosuero, la cual permitió obtener un menor recuento de arepas contaminadas con moho al final de los 50 días de seguimiento (**Gráfica 8, Figuras 13 y 15**). En general, bajo estas condiciones variables de temperatura y humedad relativa se evidenció que en este tipo de arepas independientemente del conservante evaluado, sólo lograron presentar 5 días de vida útil. Por lo que se puede afirmar, que ninguno de los conservantes analizados logró ralentizar el crecimiento de mohos bajo dichas condiciones.

Gráfica 7. Resultados del seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de maíz con moho durante 50 días de seguimiento en refrigeración.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 8. Resultados del seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de maíz con moho durante 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.

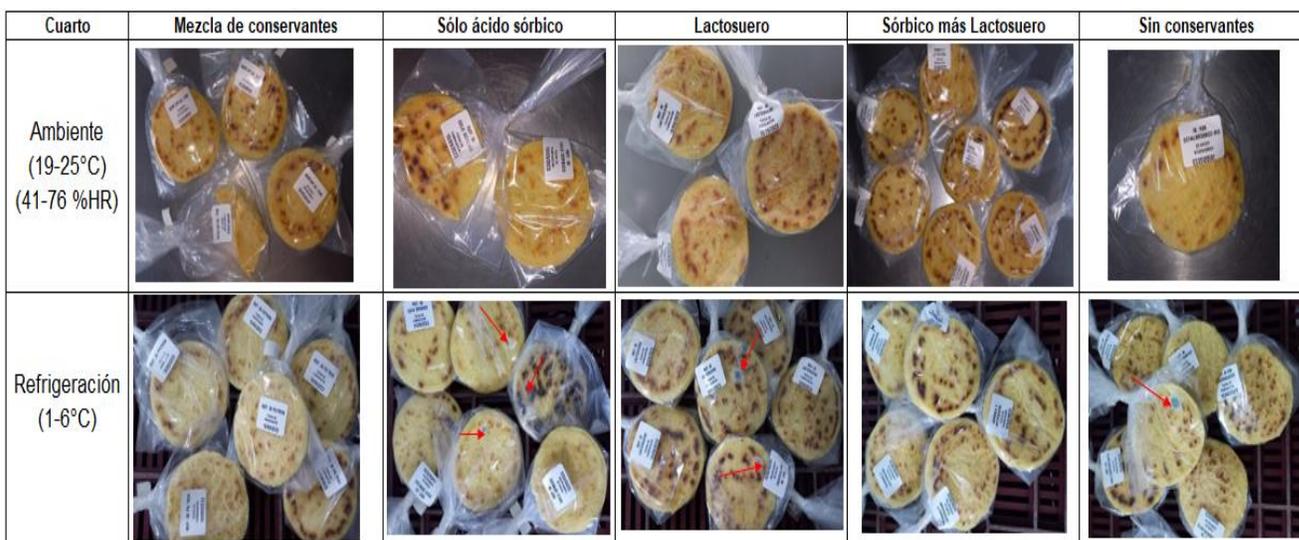
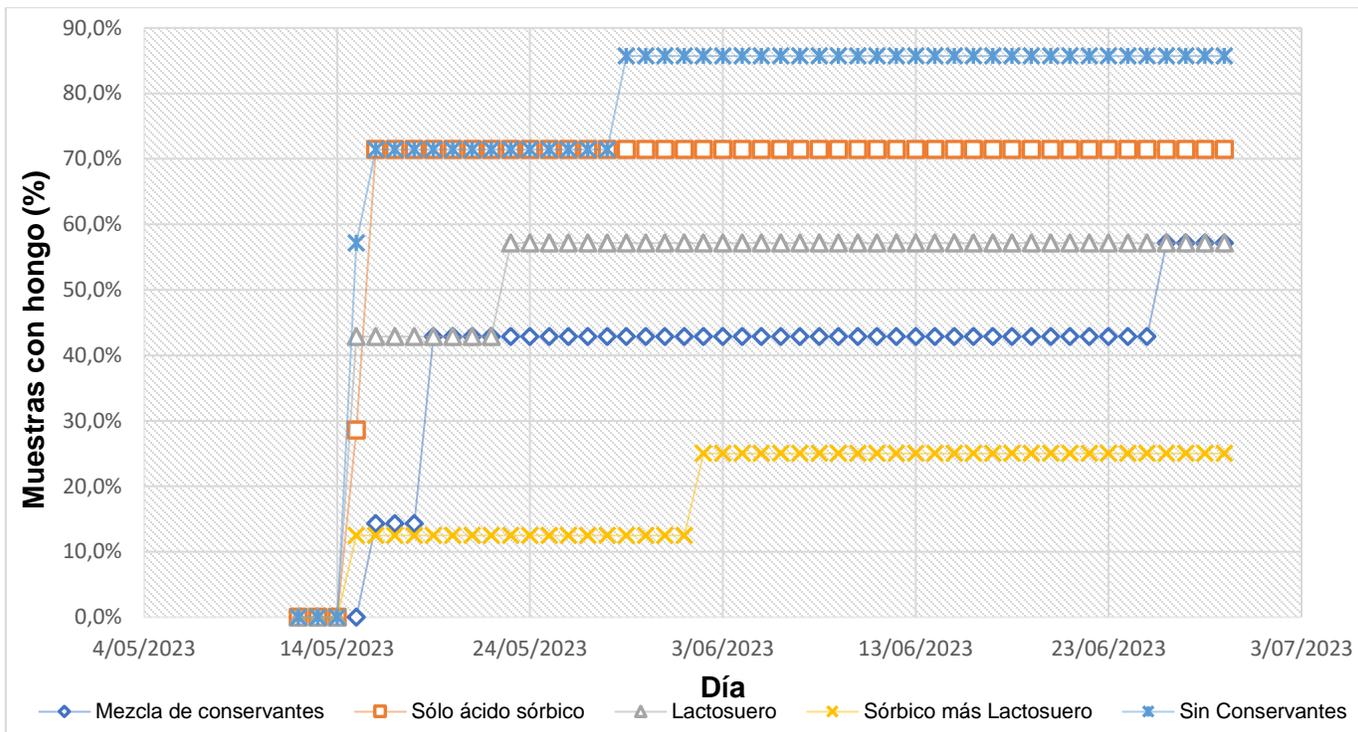


Figura 13. Evidencia fotográfica de porcentajes de muestras con moho en arepas de maíz en cuarto ambiente y refrigeración.

En esta figura las fotos de cuarto ambiente corresponden al seguimiento del 31 de mayo del 2023 en donde se evidencian las muestras que aún no tenían hongo. Las fotos de refrigeración corresponden al seguimiento del 15 de junio del 2023 y en estas se evidencian todas las muestras almacenadas en dicho cuarto, destacando con una flecha roja las muestras que a la fecha tenían moho visible.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca



Figura 14. Evidencia fotográfica de arepas de maíz al final de los 50 días de seguimiento en refrigeración.

En esta figura las flechas indican las muestras contaminadas con moho.

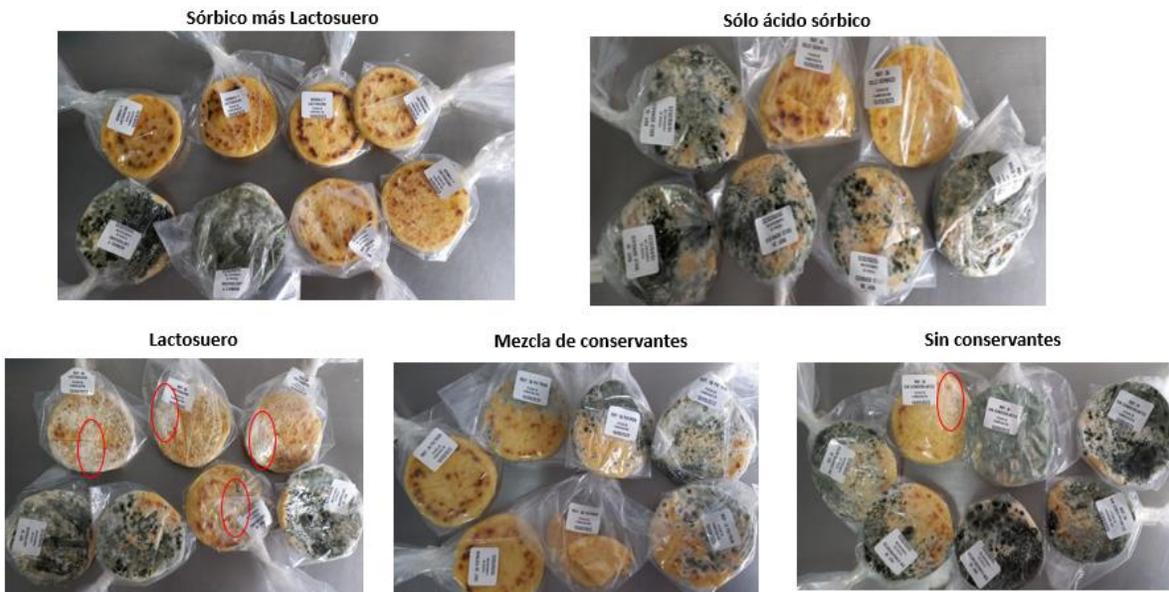


Figura 15. Evidencia fotográfica de arepas de maíz al final de los 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.

En esta figura los circulos rojos indican las muestras contaminadas con levadura.

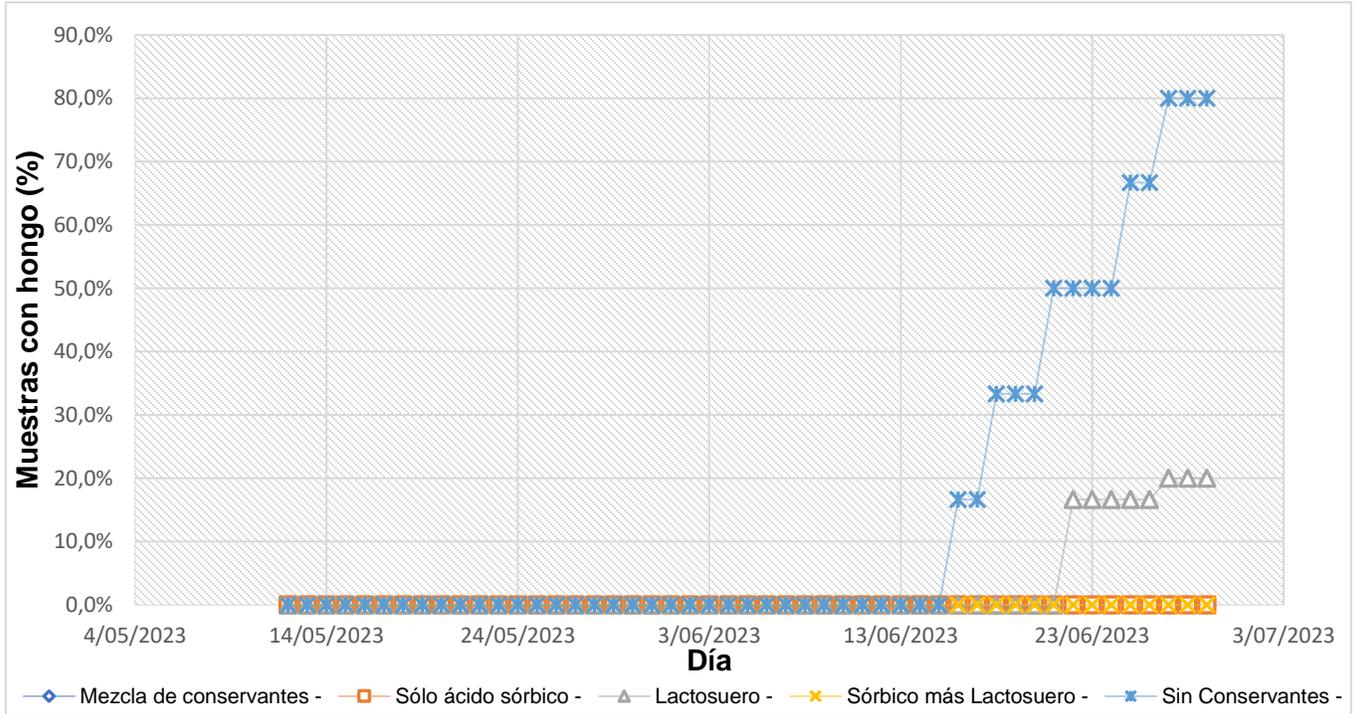
En las arepas de yuca, también se observó diferencias en cuanto al tiempo de vida útil alcanzado por todas las formulaciones en refrigeración con respecto al cuarto ambiente; sin embargo, se observó el mismo patrón evidenciado en las arepas de maíz, en donde las almacenadas en cuarto ambiente presentaron un menor tiempo de vida útil que las arepas almacenadas en refrigeración. De las arepas de yuca almacenadas en refrigeración se observó que las formulaciones de mezcla conservantes, sólo ácido sórbico y sórbico más lactosuero lograron presentar una vida útil de 50 días (**Gráfica 9 y Figuras 16 y 17**). Por lo que en este caso, no se ve un impacto del uso del hidrolizado del lactosuero WPC 80 con tripsina de páncreas bovino, en la vida útil de las arepas de yuca.

El bajo impacto en vida útil de la aplicación del hidrolizado con tripsina en las arepas de yuca almacenadas en refrigeración puede atribuirse posiblemente a las características fisicoquímicas de este tipo de arepas, puesto que, las arepas de yuca al tener en mayor proporción el almidón de yuca como ingrediente presentan un menor contenido de humedad que las arepas de maíz, lo que en cierta parte limita el crecimiento de mohos y otros microorganismos; de igual forma, el contenido de maíz presente en estas arepas es mucho menor por lo que se disminuye el riesgo de presentar esporas de mohos provenientes del maíz, teniendo en cuenta que este cereal es uno de los que más se ve afectados por el crecimiento de mohos como *Penicillium* sp. (Carvajal-Moreno, 2022). Por otro lado, de estos resultados se infiere también que concentraciones no tan altas de ácido sórbico son efectivas para prevenir el crecimiento de mohos en arepas de yuca almacenadas en refrigeración, lo que se puede asociar a una mejor solubilidad del ácido sórbico puesto que, las fórmulas de yuca a diferencia de las de maíz, tienen un mayor contenido de grasas provenientes principalmente del queso y la margarina, y el ácido sórbico tiene una mejor solubilidad en matrices grasas que en matrices acuosas (Campos, 1995).

