

Caracterización antimicrobiana y nutricia de subproductos vegetales bioprocesados.

Morales-Soto S., Castillo S.L.*, García-Alanís K., Sánchez-García E., Bautista-Villarreal M.,
Gallardo-Rivera C., Báez-González J.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos.

*sandra.castilloh@uanl.mx

RESUMEN: En este estudio se evaluó el efecto de extractos de subproductos bioprocesados de *Musa paradisiaca* (plátano), y *Carica papaya* (papaya) sobre la velocidad de crecimiento microbiano. Las bacterias utilizadas para este estudio fueron *Salmonella typhi* ATCC 19430 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se obtuvieron harinas a partir de cáscaras de plátano, y papaya tanto naturales como bioprocesadas, mediante el método mencionado por Nassar et al (2008) a las cuales se les realizó un análisis bromatológico de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC para determinar sus diferencias en la composición nutricia. Posteriormente se prepararon extractos etanólicos a partir de las harinas obtenidas de acuerdo al método mencionado por Castillo et al (2017). Finalmente se determinó el efecto sobre la velocidad de crecimiento microbiano de acuerdo al método mencionado por Shin et al (2000). Los resultados evidenciaron una disminución significativa en la velocidad de crecimiento microbiano en las cepas tratadas con los extractos, mostrando un mayor efecto aquellos extractos preparados a partir de harinas bioprocesadas. Los resultados bromatológicos mostraron un aumento significativo en la cantidad de proteína y fibra cruda en aquellas harinas obtenidas de cáscaras bioprocesadas..

ABSTRACT: In this study, the effect of extracts of bioprocessed byproducts of *Musa paradisiaca* (banana), and *Carica papaya* (papaya) on the microbial growth rate was evaluated. The bacteria used for this study were *Salmonella typhi* ATCC 19430 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Natural and bioprocessed flours were obtained from banana peels, by the method mentioned by Nassar et al (2008). A bromatological analysis were performed according to the official methods of the AOAC to determine their differences in nutrient composition. Subsequently, ethanolic extracts were prepared from the flours obtained according to the method mentioned by Castillo et al (2017). Finally, the effect on the microbial growth rate was determined according to the method mentioned by Shin et al (2000). The results showed a significant decrease in the microbial growth rate in the strains treated with the extracts, showing a greater effect those extracts prepared from bioprocessed flours. The bromatological results showed a significant increase in the amount of protein and crude fiber in those flours obtained from bioprocessed peels..

Palabras clave:

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, bioprocesos, extractos de plantas, subproductos.

Key words: Antimicrobial activity, bioprocess, plant extracts, byproducts.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La inocuidad alimentaria es un tópico de importancia mundial debido al incremento de brotes ocasionados por patógenos de alimentos, causales de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Las ETAs siguen siendo un problema de salud pública, debido al impacto económico que éstas ocasionan. La resistencia a antibióticos así como los problemas de salud generados por algunos conservadores, se han convertido en la mayor preocupación de nuestra Era, fenómenos que a través de los años se han incrementado. La resistencia a antimicrobianos, ha presentado un aumento considerable, involucrando nuevas especies y nuevos mecanismos de resistencia (Abreu et al., 2011). Otro de los problemas asociados a la industria alimentaria son los microorganismos deteriorantes, que a pesar de no tener un impacto importante como causales de ETAs, son responsables de pérdidas millonarias al alterar los atributos sensoriales de los alimentos como el color, sabor, aroma y textura, acortando la vida de anaquel del producto. Es por ello, que durante los últimos años las investigaciones, se han dirigido hacia el desarrollo de nuevas alternativas para conservar las características del alimento, tratando de sustituir los conservadores típicos por productos naturales que posean propiedades antimicrobianas y que al mismo tiempo aporten un valor nutritivo para el consumidor (Calo et al 2015).