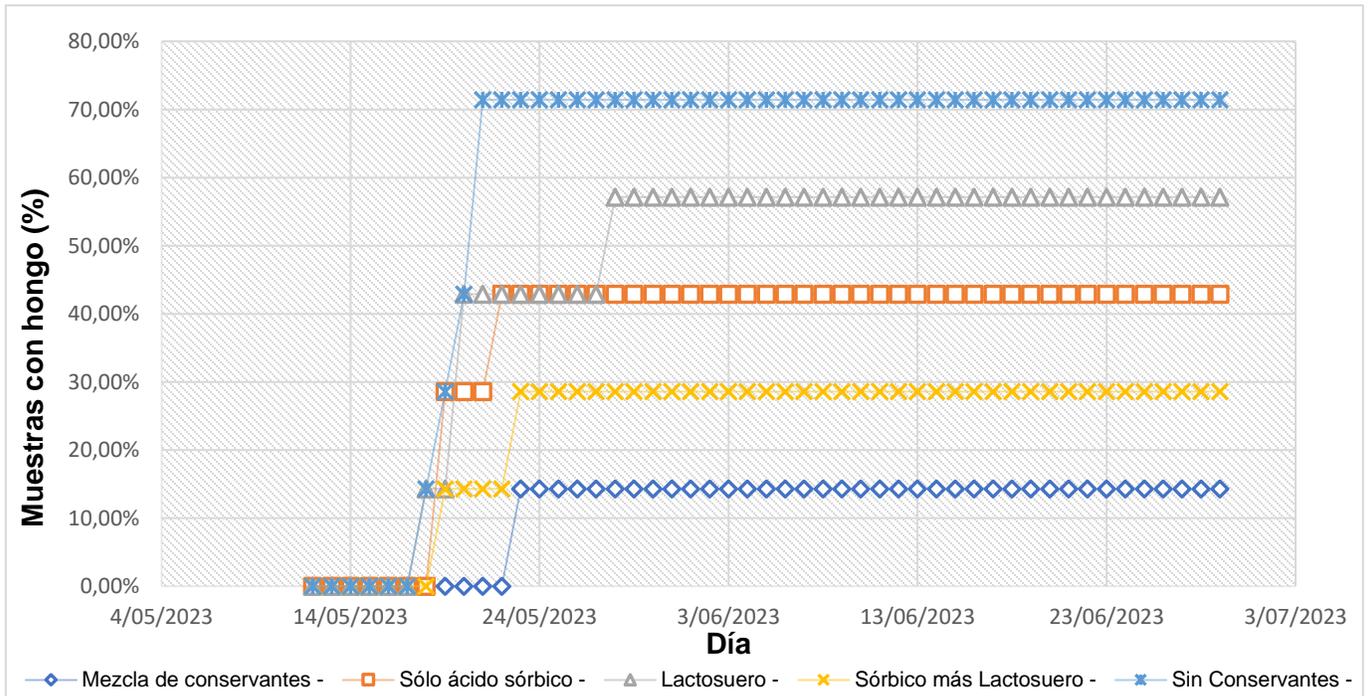
Las arepas de yuca almacenadas en cuarto ambiente, lograron presentar independientemente de la formulación al menos dos días más de vida útil que las arepas de maíz, lo que puede explicarse por las diferencias fisicoquímicas y composicionales mencionadas anteriormente. De estas arepas, el mejor desempeño se evidenció en las formulaciones de mezcla de conservantes y ácido sórbico con lactosuero, al presentar ambas formulaciones un recuento de mohos inferior comparado con las otras formulaciones (**Gráfica 10 y Figuras 16 y 18**). Por otro lado, en las arepas de yuca así como se evidenció en las arepas de maíz, la formulación de lactosuero no presentó un buen desempeño inhibiendo el crecimiento de mohos, lo que se asocia a como se mencionó anteriormente, la baja concentración de los péptidos con potencial antifúngico y a la presencia de lactosa que funciona como fuente de carbono para estos hongos además de otros microorganismos (Tibasosa, 2014).

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 9. Resultados de seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de yuca con moho durante 50 días de seguimiento en refrigeración.



Gráfica 10. Resultados de seguimiento del porcentaje de muestras de arepas de yuca con moho durante 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca



Figura 16. Evidencia fotográfica de porcentajes de muestras con moho en arepas de yuca en cuarto ambiente y refrigeración.

En esta figura las fotos de cuarto ambiente corresponden al seguimiento del 31 de mayo del 2023 en donde se evidencian las muestras que aún no tenían hongo. Las fotos de refrigeración corresponden al seguimiento del 15 de junio del 2023 y en estas se evidencian todas las muestras almacenadas en dicho cuarto, las cuales a la fecha no tenían moho visible.

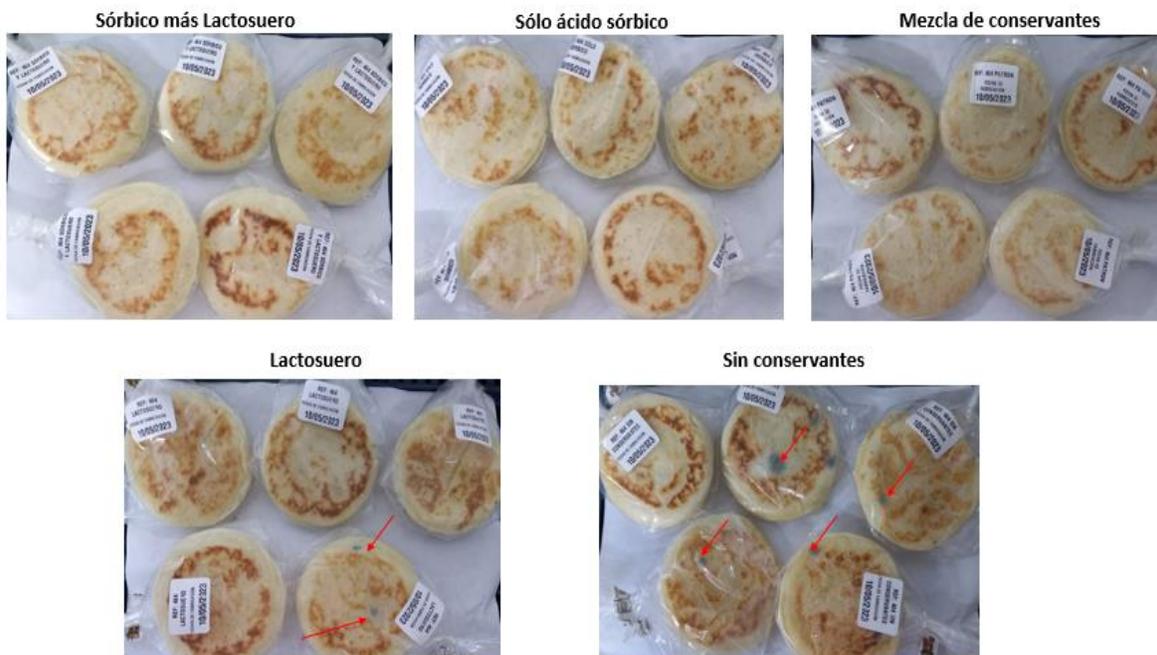


Figura 17. Evidencia fotográfica de arepas de yuca al final de los 50 días de seguimiento en refrigeración.

En esta figura las flechas indican las muestras contaminadas con moho.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

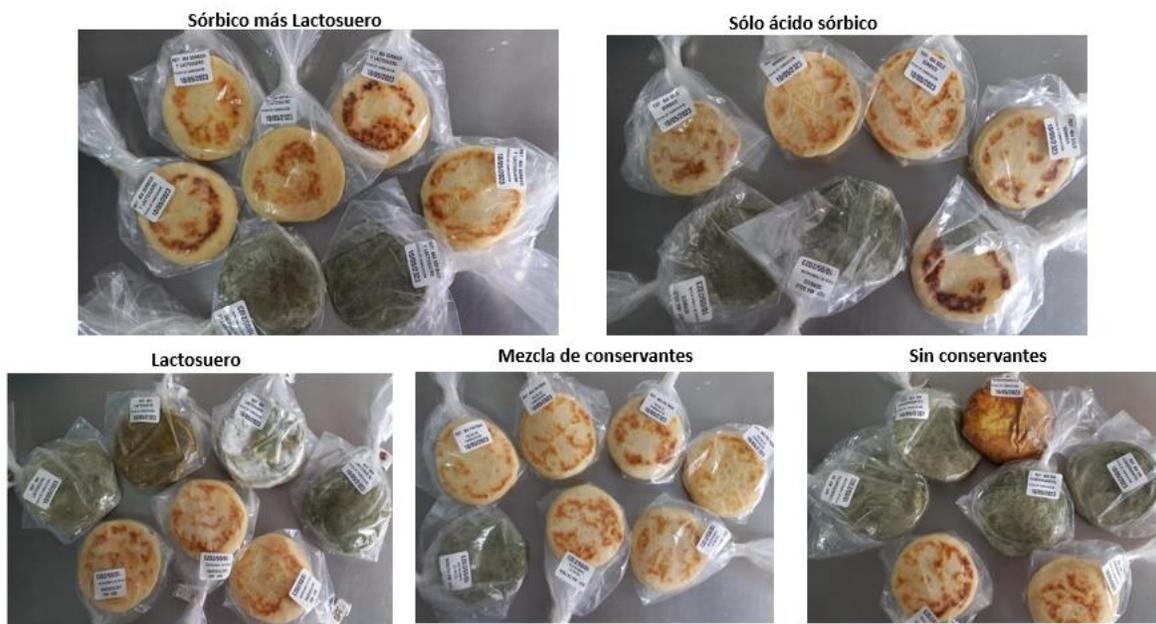
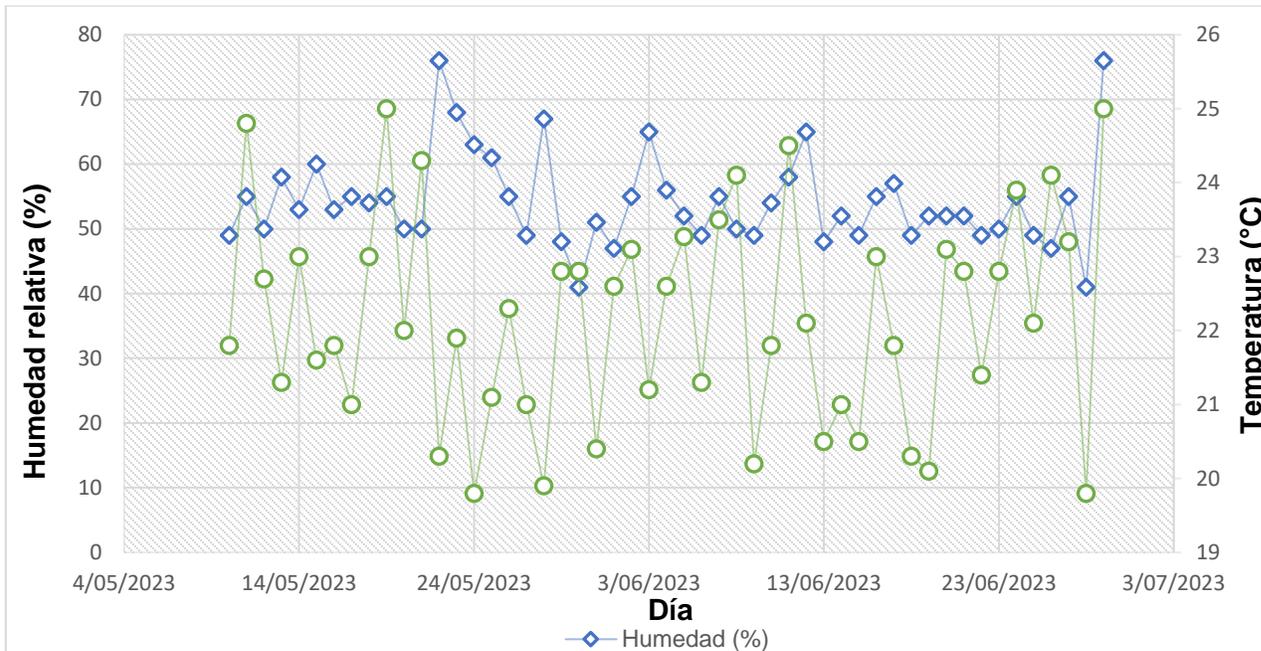


Figura 18. Evidencia fotográfica de arepas de yuca al final de los 50 días de seguimiento en cuarto ambiente.

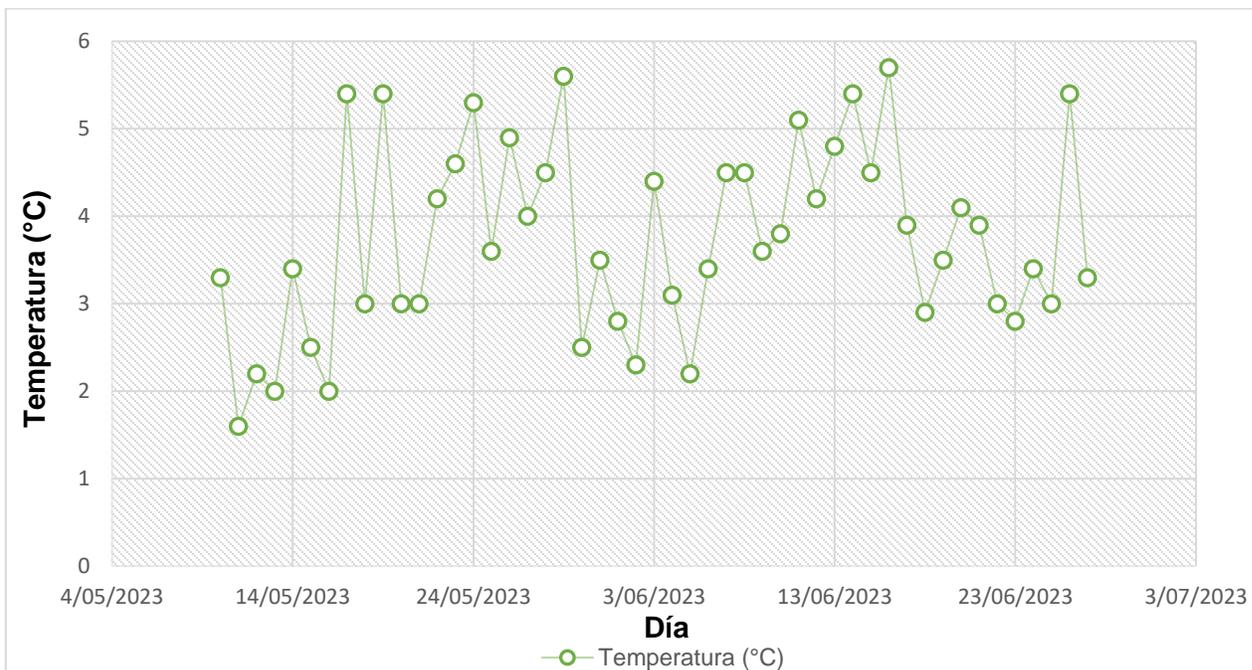
Tal como se mencionó anteriormente, el comportamiento de las formulaciones de arepas tanto de maíz como de yuca en cuarto ambiente como en refrigeración son muy diferentes; dicha diferencia se debe a que el cuarto ambiente presenta temperaturas que oscilan entre 19 y 25°C así como humedades relativas entre 41 y 76% (**Gráfica 11**), que según el estudio realizado por Carrillo (2003) son condiciones óptimas para el crecimiento de diferentes especies de *Penicillium* así como de otros mohos; sumado a que independientemente del tipo de arepa, estas presentan actividades de agua superiores a 0,8 que facilitan el crecimiento de diferentes microorganismos (mohos, levaduras y bacterias); mientras que, en cuarto de refrigeración las temperaturas oscilaron entre 1 y 6°C (**Gráfica 12**), siendo estas temperaturas alejadas del valor óptimo de crecimiento para la mayoría de mohos como *Penicillium* sp. Esto ha obligado a que las arepas en su mayoría estén almacenadas en condiciones de refrigeración lo que como se mencionó anteriormente dificulta su logística de distribución, e impide que se comercialicen fácilmente en mercados pequeños como los tienda a tienda (TAT) que no suelen mantener la cadena de frío.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 11. Condiciones de pH y humedad relativa en cuarto ambiente.



Gráfica 12. Condiciones de pH y humedad relativa en cuarto refrigeración.



Los resultados obtenidos en términos del recuento de mohos durante los 50 días de seguimiento tanto en arepas de maíz como de yuca permiten inferir que, la mezcla del ácido sórbico con el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina de páncreas bovino ambos a 500 ppm, resulta un buen sistema de conservación para prevenir principalmente el crecimiento de mohos como *Penicillium* sp. (Tabla 23); siendo

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

muy efectivo en arepas de maíz que incluyen queso en masa. En general, la mezcla en mención permitió obtener arepas tanto de maíz como de yuca con 50 días de vida útil bajo refrigeración, un tiempo que es superior al declarado por muchos marcas de arepas en donde la vida útil es por lo general de 45 días. De igual forma, este sistema de conservación sería de interés porque permitiría reducir la concentración de conservantes sintéticos adicionados en alimentos como las arepas, así como una alternativa para evitar el uso de otros conservantes tradicionales como el propionato de calcio, que según diferentes investigaciones su ingesta frecuente puede conllevar a problemas de salud (Perry et al., 2016; Tirosh et al., 2019; Xu et al., 2022).

Tabla 23. Resumen de resultados de vida útil en todas las formulaciones evaluadas.

Formulación	Arepa de maíz				Arepa de yuca			
	Refrigeración		Ambiente		Refrigeración		Ambiente	
	Vida útil (Días)	Porcentaje de contaminación (%)	Vida útil (Días)	Porcentaje de contaminación (%)	Vida útil (Días)	Porcentaje de contaminación (%)	Vida útil (Días)	Porcentaje de contaminación (%)
Sin conservantes	32	20	4	86	36	80	7	71
Ácido Sórbico (500 ppm)	31	100	4	71	50	0	8	43
Lactosuero (6667 ppm)	32	40	4	57	42	20	7	57
Ácido Sórbico y Lactosuero (500:500 ppm)	50	0	4	25	50	0	8	29
Ácido sórbico y Propionato de Calcio (874:499 ppm)	43	20	5	57	50	0	12	14

No obstante, pese a que la mezcla del ácido sórbico con el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina es una buena opción de sistema de conservación en arepas principalmente de maíz, no es tan efectiva al igual que otros conservantes tradicionales para prevenir el crecimiento de mohos en ambientes con temperaturas y humedades relativas variables, por lo que se debe seguir investigando nuevos sistemas de conservación que permitan incrementar la vida útil de las arepas en dichas condiciones ambientales; en este caso, sería interesante por ejemplo combinar el sistema de conservación de la mezcla del ácido sórbico con el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina, junto con un empaque diferente a las bolsas de polietileno de baja densidad, por ejemplo un empaque a vacío, siendo este empaque mucho más efectivo para prevenir el crecimiento de mohos en arepas, tal como se sugiere en el estudio realizado por Restrepo Flórez et al. (2012). Por otro lado, sería de interés poder identificar los péptidos que presentan potencial

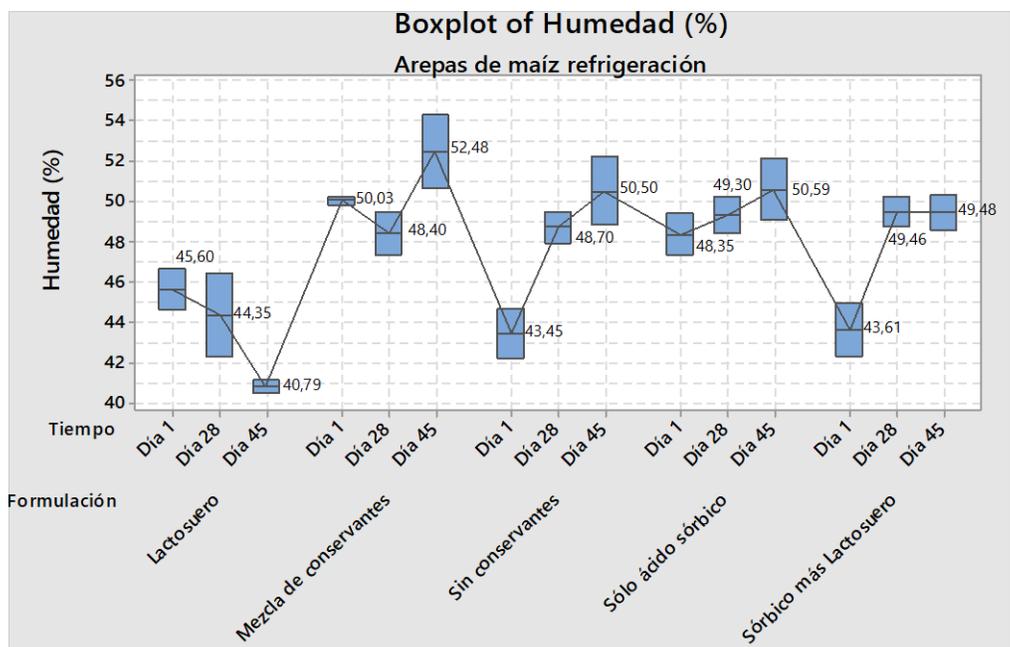
antifúngico en el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina, en aras de corroborar si son péptidos que ya están reportados en la literatura o que aún no han sido publicados; además que la identificación de estos péptidos permitiría purificar el hidrolizado en mención, lo que facilitaría su aplicación a concentraciones más altas que tal vez puedan exhibir una mejor actividad antifúngica sin requerir la adición de otros conservantes tradicionales.

Para evidenciar el impacto del uso del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina como conservante en arepas de maíz y yuca, en cuanto a sus características fisicoquímicas, se midió el pH y el porcentaje de humedad de cada formulación analizada al inicio, mitad y final de la vida útil de las arepas almacenadas en cuarto refrigeración y, al inicio y final de las arepas almacenadas en cuarto ambiente; adicionalmente, para determinar la significancia estadística de las variaciones encontradas entre las formulaciones y entre los tiempos de seguimiento evaluados, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías contemplando como variables la formulación y el tiempo o día de seguimiento; resultados que se pueden evidenciar a continuación en las **Gráficas 13 a 20** y en las **Tablas 24 a 31**.

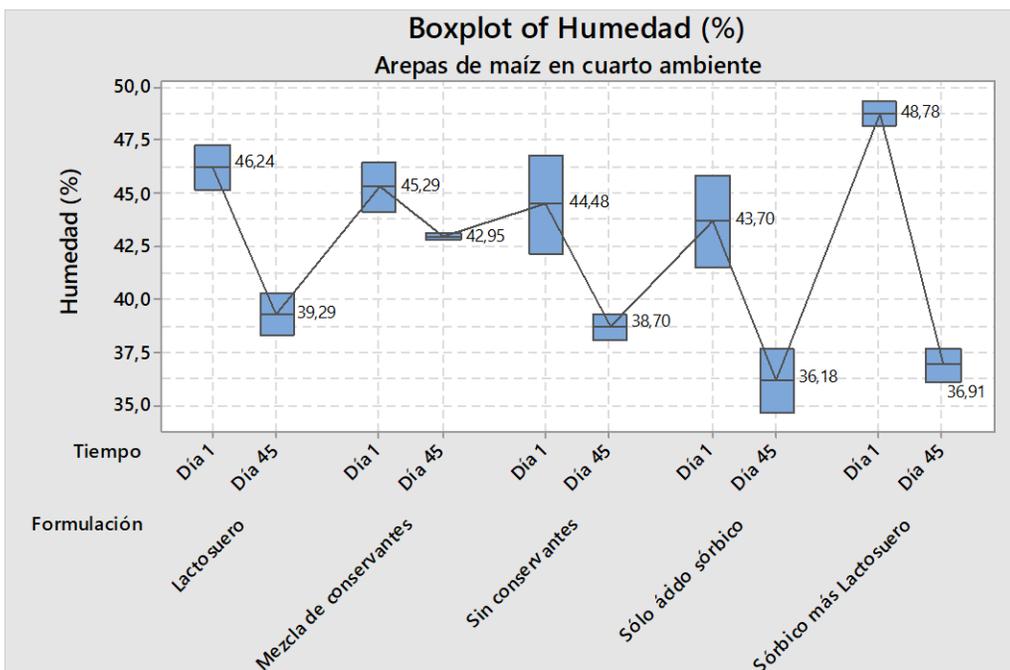
En las arepas de maíz, a nivel del porcentaje de humedad se observó que las formulaciones almacenadas en cuarto refrigeración presentaron un comportamiento diferente entre sí y a su vez variaciones en el tiempo (**Gráfica 13**); No obstante, en cuarto ambiente (**Gráfica 14**), se evidenció que existe una tendencia marcada en todas las formulaciones, en este caso hacía la pérdida de humedad al final del tiempo de seguimiento, siendo la magnitud de la variación diferente en cada formulación. Para evidenciar la significancia estadística de dichas variaciones entre las formulaciones y en los tres tiempos de seguimiento analizados, se realizó un ANOVA de dos vías por cada condición de almacenamiento; obteniendo como resultado que para las arepas de maíz almacenadas en refrigeración, si existen diferencias significativas entre las formulaciones (Valor $p \leq 0,05$) y en los tres tiempos de seguimiento analizados (Valor $P \leq 0,05$) (**Tabla 24** y **Figura A5** de la sección de anexos); mientras que, en el caso de las arepas almacenadas en ambiente, se observó que no existen diferencias significativas entre las formulaciones (Valor $p \geq 0,05$), pero si existen diferencias significativas en los tiempos de seguimiento analizados (Valor $p \leq 0,05$) (**Tabla 25** y **Figura A6** de la sección de anexos).

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 13. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en refrigeración. Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Gráfica 14. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en cuarto ambiente. Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tabla 24. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de maíz en refrigeración.

Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,000	0,013	0,005	1,72604	87,29%	75,42%

Tabla 25. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de maíz en cuarto ambiente.

Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,080	0,000	0,052	1,85373	90,42%	81,79%

Adicionalmente, es importante destacar que pese a las variaciones que presentan todas las formulaciones de arepas de maíz almacenadas en refrigeración en términos del porcentaje de humedad en el tiempo, todas las mediciones se encuentran dentro del rango de humedad admitido para arepas de maíz con adición de queso en la masa, según lo establecido por la NTC 5372:2007 “Arepas de maíz refrigeradas. Especificaciones de producto”, por lo cual se afirma que la adición del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina, no implicó un impacto negativo en cuanto al porcentaje de humedad de este tipo de arepas. No obstante, en todas las formulaciones de arepas de maíz almacenadas en cuarto de ambiente, se presentaron valores de porcentaje de humedad por fuera del rango indicado en la NTC en mención, lo que es de esperarse porque en dicha NTC sólo se encuentran contempladas las características de las arepas bajo refrigeración, y no existe otra normativa que sugiera la conformidad o no conformidad de este parámetro en arepas almacenadas en condiciones de temperatura diferentes a refrigeración. Sin embargo, se sabe que cambios drásticos en el porcentaje de humedad, principalmente desecación, afectan considerablemente características sensoriales como la textura (Vilgis, 2015).

Por otro lado, en las arepas de maíz se observó a grandes rasgos que en todas las formulaciones a ambas condiciones de almacenamientos evaluadas, existe una tendencia en la disminución del pH hacia el último día de seguimiento de vida útil (**Gráficas 15 y 16**). De igual forma, se evidenció que dicha disminución es mucho más drástica en las arepas almacenadas en cuarto ambiente. No obstante, se observó que tanto en refrigeración como en cuarto ambiente, existen diferencias significativas entre las formulaciones y en los tres tiempos de seguimiento evaluados (Valor $p \leq 0,05$) (**Tablas 26 y 27 y Figura A7 y A8** de la sección de anexos). De las variaciones percibidas entre las formulaciones se destaca la tasa de acidificación en el tiempo, en donde se evidenció que las formulaciones con mayor tasa son las de mezcla de conservantes y sin conservantes, mientras que, las de menor tasa de acidificación son las que contienen el lactosuero. Lo que

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

permite inferir que el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina podría evitar en cierta medida la rápida acidificación de las arepas de maíz, lo que mejora el desempeño sensorial de producto en el tiempo. A diferencia del porcentaje de humedad, el pH no es un parámetro que se encuentre especificado en la NTC 5372:2007 "Arepas de maíz refrigeradas. Especificaciones de producto", por lo cual no se puede corroborar la conformidad o no conformidad de las mediciones; sin embargo, en la experticia y en las especificaciones de producto terminado de algunas industrias como Don Maíz S.A.S, se sabe que valores de pH por debajo de 4,7 en este tipo de arepas se relaciona con una acidez desagradable para un consumidor; en este caso, se evidencia que dichos valores bajos de pH se alcanzan en todas las formulaciones almacenadas en cuarto ambiente hacia el final del seguimiento, a excepción de la formulación de sórbico y lactosuero, lo que demuestra un buen desempeño de la misma.