Por otra parte, las pérdidas y desperdicios de alimentos se han incrementado mundialmente, creando un problema de contaminación importante. La economía circular, o procesos sustentables están siendo implementados para contrarrestar este problema. La utilización de la materia de desperdicio (subproductos), como las cáscaras y semillas, representa un gran potencial, debido a los componentes nutraceuticos, antimicrobianos y funcionales que

poseen (Parniakov et al 2015). Estas materias primas, no han sido aprovechadas del todo y la mejora o aumento de sus propiedades, puede lograrse mediante bioprocesos sencillos como la fermentación (Di Cagno et al 2015). La materia prima fermentada se obtiene a partir del material vegetal, derivando en una materia biotransformada, con nuevas propiedades o con propiedades aumentadas (Bertrand et al., 2007).

Debido a la gran pérdida de alimentos en su mayoría frutas y hortalizas, existen también vías alternas de reutilización como el uso de extractos vegetales como potenciadores de actividad antifúngica o antimicrobiana. El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoriosa, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente (Sultanbawa 2017).

Por lo anterior expuesto, en esta investigación se pretende determinar el efecto de subproductos vegetales naturales y bioprocesados, sobre la velocidad de crecimiento microbiano, además de caracterizar su composición nutricia con el fin de aportar información crucial para lograr en un futuro su aprovechamiento integral, que nos permita desarrollar una producción agrícola e industrial económicamente sustentable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas microbianas y condiciones de cultivo.

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 19430. Las cepas bacterianas se activaron en caldo Müller Hinton (MH) y se ajustaron a una OD₆₀₀ 0.5 para la realización de ensayos subsecuentes en agar MH. Las condiciones de incubación fueron en atmosfera aeróbica a 37°C/24h.

Prueba de difusión en disco.

Esta prueba se realizó para determinar la actividad antimicrobiana preliminar de los extractos probados y elegir aquellos que mostraran alguna actividad. La técnica se realizó de acuerdo al método mencionado por Torres-Alvarez et al. (2016). Las cepas activadas fueron ajustadas a OD₆₀₀ 0.5 ($\approx 10^7$) 100 μ L fueron distribuidos homogéneamente en placas con agar MH. Cinco discos de 6 mm de diámetro fueron impregnados con 10 μ L de cada extracto y colocados asépticamente en la superficie del agar. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Transcurrido ese tiempo se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos, definiéndose la actividad antimicrobiana como la ausencia de crecimiento bacteriano en la zona que rodea los discos. El ensayo se realizó tres veces por duplicado. Como control negativo se utilizaron agua destilada estéril y etanol. Como control positivo se utilizó orégano 2.5x.

Obtención de harinas y extractos

El material vegetal, se compró en mercados del área metropolitana de Monterrey, N.L. Se separaron las cáscaras para su posterior utilización. Las cáscaras se secaron en un secador tipo túnel a una temperatura de 45°C con circulación de aire constante. El material deshidratado, se molió en un molino mecánico de grano. Las harinas obtenidas se guardaron en bolsas cerradas herméticamente en ausencia de luz, para su posterior utilización. Para la aplicación de bioproceso* las cáscaras se utilizaron en fase húmeda, y posterior a la aplicación del bioproceso* se secaron de la misma forma arriba mencionada y se obtuvieron harinas. El bioproceso* se llevó a cabo en condiciones controladas de temperatura y en esterilidad.

*Las condiciones del bioproceso están siendo evaluadas por lo que no podrán ser revelados los detalles del mismo.

Determinación del efecto en la velocidad de crecimiento microbiano

Este ensayo se realizó para determinar el efecto en la velocidad de crecimiento microbiano, de acuerdo con el método mencionado por Nagpal et al (2012). Se cultivó el microorganismo en tubo de 13x100 conteniendo caldo Müller Hinton (MHB). A estos cultivos se les agregaron concentraciones desde 0.1 hasta 1% (m/v) de cada extracto etanólico de subproducto vegetal. Se incubaron a 37°C en aerobiosis. Posteriormente se tomaron lecturas de absorbancia cada hora, para la medición del crecimiento en espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys

10S UV-Vis) a O.D.₅₁₀ nm. Como control se tomaron las lecturas del crecimiento bacteriano sin ningún aditivo. Se realizó una cinética de crecimiento con los datos obtenidos para establecer la tasa específica de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (tg) calculado con las siguientes fórmulas:

$$\mu = \frac{\ln D_2 - \ln D_1}{t_2 - t_1}$$

Donde D_2 y D_1 son las absorbancias obtenidas al final y al inicio de la fase logarítmica respectivamente, t_2 y t_1 son el tiempo al final e inicio de la fase logarítmica respectivamente (Shin et al 2000).