Tabla 26. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de maíz en refrigeración.

Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,016	0,000	0,013	0,0645497	88,04%	76,88%

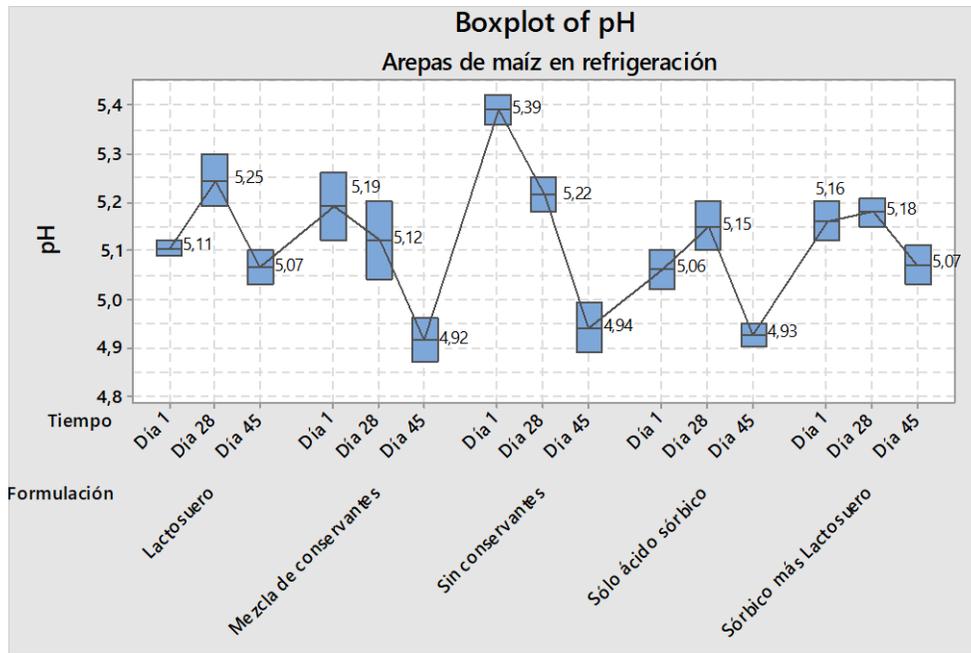
Tabla 27. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de maíz en cuarto ambiente.

Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,000	0,000	0,001	0,0876926	93,70%	86,74%

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

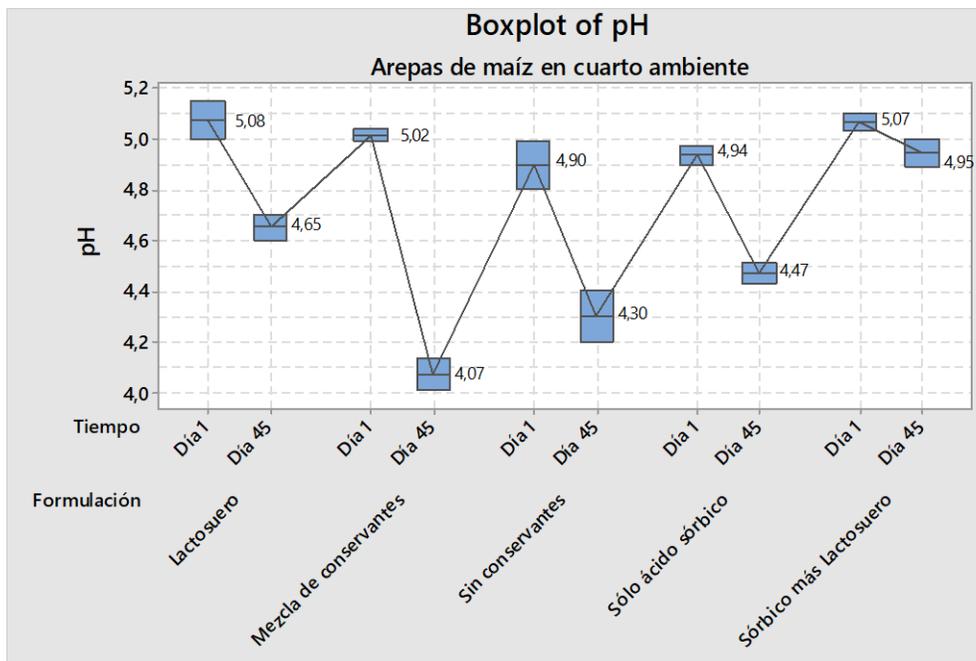
Gráfica 15. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en refrigeración.

Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Gráfica 16. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de maíz en cuarto ambiente.

Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

En las arepas de yuca en términos del porcentaje de humedad, se observó que existen diferencias significativas (Valor $p \leq 0,05$) entre las formulaciones y en los tres tiempos de seguimiento evaluados tanto en las muestras almacenadas en refrigeración como las almacenadas en cuarto ambiente (**Gráficas 17 y 18**) (**Tablas 28 y 29** y **Figuras A9 y A10** de la sección de anexos). Aunque se evidenciaron diferencias significativas entre las formulaciones almacenadas en cuarto ambiente, en todas se observó una tendencia hacia la disminución del porcentaje de humedad en el tiempo, tal como se evidenció también en las arepas de maíz almacenadas bajo estas mismas condiciones. En las arepas de yuca a diferencia de las arepas de maíz, no existe una normativa en la cual se especifique las características fisicoquímicas de conformidad del producto, puesto que, en la NTC 5372, sólo se mencionan arepas cien por ciento maíz, arepas con queso en masa y arepas rellenas de queso. Por otro lado, de dichos resultados obtenidos, no se puede inferir que el uso del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina implique algún efecto positivo o negativo en arepas de yuca, en términos del porcentaje de humedad.

Tabla 28. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de yuca en refrigeración.

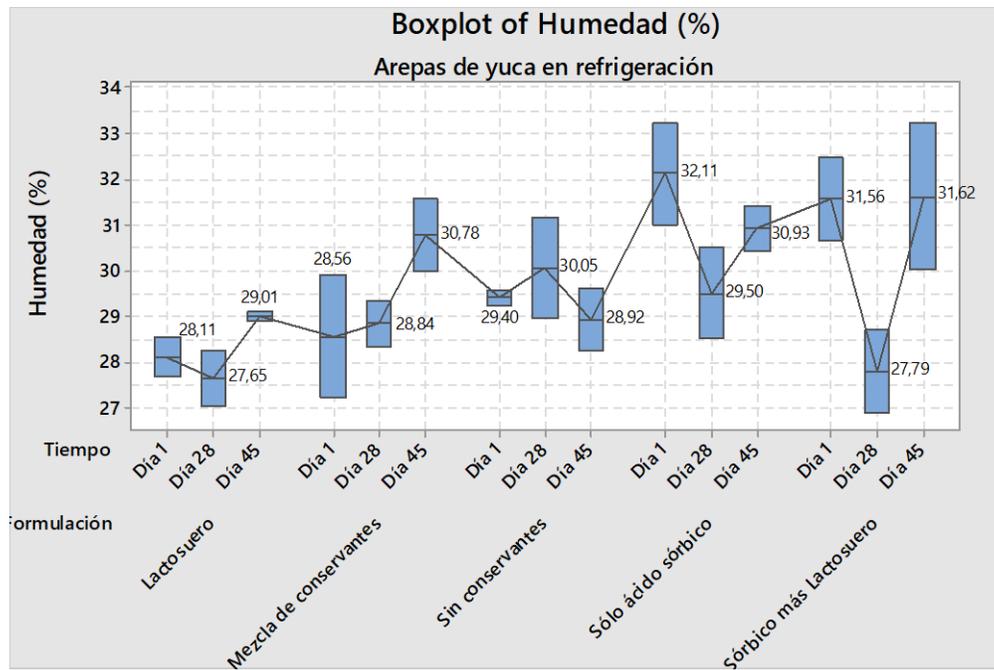
Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,025	0,041	0,148	1,24626	71,58%	45,05%

Tabla 29. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del porcentaje de humedad en arepas de yuca en cuarto ambiente.

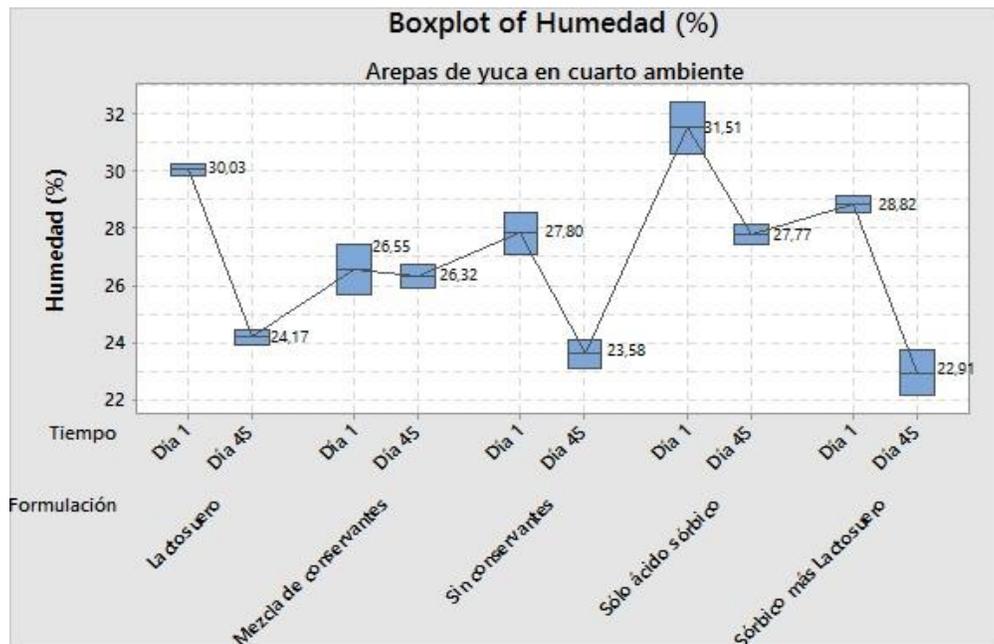
Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,000	0,000	0,005	0,845086	95,22%	90,92%

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 17. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en refrigeración. Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Gráfica 18. Diagrama Boxplot del porcentaje de humedad en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en cuarto ambiente. Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

En cuanto al pH en las arepas de yuca, se pudo evidenciar que si existen variaciones significativas entre las formulaciones y los tres tiempos de seguimiento evaluados (Valor $p \leq 0,05$) (**Tablas 30 y 31** y **Figuras A11 y A12** de la sección de anexos), tanto en condiciones de refrigeración como de cuarto ambiente. De las variaciones entre las formulaciones se destaca que las formulaciones de lactosuero y sin conservantes en ambos ambientes evaluados, fueron las que reportaron valores de pH más bajos; lo que permite inferir que en arepas de yuca la aplicación del hidrolizado del lactosuero WPC 80 con tripsina a altas concentraciones puede conllevar a una tasa de acidificación alta lo cual se puede asociar con un impacto negativo en el desempeño sensorial. Sin embargo, dichos valores de pH no están por debajo de 4,7, que como se mencionó anteriormente valores inferiores a dicho valor se asocian a un mal desempeño sensorial del producto.

Tabla 30. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de yuca en refrigeración.

Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,001	0,001	0,029	0,0583952	84,58%	70,19%

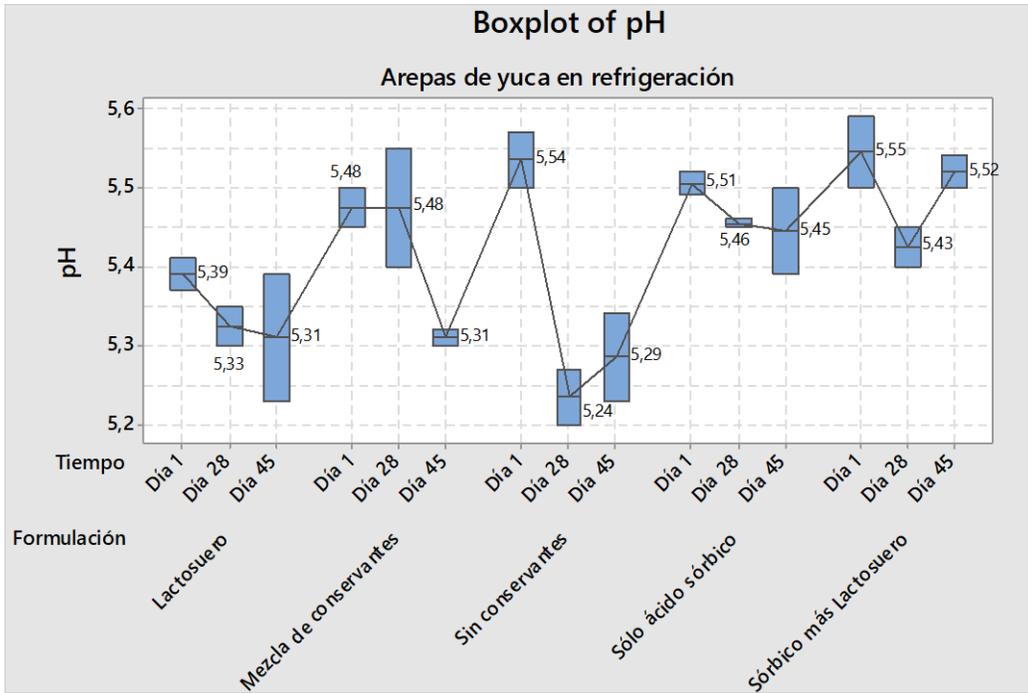
Tabla 31. Resultados de ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) del pH en arepas de yuca en cuarto ambiente.

Resultados de ANOVA					
Valor p para Formulación	Valor p para tiempo	Valor p para interacción	S	Rs-sq	R-sq (adj)
0,000	0,000	0,027	0,0334664	95,12%	90,73%

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

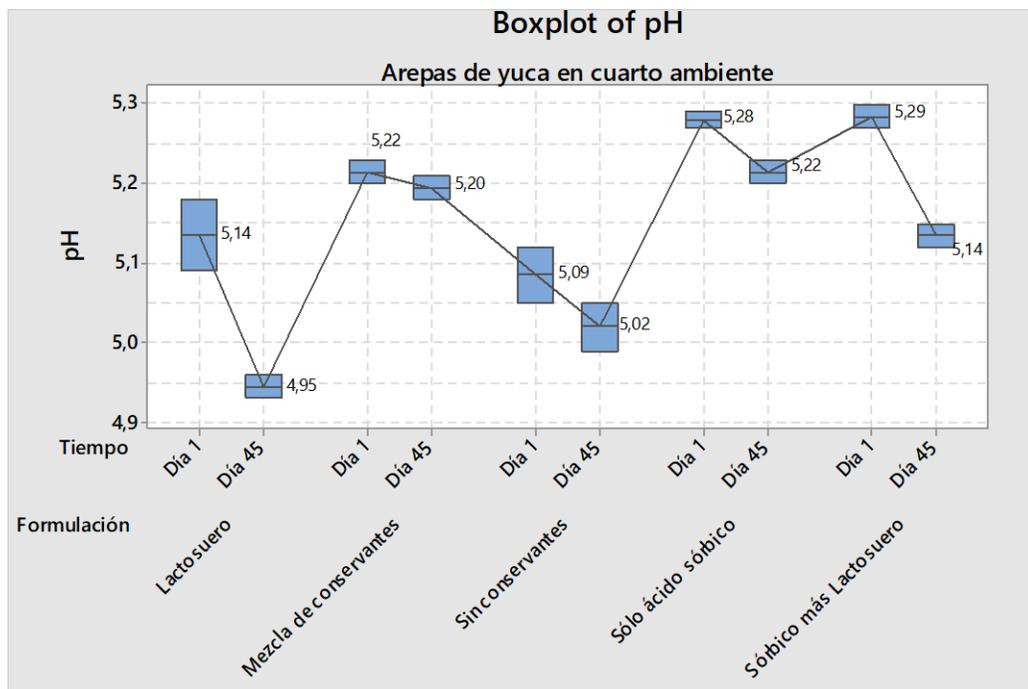
Gráfica 19. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en refrigeración.

Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



Gráfica 20. Diagrama Boxplot del pH en el tiempo para cada formulación de arepas de yuca en cuarto ambiente.

Los valores presentados al lado de cada caja corresponden a los valores medios.



De los resultados presentados anteriormente, se pudo inferir que el uso del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina no implica cambios en las características fisicoquímicas de las arepas de maíz y yuca; teniendo en cuenta que las formulaciones que lo contenían cumplían mayoritariamente con las especificaciones de producto sugeridas según la NTC 5372 o por especificaciones internas de producto de compañías como Don Maíz S.A.S (**Figuras A13 y A14**). Adicionalmente, se evidenció que en la mayoría de formulaciones incluyendo las que contenían conservantes tradicionales presentaron resultados fuera de especificación, pero únicamente en las arepas de maíz y de yuca almacenadas en cuarto ambiente; lo cual sugiere que las arepas de maíz y de yuca almacenadas a estas condiciones no pueden presentar vidas útiles prolongadas debido principalmente a problemas como la rápida desecación y acidificación del producto.

Además de la evaluación del impacto del uso del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina en las características fisicoquímicas de pH y porcentaje de humedad, en arepas de maíz y yuca, se evaluó a su vez el impacto sensorial. Para tal propósito se realizó un análisis sensorial con panel entrenado únicamente para las arepas bajo condiciones de refrigeración, identificando las preferencias en cuanto al sabor y la acidez de las formulaciones evaluadas; efectuando dichas pruebas al inicio, mitad y final de los 50 días de seguimiento, con el fin de evidenciar a su vez si existía variaciones en estas preferencias con respecto al transcurso del tiempo. Para dicha prueba las formulaciones estaban demarcadas con números de tres cifras así: mezcla de conservantes 465; sólo ácido sórbico 780; sórbico más lactosuero 652; lactosuero 345 y sin conservantes 234. En aras de evidenciar si existía diferencias significativas en cuanto a la preferencia en sabor y en acidez entre las formulaciones en mención se llevaron a cabo a su vez pruebas no paramétricas de kruskal Wallis. Los resultados obtenidos en estas pruebas se pueden evidenciar en las **Figuras A15 a A18** de la sección de anexos y en las **Tablas 32 a 43**.

En las arepas de maíz, se observó que en cuanto al sabor si existen diferencias significativas entre las formulaciones al inicio y mitad de los 50 días de seguimiento (Valor $p \leq 0,05$) (**Tablas 32 y 33**), pero no se observan diferencias significativas al final del tiempo de seguimiento (Valor $p \geq 0,05$) (**Tabla 34**). De igual forma se evidenció que al inicio del tiempo de seguimiento la preferencia de los consumidores se inclinó hacia las formulaciones que incluían el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina (lactosuero y sórbico más lactosuero) y la mezcla de conservantes; mientras que, a la mitad del tiempo de seguimiento las formulaciones con mayor preferencia fueron la de sórbico más lactosuero, seguida por la de lactosuero, (formulaciones con las medianas y valores z más bajos teniendo en cuenta que en la escala de preferencia utilizada 1 era la de mejor sabor y 5 la de peor sabor). En cuanto a la acidez, se observó que si existen diferencias significativas entre las formulaciones al inicio y final del tiempo de seguimiento (Valor $p \leq 0,05$) (**Tablas 35 y 37**), pero no se evidencian diferencias significativas a la mitad del tiempo de seguimiento (Valor $p \geq 0,05$) (**Tabla 36**). Adicionalmente, se observó que en cuanto a acidez, a los tiempos en los cuales se evidenciaron diferencias entre las formulaciones, la formulación menos ácida fue la mezcla de conservantes en el

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

tiempo inicial del seguimiento y la de sórbico más lactosuero al tiempo final de seguimiento (formulaciones con las medianas y valores z más altos, teniendo en cuenta que en la escala de acidez utilizada 1 era la más ácida y 5 la menos ácida). De estos resultados se destaca que el uso del lactosuero WPC 80 permite mejorar principalmente el sabor de las arepas de maíz, y tal como mencionó en algunos comentarios reportados por los panelistas esta mejora se asocia más con la potencialización del sabor a queso.

Tabla 32. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de maíz al inicio del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	4,0000	2,38
Lactosuero (345)	2,0000	-1,70
Mezcla de conservantes (465)	2,0000	-1,70
Sórbico más lactosuero (652)	2,0000	-1,70
Sólo ácido sórbico (780)	5,0000	2,72
Valor p (No ajustado para empates)	0,0020	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0010	

Tabla 33. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de maíz a la mitad del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	4,0000	2,38
Lactosuero (345)	2,0000	-0,68
Mezcla de conservantes (465)	3,0000	-0,34
Sórbico más lactosuero (652)	1,0000	-2,72
Sólo ácido sórbico (780)	4,0000	1,36
Valor p (No ajustado para empates)	0,0150	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0120	

Tabla 34. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de maíz al final del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	5,0000	0,92
Lactosuero (345)	3,0000	-0,14
Mezcla de conservantes (465)	3,0000	0,54
Sórbico más lactosuero (652)	3,0000	-0,85
Sólo ácido sórbico (780)	3,0000	-0,48
Valor p (No ajustado para empates)	0,7940	
Valor p (Ajustado para empates)	0,7810	

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tabla 35. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de maíz al inicio del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	2,0000	-1,36
Lactosuero (345)	2,0000	-0,34
Mezcla de conservantes (465)	5,0000	2,04
Sórbico más lactosuero (652)	4,0000	1,70
Sólo ácido sórbico (780)	1,0000	-2,04
Valor p (No ajustado para empates)	0,0320	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0270	

Tabla 36. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de maíz a la mitad del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	4,0000	0,95
Lactosuero (345)	1,0000	-1,80
Mezcla de conservantes (465)	4,0000	0,54
Sórbico más lactosuero (652)	3,0000	0,00
Sólo ácido sórbico (780)	2,0000	0,31
Valor p (No ajustado para empates)	0,4590	
Valor p (Ajustado para empates)	0,4370	

Tabla 37. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de maíz al final del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	4,0000	0,24
Lactosuero (345)	1,0000	-2,79
Mezcla de conservantes (465)	3,0000	-0,17
Sórbico más lactosuero (652)	5,0000	2,14
Sólo ácido sórbico (780)	4,0000	0,58
Valor p (No ajustado para empates)	0,0370	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0320	

En las arepas de yuca, en términos del sabor se observó que existen diferencias significativas entre las formulaciones al inicio y mitad del tiempo de seguimiento (Valor $p \leq 0,05$) (**Tablas 38** y **39**), pero no se observan diferencias significativas al final del tiempo de seguimiento (Valor $p \geq 0,05$) (**Tabla 40**). Al inicio y a la mitad del seguimiento, los panelistas mostraron una mayor preferencia hacia las formulaciones que contenían el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina (formulaciones con las medianas y valores z más bajos teniendo en cuenta que en la escala de preferencia utilizada 1 era la de mejor sabor y 5 la de peor sabor). Por

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

otro lado, en cuanto a la acidez percibida, se evidenció que existen diferencias significativas entre las formulaciones al inicio y mitad del tiempo de seguimiento (Valor $p \leq 0,05$) (**Tablas 41 y 42**), pero no se observan diferencias significativas al final del tiempo de seguimiento (Valor $p \geq 0,05$) (**Tabla 43**); siendo la formulación categorizada como la menos ácida, la mezcla de conservantes (formulación con la mediana y valor z más alto, teniendo en cuenta que en la escala de acidez utilizada 1 era la más ácida y 5 la menos ácida). De estos resultados, se puede evidenciar que en las arepas de yuca el uso del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina mejora en gran medida el sabor del producto, atribuyéndose dicha mejora a como mencionaron algunos panelistas, un aporte de rancidez que potencializa el sabor agrio característico del almidón de yuca y el rancio típico del queso costeño.

Tabla 38. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de yuca al inicio del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	5,0000	2,38
Lactosuero (345)	1,0000	-3,06
Mezcla de conservantes (465)	3,0000	1,02
Sórbico más lactosuero (652)	2,0000	-2,04
Sólo ácido sórbico (780)	4,0000	1,70
Valor p (No ajustado para empates)	0,0010	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0010	

Tabla 39. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de yuca a la mitad del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	5,0000	2,72
Lactosuero (345)	2,0000	-1,36
Mezcla de conservantes (465)	3,0000	0,00
Sórbico más lactosuero (652)	1,0000	-3,06
Sólo ácido sórbico (780)	4,0000	1,70
Valor p (No ajustado para empates)	0,0020	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0010	

Tabla 40. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para sabor de arepas de yuca al final del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	2,0000	-0,37
Lactosuero (345)	3,0000	-0,24
Mezcla de conservantes (465)	5,0000	0,68
Sórbico más lactosuero (652)	3,0000	-0,07

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Formulación	Mediana	Valor Z
Sólo ácido sórbico (780)	3,0000	0,00
Valor p (No ajustado para empates)	0,9710	
Valor p (Ajustado para empates)	0,9690	

Tabla 41. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de yuca al inicio del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	2,0000	-1,02
Lactosuero (345)	1,0000	-3,06
Mezcla de conservantes (465)	5,0000	2,38
Sórbico más lactosuero (652)	3,0000	0,00
Sólo ácido sórbico (780)	4,0000	1,70
Valor p (No ajustado para empates)	0,0040	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0030	

Tabla 42. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de yuca a la mitad del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	1,0000	-2,04
Lactosuero (345)	2,0000	-1,36
Mezcla de conservantes (465)	5,0000	3,40
Sórbico más lactosuero (652)	3,0000	0,68
Sólo ácido sórbico (780)	2,0000	-0,68
Valor p (No ajustado para empates)	0,0050	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0040	

Tabla 43. Resultado de pruebas de Kruskal Wallis para acidez de arepas de yuca al final del tiempo de seguimiento.

Formulación	Mediana	Valor Z
Sin conservantes (234)	4,0000	0,68
Lactosuero (345)	4,0000	2,04
Mezcla de conservantes (465)	2,0000	-1,70
Sórbico más lactosuero (652)	3,0000	0,34
Sólo ácido sórbico (780)	2,0000	-1,36
Valor p (No ajustado para empates)	0,1090	
Valor p (Ajustado para empates)	0,0960	

4.4. Evaluación de la actividad antifúngica mediante inoculación directa de las arepas de maíz y de yuca

Para evaluar el efecto antifúngico del lactosuero hidrolizado y compararlo con los conservantes tradicionales empleados en arepas de maíz y de yuca, se inoculó de forma directa esporas de *Penicillium* sp, sobre las mismas formulaciones evaluadas en la prueba anterior, realizando un seguimiento diario por 50 días del porcentaje de muestras con dicho moho. De esta prueba se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación en las **Gráficas 21 y 22**, en las cuales se evidencia que las formulaciones en las que se observó un mayor efecto antifúngico tanto en arepas de maíz como arepas de yuca fueron: la formulación con mezcla de conservantes ácido sórbico y propionato de calcio a 874 ppm y 499 ppm, respectivamente, y la formulación que combinaba el ácido sórbico con el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina ambos a 500 ppm, puesto que presentaron la mayor vida útil y el menor porcentaje de contaminación al final del seguimiento realizado. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el seguimiento de vida útil en refrigeración y en ambiente, presentados en el literal anterior. En las **Figuras 19 y 20** se puede observar las evidencias fotográficas del seguimiento realizado en esta prueba, y en la **Tabla 44**, se resumen los resultados de vida útil y de porcentaje de contaminación con mohos obtenidos para cada formulación.