El tiempo de generación fue calculado con la siguiente fórmula.

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde Tg es el tiempo de generación, μ es la velocidad de crecimiento calculada.

Los experimentos se realizaron tres veces por triplicado.

Evaluación Nutricia.

Para evaluar algunos componentes nutricios, se realizó un análisis químico proximal. A las harinas de plátano y papaya naturales y bioprocesadas, se les determinó el contenido de humedad, cenizas, proteínas, grasa, fibra y carbohidratos de acuerdo a los métodos estandarizados internacionales aprobados por la AOAC (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto en la velocidad de crecimiento

Al realizar la prueba de difusión en disco, se evidenció una inhibición mayor en aquellos extractos obtenidos de subproductos bioprocesados (Tabla 1). La inhibición fue mayor para *S. aureus* ATCC 25923 en todos los casos, encontrándose diferencias significativas en las cáscaras de plátano y papaya bioprocesadas comparadas con las naturales, que para el caso del plátano, no mostró actividad antimicrobiana sin bioproceso. En el caso de *S. typhi* la inhibición fue menor, sin embargo se encontró diferencia significativa en la inhibición causada por las cáscaras bioprocesadas. A pesar de que los extractos de cáscara de plátano sin bioproceso, no mostraron actividad antimicrobiana en el ensayo de difusión en disco, se decidió realizar las pruebas en tubo para corroborar la nula actividad. Sin embargo, al realizar las cinéticas de crecimiento bacteriano para cada uno de los extractos añadidos con sus respectivas cepas bacterianas, se evidenció un efecto bacteriostático en el crecimiento para todos los casos, siendo el efecto mayor en aquellos cultivos a los que se les añadieron los extractos de subproductos bioprocesados (Fig 1). Para el caso de *Salmonella typhi* ATCC 19430, la velocidad específica de crecimiento disminuyó en un 28 y 52% en cultivos conteniendo extractos de plátano sin bioproceso y bioprocesados respectivamente, mientras que *S. aureus* ATCC 25923 mostró una disminución de 66% en cultivos con cáscara bioprocesada (Tabla 2). El extracto de papaya, causó una disminución en la velocidad de crecimiento del 69% para *S. aureus* y 48% para *S. typhi*, no habiendo diferencias entre aquellas bioprocesadas (Tabla 3). Debido a la disminución en la velocidad de crecimiento, los tiempos de generación fueron mayores en aquellos cultivos conteniendo extractos de subproductos bioprocesados (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Resultados de la prueba de difusión en disco. Las mediciones de los halos de inhibición se presentan en centímetros.

Extracto	Diámetro de inhibición cm	
	<i>S. typhi</i> ATCC 19430	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Cáscara de plátano bioproceso	1.1±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a

Cáscara de plátano sin bioproceso	NI ^c	NI ^c
Cáscara de papaya bioproceso	1.3±0.2 ^{ad}	1.8±0.3 ^b
Cáscara de papaya sin bioproceso	0.75±0.02 ^e	1.2±0.1 ^a

Valores ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa.

De acuerdo a varios estudios realizados (Di Cagnio et al 2013), los bioprocesos pueden ser aplicados como herramientas para aumentar la calidad, sabor o funcionalidad de un producto. Derivado de estos bioprocesos se pueden producir diversos compuestos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, compuestos antifúngicos o antimicrobianos como las bacteriocinas, las cuales han captado la atención debido a su actividad antimicrobiana y por consiguiente, la posibilidad de utilizarse como preservativos naturales en los alimentos; Sin embargo, estudios deben continuar para determinar su inocuidad y de esta manera, consumir productos seguros.