Figura 19. Resultados de prueba de inoculación directa en arepas de maíz al final del seguimiento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

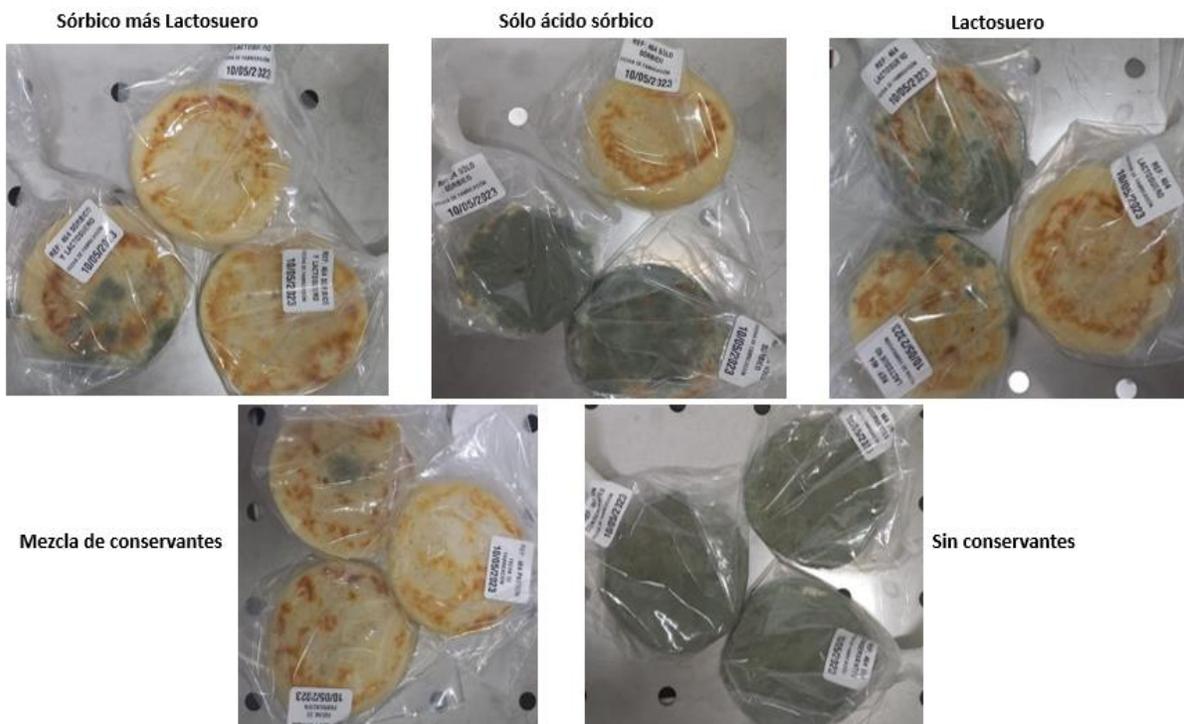


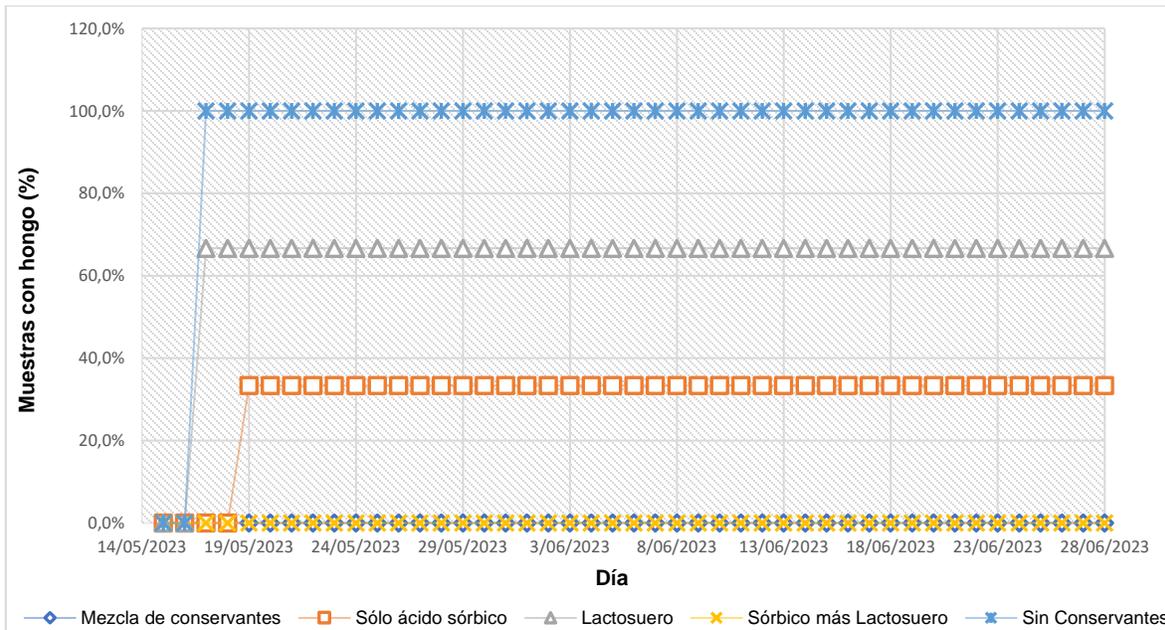
Figura 20. Resultados de prueba de inoculación directa en arepas de yuca al final del seguimiento.

Tabla 44. Resultados de vida útil y de porcentaje de contaminación con mohos en prueba de inoculación directa.

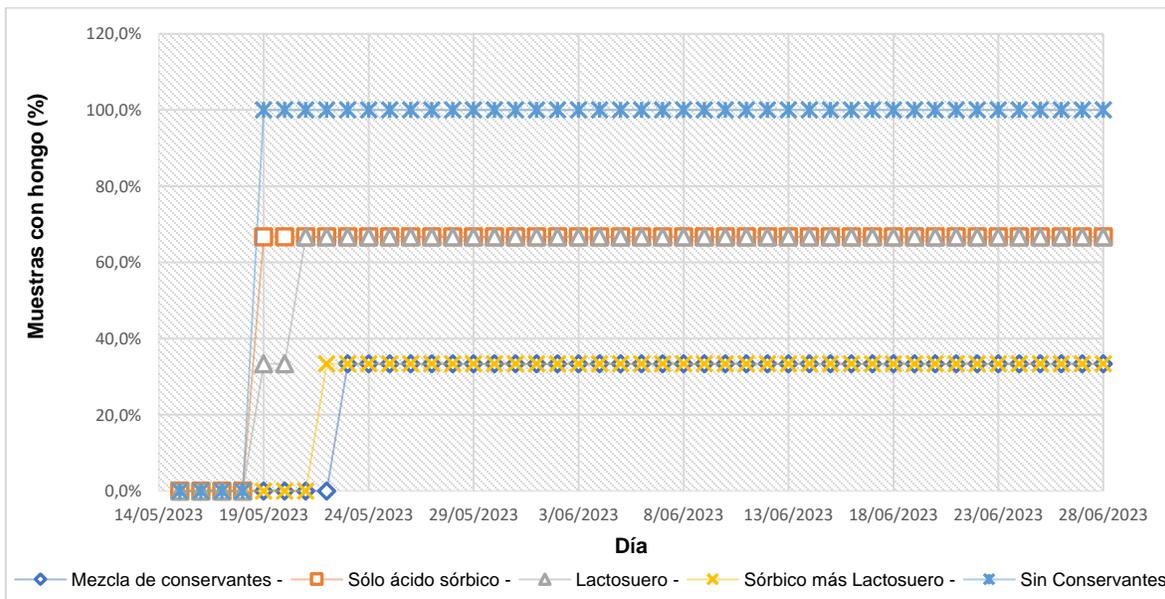
Formulación	Arepas de Maíz		Arepas de Yuca	
	Vida útil (Días)	Porcentaje de contaminación (%)	Vida útil (Días)	Porcentaje de contaminación (%)
Sin conservantes	5	100	6	100
Ácido Sórbico (500 ppm)	6	33	6	66
Lactosuero (6667 ppm)	6	67	6	66
Ácido Sórbico y Lactosuero (500:500 ppm)	50	0	10	33
Ácido sórbico y Propionato de Calcio (874:499 ppm)	50	0	10	33

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Gráfica 21. Resultados de inoculación directa de *Penicillium* sp. en arepas de maíz.



Gráfica 22. Resultados de inoculación directa de *Penicillium* sp. en arepas de yuca.



Finalmente, de los estudios realizados en la presente investigación se puede inferir que el uso del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina es una buena opción para la conservación de arepas de maíz y de yuca, en especial si se combina con ácido sórbico puesto que permite obtener vidas útiles de 50 días en refrigeración, además que no genera impactos significativos en las características fisicoquímicas de porcentaje de humedad y pH, y que en cuanto a impacto sensorial se evidencia que su uso como ingrediente mejora considerablemente el sabor del producto. Sin

embargo, la adición del hidrolizado en mención no resulta efectiva, al igual que la adición de conservantes tradicionales como el ácido sórbico y el propionato de calcio, para alargar la vida útil de las arepas de maíz y de yuca que se almacenan principalmente a condiciones de temperatura más altas que la refrigeración; lo que sugiere que además del uso de conservantes, se requiere de otros métodos que permitan alargar su vida útil como por ejemplo, nuevas tecnologías de empaque. Adicionalmente, es de relevancia resaltar que este estudio así como el de Gamba et al. (2016), son de los pocos que existen sobre la adición de ingredientes que podrían actuar como posibles conservantes naturales en arepas. De igual forma, se destaca que el presente estudio sería el primero en el cual se evalúa el potencial antifúngico del lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina en arepas de maíz y de yuca.

5. Conclusiones

En el presente estudio se logró demostrar que el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina bovina permite generar péptidos con potencial antifúngico frente a *Penicillium* sp.; si bien este hidrolizado no tiene el mismo efecto antifúngico que conservantes tradicionales como el ácido sórbico, sí presenta un efecto similar a otros conservantes como el propionato de calcio que es comúnmente empleado en la elaboración de productos de panadería. Adicionalmente, se demostró que el hidrolizado en mención no genera impacto en las características fisicoquímicas (Porcentaje de humedad y pH) de arepas de maíz y de yuca durante su vida útil; sin embargo, si produce un cambio en el perfil sensorial de las arepas puesto que resalta las notas lácteas y rancias, mejorando en consecuencia el sabor de las mismas. Finalmente, dado el potencial antifúngico evidenciado, así como su impacto positivo en el sabor se concluye que este hidrolizado puede servir como un aditivo natural para disminuir el uso de conservantes tradicionales en arepas de maíz y de yuca.

6. Recomendaciones

Dado al potencial antifúngico evidenciado en el lactosuero WPC 80 hidrolizado con tripsina bovina se recomienda seguir haciendo estudios en primera instancia de caracterización para identificar los péptidos con efecto antifúngico. De igual forma, esta caracterización permitiría conocer el método de separación que podría usarse para purificar el hidrolizado en aras de concentrar dichos péptidos, lo cual sería de utilidad para incrementar el efecto antifúngico observado. Adicionalmente, se recomienda también realizar un análisis proximal de las arepas o el alimento que incluyan el hidrolizado como potencial conservante, en aras de determinar los aportes nutricionales que este puede añadir al alimento. Por último, se sugiere realizar un análisis de vida útil en arepas y en otros alimentos similares usando concentraciones más bajas semejantes a las permitidas para el ácido sórbico según la Resolución 4125 de 1991 evaluando a su vez el impacto en las características fisicoquímicas (porcentaje de humedad y pH) y sensoriales del producto.

7. Anexos

One-way ANOVA: Diametro Día 2 (cm) versus Conservante

* NOTE * Cannot draw the interval plot for the Tukey procedure. Interval plots for comparisons are illegible with more than 45 intervals.

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Conservante	13	Ácido sórbico 1000 ppm; Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas; Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas; Control; Formea® LT 1200 BG 24 horas; Formea® LT 1200 BG 6 horas; Lactosuero sin hidrolizar; Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm; Papaína 4000 DB 24 horas; Propionato de calcio 3000 ppm; Protamex® 24 horas; Protamex® 6 horas; Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Conservante	12	115,928	9,6606	25,20	0,000
Error	26	9,967	0,3833		
Total	38	125,894			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,619139	92,08%	88,43%	82,19%

Means

Conservante	N	Mean	StDev
Ácido sórbico 1000 ppm	3	0,000000	0,000000
Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas	3	4,133	0,666
Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas	3	5,367	0,777
Control	3	4,833	0,764
Formea® LT 1200 BG 24 horas	3	4,6333	0,1155
Formea® LT 1200 BG 6 horas	3	5,133	0,473
Lactosuero sin hidrolizar	3	5,667	0,757
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	3	0,400	0,693
Papaína 4000 DB 24 horas	3	4,767	0,751
Propionato de calcio 3000 ppm	3	3,033	0,252
Protamex® 24 horas	3	4,833	0,764
Protamex® 6 horas	3	4,667	0,651
Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas	3	4,000	0,656

Figura A1. Resultados de Minitab 17 para ANOVA del diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. al día dos de seguimiento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

One-way ANOVA: Diametro Día 11 (cm) versus Conservante

* NOTE * Cannot draw the interval plot for the Tukey procedure. Interval plots for comparisons are illegible with more than 45 intervals.

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Conservante	13	Ácido sórbico 1000 ppm; Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas; Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas; Control; Formea® LT 1200 BG 24 horas; Formea® LT 1200 BG 6 horas; Lactosuero sin hidrolizar; Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm; Papaina 4000 DB 24 horas; Propionato de calcio 3000 ppm; Protamex® 24 horas; Protamex® 6 horas; Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Conservante	12	224,48	18,7069	25,86	0,000
Error	26	18,81	0,7233		
Total	38	243,29			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,850490	92,27%	88,70%	82,61%

Conservante	N	Mean	StDev
Ácido sórbico 1000 ppm	3	0,567	0,981
Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas	3	8,300	0,000
Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas	3	8,300	0,000
Control	3	8,300	0,000
Formea® LT 1200 BG 24 horas	3	8,300	0,000
Formea® LT 1200 BG 6 horas	3	8,300	0,000
Lactosuero sin hidrolizar	3	8,300	0,000
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	3	3,00	2,91
Papaina 4000 DB 24 horas	3	8,300	0,000
Propionato de calcio 3000 ppm	3	8,300	0,000
Protamex® 24 horas	3	8,300	0,000
Protamex® 6 horas	3	8,300	0,000
Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas	3	8,300	0,000

Figura A2. Resultados de Minitab 17 para ANOVA del diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. al día once de seguimiento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Conservante	N	Mean	Grouping
Lactosuero sin hidrolizar	3	5,667	A
Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas	3	5,367	A
Formea® LT 1200 BG 6 horas	3	5,133	A
Protamex® 24 horas	3	4,833	A B
Control	3	4,833	A B
Papaína 4000 DB 24 horas	3	4,767	A B
Protamex® 6 horas	3	4,667	A B
Formea® LT 1200 BG 24 horas	3	4,6333	A B
Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas	3	4,133	A B
Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas	3	4,000	A B
Propionato de calcio 3000 ppm	3	3,033	B
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	3	0,400	C
Ácido sórbico 1000 ppm	3	0,000000	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura A3. Resultados de Minitab 17 para método de Tukey del diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. al día dos de seguimiento.