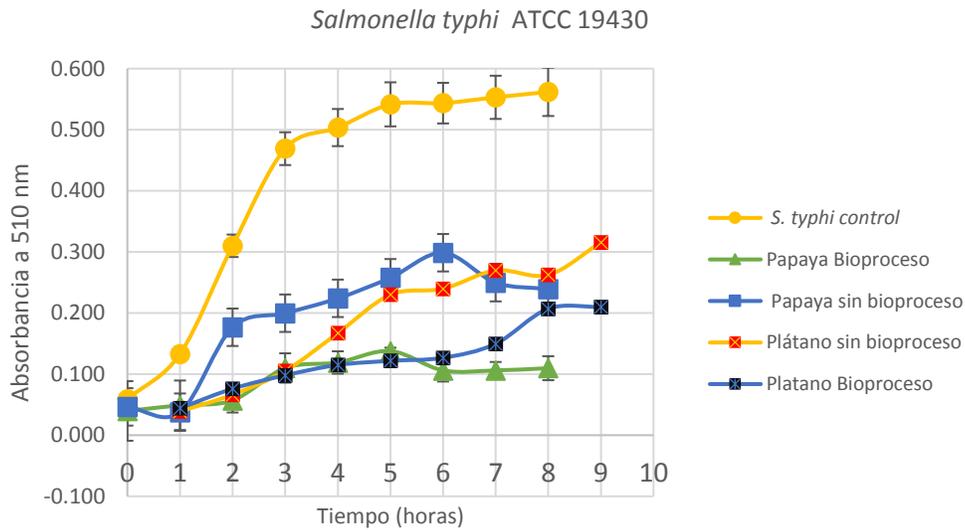


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Salmonella typhi* ATCC 19430 con diferentes extractos de subproductos vegetales. Como se puede observar los extractos causaron un decremento importante en la fase logarítmica siendo más notorio en aquellos extractos de subproductos bioprocesados.

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación (tg) de cultivos de *S. typhi* y *S. aureus* adicionados con extracto cáscara de plátano bioprocesado y natural.

Microorganismo	Cáscara de plátano					
	Bioprocesado		No Bioprocesado (natural)		Control	
	μ (logufc/mL)	tg (h)	μ (logufc/mL)	tg (h)	μ (logufc/mL)	tg (h)
<i>Salmonella typhi</i>	0.12	5.45	0.18	3.75	0.25	2.65
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.13	5.33	0.39	1.77	0.39	1.77

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación (tg) de cultivos de *S. typhi* y *S. aureus* adicionados con extracto cáscara de papaya bioprocesado y natural

Cáscara de papaya					
-------------------	--	--	--	--	--

Microorganismo	Bioprocesado		No Bioprocesado (natural)		Control	
	μ (logufc/mL)	Tg (h)	μ (logufc/mL)	Tg (h)	μ (logufc/mL)	Tg (h)
<i>Salmonella typhi</i>	0.13	6.30	0.13	5.29	0.25	2.65
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.12	5.75	0.12	5.45	0.39	1.77

Evaluación nutricia.

Las harinas obtenidas de cáscaras de plátano y papaya, tanto naturales como bioprocesadas, fueron sometidas a un análisis químico proximal en donde se les determinó humedad, ceniza, proteína, fibra cruda y carbohidratos expresados como extracto libre de nitrógeno (ELN) (Tabla 4). Los resultados muestran que hay un aumento significativo en el contenido de proteína, grasa y de fibra cruda en aquellas harinas bioprocesadas. Esto podría ser atribuido a la disminución de los carbohidratos disponibles que son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos durante la fermentación y que se ve reflejada en un decremento significativo en la cantidad de carbohidratos (ELN) en los resultados aquí presentados. Estos cambios podrían estar influenciados por las transformaciones de algunas moléculas que tienen lugar durante los bioprocesos, generándose nuevos compuestos a partir de otros (Di Cagno et al. 2013). Algunos otros estudios reportan un aumento de proteína al aplicar bioprocesos a residuos de maíz (Ugwuanyi et al 2008) o en la piña (Correia et al 2007), coincidiendo con los resultados aquí presentados (Tabla 4).