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Conservante	N	Mean	Grouping
Trypsin EC. 3.4.21.4 de páncreas bovino 24 horas	3	8,300	A
Protamex® 6 horas	3	8,300	A
Protamex® 24 horas	3	8,300	A
Propionato de calcio 3000 ppm	3	8,300	A
Papaína 4000 DB 24 horas	3	8,300	A
Lactosuero sin hidrolizar	3	8,300	A
Formea® LT 1200 BG 6 horas	3	8,300	A
Formea® LT 1200 BG 24 horas	3	8,300	A
Control	3	8,300	A
Alcalase® Pure 2.4 L 6 horas	3	8,300	A
Alcalase® Pure 2.4 L 24 horas	3	8,300	A
Mezcla de ácido sórbico y propionato de calcio 874 ppm y 499 ppm	3	3,00	B
Ácido sórbico 1000 ppm	3	0,567	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Figura A4. Resultados de Minitab 17 para método de Tukey del diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. al día once de seguimiento.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

General Linear Model: Humedad (%) versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	3	Día 1; Día 28; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	160,54	40,135	13,47	0,000
Tiempo	2	34,79	17,396	5,84	0,013
Formulación*Tiempo	8	111,48	13,935	4,68	0,005
Error	15	44,69	2,979		
Total	29	351,50			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,72604	87,29%	75,42%	49,15%

Figura A5. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de maíz en refrigeración.

General Linear Model: Humedad (%) versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	2	Día 1; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	39,61	9,902	2,88	0,080
Tiempo	1	237,43	237,429	69,09	0,000
Formulación*Tiempo	4	47,13	11,784	3,43	0,052
Error	10	34,36	3,436		
Total	19	358,54			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,85373	90,42%	81,79%	61,66%

Figura A6. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de maíz en cuarto ambiente.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

General Linear Model: pH versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	3	Día 1; Día 28; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	0,07175	0,017937	4,30	0,016
Tiempo	2	0,26269	0,131343	31,52	0,000
Formulación*Tiempo	8	0,12561	0,015702	3,77	0,013
Error	15	0,06250	0,004167		
Total	29	0,52255			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0645497	88,04%	76,88%	52,16%

Figura A7. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de maíz en refrigeración.

General Linear Model: pH versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	2	Día 1; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	0,58372	0,14593	18,98	0,000
Tiempo	1	1,30050	1,30050	169,12	0,000
Formulación*Tiempo	4	0,35780	0,08945	11,63	0,001
Error	10	0,07690	0,00769		
Total	19	2,31892			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0876926	96,68%	93,70%	86,74%

Figura A8. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de maíz en cuarto ambiente.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

General Linear Model: Humedad (%) versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	3	Día 1; Día 28; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	23,57	5,892	3,79	0,025
Tiempo	2	12,31	6,157	3,96	0,041
Formulación*Tiempo	8	22,80	2,850	1,83	0,148
Error	15	23,30	1,553		
Total	29	81,97			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,24626	71,58%	45,05%	0,00%

Figura A9. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de yuca en refrigeración.

General Linear Model: Humedad (%) versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	2	Día 1; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	41,122	10,2805	14,40	0,000
Tiempo	1	79,680	79,6803	111,57	0,000
Formulación*Tiempo	4	21,415	5,3537	7,50	0,005
Error	10	7,142	0,7142		
Total	19	149,359			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,845086	95,22%	90,92%	80,87%

Figura A10. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de porcentaje de humedad en arepas de yuca en cuarto ambiente

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

General Linear Model: pH versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	3	Día 1; Día 28; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	0,11355	0,028388	8,33	0,001
Tiempo	2	0,08329	0,041643	12,21	0,001
Formulación*Tiempo	8	0,08375	0,010468	3,07	0,029
Error	15	0,05115	0,003410		
Total	29	0,33174			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0583952	84,58%	70,19%	38,32%

Figura A11. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de yuca en refrigeración.

General Linear Model: pH versus Formulación; Tiempo

Method

Factor coding (-1; 0; +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Formulación	Fixed	5	Lactosuero; Mezcla de conservantes; Sin conservantes; Sólo ácido sórbico; Sórbico más Lactosuero
Tiempo	Fixed	2	Día 1; Día 45

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Formulación	4	0,15093	0,037733	33,69	0,000
Tiempo	1	0,04802	0,048020	42,87	0,000
Formulación*Tiempo	4	0,01943	0,004857	4,34	0,027
Error	10	0,01120	0,001120		
Total	19	0,22958			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0334664	95,12%	90,73%	80,49%

Figura A12. Resultados de Minitab 17 para ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) de pH en arepas de yuca en cuarto ambiente.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

Arepas de Maíz										
Formulación	pH					Porcentaje de Humedad (%)				
	Especificación	Resultado Refrigeración	Conclusión	Resultado Ambiente	Conclusión	Especificación	Resultado Refrigeración	Conclusión	Resultado Ambiente	Conclusión
Sin conservantes	4,9 - 5,5	4,9 - 5,4	CONFORME	4,4 - 4,9	NO CONFORME	40,0 - 60,0	42,2 - 49,5	CONFORME	39,3 - 46,8	NO CONFORME
Ácido Sórbico (500 ppm)		4,9 - 5,0	CONFORME	4,5 - 4,9	NO CONFORME		47,3 - 49,1	CONFORME	37,7 - 45,9	NO CONFORME
Lactosuero (6667 ppm)		5,0 - 5,2	CONFORME	4,6 - 5,0	NO CONFORME		40,5 - 46,6	CONFORME	38,3 - 45,2	NO CONFORME
Ácido Sórbico y Lactosuero (500:500 ppm)		5,0 - 5,2	CONFORME	5,0 - 5,1	CONFORME		44,9 - 48,7	CONFORME	37,7 - 49,3	NO CONFORME
Ácido sórbico y Propionato de Calcio (874:499 ppm)		4,9 - 5,3	CONFORME	4,1 - 5,0	NO CONFORME		49,5 - 50,6	CONFORME	42,8 - 44,1	CONFORME

Figura A13. Resumen de resultados fisicoquímicos obtenidos en arepas de maíz.

Arepas de Yuca										
Formulación	pH					Porcentaje de Humedad (%)				
	Especificación	Resultado Refrigeración	Conclusión	Resultado Ambiente	Conclusión	Especificación	Resultado Refrigeración	Conclusión	Resultado Ambiente	Conclusión
Sin conservantes	4,9 - 5,5	5,2 - 5,5	CONFORME	4,9 - 5,1	CONFORME	27,0 - 40,0	29,6 - 31,1	CONFORME	24,1 - 27,0	NO CONFORME
Ácido Sórbico (500 ppm)		5,4 - 5,5	CONFORME	5,2 - 5,3	CONFORME		30,4 - 31,0	CONFORME	27,4 - 30,6	CONFORME
Lactosuero (6667 ppm)		5,2 - 5,4	CONFORME	4,9 - 5,2	CONFORME		27,0 - 28,9	CONFORME	24,5 - 29,8	NO CONFORME
Ácido Sórbico y Lactosuero (500:500 ppm)		5,4 - 5,5	CONFORME	5,1 - 5,3	CONFORME		28,7 - 30,7	CONFORME	23,7 - 28,5	NO CONFORME
Ácido sórbico y Propionato de Calcio (874:499 ppm)		5,3 - 5,5	CONFORME	5,2 - 5,3	CONFORME		29,3 - 30,0	CONFORME	25,9 - 27,4	NO CONFORME

Figura A14. Resumen de resultados fisicoquímicos obtenidos en arepas de yuca.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [465]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [780]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [652]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [234]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [345]	Total puntaje posible	Escriba qué característica destaca en la muestra que más le gustó, y qué característica destaca en la muestra que menos le gustó.
Sensorial tiempo 3	5	4	3	1	2	15	Sabe un poco menos ácido que las otras por eso es mi preferida y la que menos me gustó sabe a viejo
	3	4	2	5	1	15	345 la que más me gustó sabe más a queso las demás pero en todas prima el sabor a viejo
	4	2	1	5	3	15	652 mejor porque no está tan ácida ni tan añejas. Las demás muy añejas saben
	3	1	4	2	5	15	No responde
	2	3	3	5	4	17	No responde
Total Puntaje por muestra	17	14	13	18	15		
Sensorial tiempo 2	5	3	1	4	2	15	Me gustó la 652 al tener un sabor lácteo muy acentuado. La 465 no me gustó porque se siente plana en sabor
	3	4	2	5	1	15	Me gustó la 345 porque sabe a queso madurado. La que menos me gustó fue la 234, me genero un poco de acidez en boca
	3	5	1	4	2	15	La 652 es la mejor al ser balanceada y la peor es la 780, es plana
	2	4	1	5	3	15	La mejor es la 652, sabe a fermentado pero refuerza el sabor del queso. La 234 no me gustó, le falta potencia de
	1	3	2	4	5	15	La 465 es muy balanceada por eso me gustó, no me gustó el sabor de la 345, tiene una nota láctea de queso madurado muy fuerte, desvia sabor típico de una arepa
Total Puntaje por muestra	14	19	7	22	13		
Sensorial tiempo 1	1	4	3	5	2	15	La 465 me gustó más por sabor lácteo característico, se siente cremosa. La que menos gustó fue la 234 al sentirse ácida en boca y generar residual
	3	5	2	4	1	15	Me gustó la 345, tiene las notas típicas de un queso madurado. No me gustó la 780, tiene una leve acidez
	3	5	1	4	2	15	La 762 es la mejor al generar un buen llenado en boca, con notas de queso madurado. La peor fue la 780, se siente ácida y genera residual
	2	5	1	4	3	15	La 652 es mejor al resaltar el sabor de la referencia, sabe más a queso. La 780 no me disgusta del todo pero tiene ningún impacto en boca
	1	4	3	5	2	15	465 es mejor por buen balance de sabor, tiene buena palatabilidad. 234 la peor porque no resalta el sabor típico del queso de la referencia
Total Puntaje por muestra	10	23	10	22	10		

Figura A15. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de maíz en cuanto a sabor.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [465]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [780]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [652]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [234]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [345]
Sensorial tiempo 3	3	4	5	2	1
	3	4	5	1	2
	3	1	5	4	2
	4	5	2,5	4	1
	2	3	4	5	1
Total Puntaje por muestra	15	17	19	16	7
Sensorial tiempo 2	1	5	2	4	3
	5	2	4	1	3
	5	4	2	3	1
	4	2	3	5	1
	5	2	3	4	1
Total Puntaje por muestra	20	15	14	17	9
Sensorial tiempo 1	2	3	4	1	5
	4	1	5	2	3
	5	1	3	4	2
	5	1	4	3	2
	5	3	4	1	2
Total Puntaje por muestra	21	9	20	11	14

Figura A16. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de maíz en cuanto a acidez.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [465]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [780]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [652]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [234]	Ordene de 1 a 5 en cuanto a su preferencia, siendo 1 la que más le gusta y 5 la que menos le gusta. [345]	Total puntaje posible	Escriba qué característica destaca en la muestra que más le gustó, y qué característica destaca en la muestra que menos le gustó.
Sensorial tiempo 3	5	2	1	4	3	15	642 tenía mejor sabor y la 465 tiene residual ácido
	1	2	3	5	4, 5	11	No responde
	5	3	4	1	2	15	Sabor más parecido a una arepa de yuca, las otras tiene acidez muy fuerte !
	5	3	4	2	1	15	la que más me gustó me sabe más a queso, y la que más me gusta pierde sabor y sabe a viejo, no me sabe a queso, textura menos esponjosa
	1	5	3	2	4	15	Se nota sabor lácteo y agrio de yuca en la 465 la peor es la 780, ácida salor afeño
Total Puntaje por muestra	17	15	15	14	10		
Sensorial tiempo 2	3	4	2	5	1	15	Mejor es la 345, tiene el sabor rancio o ácido del almidón agrio que refuerza el sabor a yuca; la 234 no me gusta porque tiene un acidez invasiva
	3	4	1	5	2	15	La 652 sabe mucho a yuca, similar a pandebono. La 234 sabe a la acidez típica de deterioro del alimento en el tiempo
	2	5	1	4	3	15	La que más me gusta es la 652, tiene una nota agría similar al queso ricotta. La 780 es la que menos me gusta porque el sabor es plano y se le siente una acidez residual
	5	3	1	4	2	15	Mejor es la 652, al tener un buen sabor a queso. La 465 es plana sin mucho sabor a queso
	2	4	1	5	3	15	La mejor es la 652 puesto que sabe a queso madurado. La peor es la 234 acidez típica del final de una vida útil
Total Puntaje por muestra	15	20	6	23	11		
Sensorial tiempo 1	3	5	2	4	1	15	La 345 tiene el sabor agrio que asocio con la yuca. La 780 es plana, por eso no me gusta casi
	5	4	2	3	1	15	Me gusta la 345 porque tiene sabor de queso madurado. No me gusta la 465 porque es la que menos sabor tiene
	4	3	2	5	1	15	La 345 tiene sabor potenciado a queso, la 234 es plana
	3	4	1	5	2	15	La 652 tiene sabor a queso pero no tan invasivo como la 345; la peor es la 234, no genera impacto, sólo deja residual
	3	4	2	5	1	15	La que más me gustó fue la 345 al tener un buen sabor. La que menos me gustó fue la 234, al no tener sabor de queso
Total Puntaje por muestra	18	20	9	22	6		

Figura A17. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de yuca en cuanto a sabor.

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [465]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [780]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [652]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [234]	Califique las arepas en cuanto a la acidez percibida; siendo 1 la más ácida y 5 la menos ácida. [345]
Sensorial tiempo 3	1	4	5	2	3
	1	2	3	5	4
	2	3	1	4	5
	3	1	2	4	5
	3	1	5	2	4
Total Puntaje por muestra	10	11	16	17	21

Sensorial tiempo 2	5	4	3	1	2
	5	2	4	1	3
	5	1	3	4	2
	5	4	3	2	1
	5	2	4	1	3
Total Puntaje por muestra	25	13	17	9	11

Sensorial tiempo 1	5	3	2	4	1
	5	4	2	3	1
	4	5	3	1	2
	3	4	5	2	1
	5	4	3	2	1
Total Puntaje por muestra	22	20	15	12	6

Figura A18. Resultados arrojados por el panel sensorial en arepas de yuca en cuanto a acidez.

8. Bibliografía

- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3528–3542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
- Ayed, L., M'hir, S., & Asses, N. (2023). Sustainable whey processing techniques: Innovations in derivative and beverage production. *Food Bioscience*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102642>
- Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>
- Caicedo-Perea, C., Solis-Molina, M., & Jiménez-Rosero, H. (2022). Empaques inteligentes: definiciones, tipologías y aplicaciones. *Informador Técnico*, 86(2). <https://doi.org/10.23850/22565035.3985>
- Campos, C. (1995). *Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos*. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2705_Campos.pdf
- Carrillo, L. (2003). *Penicillium*. In *Los hongos de los alimentos y forrajes* (pp. 61–69).
- Carvajal, M. (2022). Mycotoxin challenges in maize production and possible control methods in the 21st century. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 103). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103293>
- Carvajal-Moreno, M. (2022). Mycotoxin challenges in maize production and possible control methods in the 21st century. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 103). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103293>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., & Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *LWT*, 89, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.053>
- Cauvain, S. P., & Young, L. S. (2010). Chemical and physical deterioration of bakery products. In *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (pp. 381–412). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9781845699260.3.381>
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. In *International Dairy Journal* (Vol. 16, Issue 11, pp. 1229–1240). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.001>
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 49, pp. 23–28). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Chourasia, R., Phukon, L. C., Abedin, M. M., Padhi, S., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144>
- Corpas, E., & Tapasco, O. (2012). EVALUACIÓN DE CONSERVANTES PARA LIMITAR EL RECUENTO DE MOHOS EN AREPAS BAJO DOS CONDICIONES AMBIENTALES. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 249–256.
- Corpas, E., & Tapasco, O. (2013). COMPORTAMIENTO DE MOHOS EN AREPA BLANCA ASADA EN RELACIÓN AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/267211323>

- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777–788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 28). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101750>
- Dinika, I., Verma, D. K., Balia, R., Utama, G. L., & Patel, A. R. (2020). Potential of cheese whey bioactive proteins and peptides in the development of antimicrobial edible film composite: A review of recent trends. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 103, pp. 57–67). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.017>
- Dopazo, V., Illueca, F., Luz, C., Musto, L., Moreno, A., Calpe, J., & Meca, G. (2023). Evaluation of shelf life and technological properties of bread elaborated with lactic acid bacteria fermented whey as a bio-preservation ingredient. *LWT*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114427>
- Dziezak, J. D. (2015). Acids: Natural Acids and Acidulants. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 15–18). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00004-0>
- Farnaud, S., & Evans, R. W. (2003). Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties. In *Molecular Immunology* (Vol. 40, Issue 7, pp. 395–405). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00152-4)
- Fernandez, G. (2021). Diversity, Phylogenetic Profiling of Genus *Penicillium*, and Their Potential Applications. In *Fungal Biology Industrially Important Fungi for Sustainable Development. Volume 1: Biodiversity and Ecological Perspectives* (Vol. 1, pp. 335–354). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5>
- Gamba, R. R., Caro, C. A., Martínez, O. L., Moretti, A. F., Giannuzzi, L., De Antoni, G. L., & León Peláez, A. (2016). Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.038>
- García, M. V., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). The fungal problem in bread production: insights of causes, consequences, and control methods. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 29, pp. 1–6). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>
- García-García, R., & Searle, S. S. (2015). Preservatives: Food Use. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 505–509). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00568-7>
- Gómez, A. (2007). Alimentos y micotoxinas: Implicaciones en la seguridad alimentaria. *Farmacia y Espacio de Salud*, 21, 49–53.
- Gómez, C. (2021, September 23). *La apuesta de Bimbo con su nueva línea de arepas colombianas*. Portafolio. <https://www.portafolio.co/negocios/empresas/bimbo-entra-en-el-mercado-de-las-arepas-556559>
- González-Forte, L. del S., Amalvy, J. I., & Bertola, N. (2019). Corn starch-based coating enriched with natamycin as an active compound to control mold contamination on semi-hard cheese during ripening. *Heliyon*, 5(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01957>
- Gurtler, J. B., & Mai, T. L. (2014). Preservatives: Traditional Preservatives - Organic Acids. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 119–130). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00260-3>
- Han, J. W., Ruiz-García, L., Qian, J. P., & Yang, X. T. (2018). Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 17, Issue 4, pp. 860–877). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12343>

Evaluación del efecto antifúngico del lactosuero sobre *Penicillium* sp. en arepas de maíz y de yuca

- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. Á. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. In *Small Ruminant Research* (Vol. 101, Issues 1–3, pp. 196–204). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040>
- Hossaini, A., Larsen, J.-J., & Larsen, J. C. (2000). Lack of Oestrogenic Effects of Food Preservatives (Parabens) in Uterotrophic Assays. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 319–323. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00160-x](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00160-x)
- ICBF, & FAO. (2020). *Guías Alimentarias Basadas en Alimentos para la población colombiana mayor de 2 años* (2nd ed.).
- NTC 5372: Arepas de maíz refrigeradas. Especificaciones de producto., Pub. L. No. NTC 5372:2007 (2007).
- Jenssen, H., & Hancock, R. E. W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. In *Biochimie* (Vol. 91, Issue 1, pp. 19–29). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>
- Kagliwal, L. D., Jadhav, S. B., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2014). Preservatives: Permitted Preservatives - Propionic Acid. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 99–101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00270-6>
- Kapoor, R., Jash, A., & Rizvi, S. S. H. (2021). Shelf-life extension of Paneer by a sequential supercritical-CO₂-based process. *LWT*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110060>
- Liceaga-Gesualdo, A., Li-Chan, E. C. Y., & Skura, B. J. (2001). Antimicrobial effect of lactoferrin digest on spores of a *Penicillium* sp. isolated from bottled water. *Food Research International*, 34, 501–506. www.elsevier.com/locate/foodres
- Luz, C., Izzo, L., Ritieni, A., Mañes, J., & Meca, G. (2020). Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread. *LWT*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108717>
- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 93, Issue 2, pp. 437–455). <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2566>
- Magan, N., Arroyo, M., & Aldred, D. (2003). Natural antifungal agents for bakery products. In *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods* (pp. 272–280). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855737037.272>
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2018). Biopreservatives as Agents to Prevent Food Spoilage. In *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 235–270). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811515-2.00008-1>
- Marqués, M. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica.* https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/62057/TFG%20MANUEL%20MARQUE%20S%20CAMARENA_14489064360187381276109123176571.pdf?sequence=1
- Martinez, E. (2003). *Estudio de especies micotóxicas del género Penicillium: Penicillium verrucosum Dierckx.*
- Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. Bin, Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
- McDonough, C. M., Alviola, J. N., & Waniska, R. D. (2015). Preservatives: Extending Shelf Life and Shelf Stability. In *Tortillas: Wheat Flour and Corn Products* (pp. 195–200). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-891127-88-5.50009-8>
- Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, S., Jana, A., Buttar, H. S., Telessy, I. G., Awuchi, C. G., Okpala, C. O. R., Korzeniowska, M., & Guiné, R. F. P. (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents,

- bioactivities, functionalities to therapeutic applications. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 87). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104760>
- Monari, S., Ferri, M., Russo, C., Prandi, B., Tedeschi, T., Bellucci, P., Zambrini, A. V., Donati, E., & Tassoni, A. (2019). Enzymatic production of bioactive peptides from scotta, an exhausted by-product of ricotta cheese processing. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226834>
- Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Silva, M. R., Silva, V. D. M., Batista, M. A., Simões e Silva, A. C., & Silveira, J. N. (2015). Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1005-z>
- Moro, C. B., Lemos, J. G., Gasperini, A. M., Stefanello, A., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2022). Efficacy of weak acid preservatives on spoilage fungi of bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 374. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109723>
- Nielsen, P. V., & Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 60). www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro
- Novozymes. (2023). *Novozymes Food & beverages solutions*. <https://www.novozymes.com/en/products/dairy/dairy-protein/formea-tl>
- Ogbadu, L. J. (2014). Preservatives: Permitted Preservatives - Benzoic Acid. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 76–81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00265-2>
- Oshima, S., Hirano, A., Kamikado, H., Nishimura, J., Kawai, Y., & Saito, T. (2014). Nisin A extends the shelf life of high-fat chilled dairy dessert, a milk-based pudding. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1218–1228. <https://doi.org/10.1111/jam.12454>
- Oxford. (2020). *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools*.
- Ozhelvaci, F., & Steczkiewicz, K. (2023). Identification and classification of papain-like cysteine proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 299(6). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104801>
- Parra, R. (2008). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967–4982. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100021&lng=en&tlng=es.
- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2012). “Green Preservatives”: Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 66, pp. 217–238). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Perry, R. J., Borders, C. B., Cline, G. W., Zhang, X. M., Alves, T. C., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Kibbey, R. G., & Shulman, G. I. (2016). Propionate increases hepatic pyruvate cycling and anaplerosis and alters mitochondrial metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12161–12170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720631>
- Pino, S. (2020). *Calidad Microbiológica del Pan: Bacillus cereus*. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/42184/TFG-M-N2026.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pitt, J. (2002). Biology and ecology of toxigenic species. *Mycotoxins and Food Safety*, 29–41.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397–403. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>
- ProColombia. (2014). *Logística de perecederos y cadena de frío en Colombia*.

- ProColombia. (2019). *Las 'exportaciones de nostalgia' hacen su agosto en diciembre*. <https://prensa.procolombia.co/las-exportaciones-de-nostalgia-hacen-su-agosto-en-diciembre>
- Qian, M., Liu, D., Zhang, X., Yin, Z., Ismail, B. B., Ye, X., & Guo, M. (2021a). A review of active packaging in bakery products: Applications and future trends. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 114, pp. 459–471). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.009>
- Qian, M., Liu, D., Zhang, X., Yin, Z., Ismail, B. B., Ye, X., & Guo, M. (2021b). A review of active packaging in bakery products: Applications and future trends. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 114, pp. 459–471). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.009>
- Quintero, A. (2018). ¿Sobrevivirá la arepa? *ALMA MATER*, 675, 13–13.
- Restrepo Flórez, C., Álvarez, M., Álvarez, G., Salazar, C., & Efectos, J. A. (2012). Efectos del empaçado en atmósferas modificadas para la conservación de arepa de maíz. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2), 102–111. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69525875006>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 56, pp. 117–137). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rivas Alfonso, B. (2014). El Casabe y la Arepa: Alimentos Prehispánicos de la Culinaria Indígena Venezolana. *PASOS Revista de Turismo y Patrimonio Cultural*, 12(2), 433–442. <https://doi.org/10.25145/j.pasos.2014.12.031>
- Rodríguez, H., Higueta, J., & Bonilla, K. (2018). Innovación en la industria de la arepa de maíz en Colombia. In G. Hoyos (Ed.), *Algunos componentes generales, particulares y singulares del maíz en Colombia y México*. (1st ed., pp. 113–129).
- Saldarriaga, G. (1999). La inserción del maíz en el gusto de la sociedad colonial del Nuevo Reino de Granada. *Historia y Sociedad*, 6, 84–106. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/hisysoc/article/view/23108>
- Sánchez, L. (2021). *Diseño de una estrategia de producción de conidios termotolerantes para el hongo entomopatógeno Metarhizium rileyi Nm017*.
- Serna-Saldivar, S. O., & Rooney, L. W. (2015). Industrial Production of Maize Tortillas and Snacks. In *Tortillas: Wheat Flour and Corn Products* (pp. 247–281). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-891127-88-5.50013-X>
- Siebert, A., Cholewiński, G., Trzonkowski, P., & Rachon, J. (2020). Immunosuppressive properties of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112091>
- Sigma-Aldrich. (2023). *Trypsin from bovine pancreas*. https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/product/sigma/t1005?gclid=CjwKCAjwh8mlBhB_EiwAsztdBGfbtbjPt7XWdb6WK-me--Oe_iVoj0T6Q9wJuo5PcR_bPutpEh-gfRoCGnUQAvD_BwE&gclidsrc=aw.ds
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Soares, C., Calado, T., & Venâncio, A. (2013). Producción de micotoxinas por aislamientos de *Aspergillus niger* procedentes de muestras de maíz recogido en tres regiones portuguesas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.05.002>
- Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., & Archer, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025>

- Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004>
- Surekha, M., & Reddy, S. M. (2014). Preservatives: Classification and Properties. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 69–75). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00257-3>
- Tavares, T., & Malcata, F. X. (2015). Whey and Whey Powders: Fermentation of Whey. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 486–492). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00749-2>
- Thomas, L. V., & Delves-Broughton, J. (2014). Preservatives: Permitted Preservatives - Sorbic Acid. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 102–107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00268-8>
- Tibasosa, G. (2014). *Evaluación del efecto de fuentes de carbono y de nitrógeno en la conidiogénesis de Penicillium sp. HC1 en medio sólido y líquido*. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/36984>
- Tirosh, A., Calay, E. S., Tuncman, G., Claiborn, K. C., Inouye, K. E., Eguchi, K., Alcalá, M., Rathaus, M., Hollander, K. S., Ron, I., Livne, R., Heianza, Y., Qi, L., Shai, I., Garg, R., & Hotamisligil, G. S. (2019). The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 11, Issue 0120). <http://stm.sciencemag.org/>
- Tkaczewska, J. (2020). Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings - A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 106, pp. 298–311). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.022>
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (2020). *Género Penicillium*. Proyecto PAPIIME PE206620: Mohos Productores de Micotoxinas. https://masam.cuautitlan.unam.mx/mohos_toxigenos_unigras/penicillium.html
- Vilgis, T. A. (2015). Soft matter food physics - The physics of food and cooking. *Reports on Progress in Physics*, 78(12). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/12/124602>
- Wei, F., Mortimer, M., Cheng, H., Sang, N., & Guo, L. H. (2021). Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 778). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146150>
- Xu, Y. xin, Zhang, S. hui, Zhang, S. zhi, Yang, M. ying, Zhao, X., Sun, M. zhu, & Feng, X. zeng. (2022). Exposure of zebrafish embryos to sodium propionate disrupts circadian behavior and glucose metabolism-related development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113791>