Tabla 4. Composición nutrimental de las harinas a base de subproductos vegetales.

Parámetro	Cáscara de papaya bioprocesada	Cáscara de papaya sin bioproceso	Cáscara de plátano bioprocesada	Cáscara de plátano sin bioproceso
Humedad	7.64 ± 1.20 ^a	4.72 ± 0.17 ^b	6.48 ± 0.15 ^b	7.20 ± 0.14 ^a
Ceniza	8.13 ± 0.50	8.02 ± 0.026	7.25 ± 0.10 ^b	9.69 ± 0.20 ^a
Proteína	16.90 ± 0.44 ^a	15.03 ± 0.29 ^b	7.64 ± 0.14 ^a	6.10 ± 0.14 ^b
Grasa	3.81 ± 0.18 ^a	1.70 ± 0.08 ^b	8.60 ± 0.14 ^a	6.12 ± 0.20 ^b
Fibra cruda	21.07 ± 0.73 ^a	7.47 ± 0.39 ^b	10.66 ± 1.02 ^a	8.68 ± 0.16 ^b
ELN	42.58 ± 0.69 ^b	63.04 ± 0.51 ^a	59.34 ± 0.97 ^b	62.14 ± 0.44 ^a

Resultados ± desviación estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre los valores.

CONCLUSIÓN

Las harinas bioprocesadas presentan diferencias en el contenido nutricional y propiedades antimicrobianas. Los subproductos tienen potencial para ser utilizados como aditivos en alimentos para el desarrollo de nuevos productos con el fin de aumentar la vida de anaquel de alimentos además de aportar composiciones nutricionales diferentes. Es importante realizar más estudios para definir los compuestos presentes y determinar la citotoxicidad de las harinas bioprocesadas para producir alimentos seguros.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu, O., Alpuche, C., Arathoon, E., Arbo, A. (2011). Tratamiento de las enfermedades infecciosas. Quinta edición Washington, D.C

Andrews, D., Andrews, K. (2008). Nutraceutical Moringa composition. USA. Patent No. US 2006/0222682 A1. Published In: Google Patents.

- Bertrand, B., Collaert, J., And Petiot, E. (2007). Plantas para curar plantas. 1ª ed. Navarra: La Fertilidad de la Tierra.
- Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica del Valle*; 38: 149-158.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. a., & Ricke, S. C. (2015). Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems– A Review. *Food Control*, 54, 111–119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.04
- Castillo, S., Dávila-Aviña, J., Heredia, N., & Garcia, S. (2017). Antioxidant activity and influence of Citrus byproduct extracts on adherence and invasion of *Campylobacter jejuni* and on the relative expression of cadF and ciaB. *Food Science and Biotechnology*, 26(2), 453–459. doi:10.1007/s10068-017-0062-x.
- Di Cagno, R., Filannino, P., & Gobbetti, M. (2015). Vegetable and Fruit Fermentation by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, (November 2015), 216–230. doi:10.1002/9781118868386.ch14
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina* 32: 44-48.
- Parniakov, O., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015). New approaches for the effective valorization of papaya seeds: Extraction of proteins, phenolic compounds, carbohydrates, and isothiocyanates assisted by pulsed electric energy. *Food Research International*, 77, 711–717. doi:10.1016/j.foodres.2015.03.031
- Rodríguez, A., & Morales, D., Ramírez, M. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 21: 7982
- Sultanbawa, Y. (2011). Plant antimicrobials in food applications: Minireview. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1084–1093.
- Ugwuanyi, j. o.; Harvey, I. M.; Mcneil, b. (2008). Protein enrichment of corn cob heteroxylan waste slurry by thermophilic aerobic digestion using *Bacillus stearothermophilus*. *Bioresource Technology*, Trivandrum. 99(15), 6974–6985.