

Formulation and characterization of a biopreparation with *Lactobacillus plantarum* CAM-6, from the gastrointestinal tract of Colombian native pigs

Formulación y caracterización de un biopreparado con *Lactobacillus plantarum* CAM-6, procedente del tracto digestivo de cerdos criollos colombianos

C. A. Betancur¹, Ana J. Rondón², Y. Martínez³, and R. Rodríguez⁴

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Departamento de Ciencias Pecuarias, Carrera 6 No 76-103, 230002. Montería, Colombia

²Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Autopista Varadero km 3½. Matanzas, Cuba

³Departamento de Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras

⁴Centro de Estudios de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma. Granma, Cuba
Email: ymartinez@zamorano.edu

C.A. Betancur: <https://orcid.org/0000-0001-8627-2522>

Ana J. Rondón: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Y. Martínez: <https://orcid.org/0000-0003-2167-4904>

R. Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0002-6496-4453>

The physical-chemical composition of fruit peels was characterized in order to obtain a biopreparation from a culture medium with aqueous extracts of fruit peels (banana, pineapple and papaya) for growing *Lactobacillus plantarum* CAM-6 and the evaluation of its kinetic parameters and stability over time. Then, an experiment with a completely randomized design and five treatments was developed, in which different mixtures of water with different proportions of fruit peels were evaluated as culture medium. Biomass, concentration of total reducing sugars, lactic acid and pH were determined. Later, growth kinetics was developed in the selected medium for 24 h, and specific growth rate and duplication time were determined. Finally, strain viability was evaluated under refrigeration conditions, at 4 °C, for 48 days. It was demonstrated that peels presented sufficient soluble solids (12.50-11.67 °Brix), proteins (0.33-1.31%) and ashes (0.53-1.32 %) for bacterial growth. The most suitable medium was the aqueous broth of fruit peel extract, containing 40% fruit peel and 60% water, with a growth of 22.97 LN CFU.mL⁻¹, speed of 0.42 h⁻¹ and duplication time of 1.12 h. Viability was stable for the first 24 days (> 22 LN CFU.mL⁻¹) at 4 °C. It is concluded that the biopreparation with *L. plantarum* CAM-6 in aqueous extract of papaya, pineapple and banana peels (40:60) guarantees cell growth and viability for 24 days.

Key words: *fruit peels, culture medium, growth kinetics, bioprocesses*

Papaya (*Carica papaya* L.), pineapple (*Ananas comosus* L.) and banana (*Musa paradisiaca* L.) peels are residues consisting mainly of water, carbohydrates, fiber, proteins, lipids, vitamins and minerals, which could be used as a nutrient source for bacteria, fungi and yeasts. These peels provide the necessary elements for the growth of different species of *Lactobacillus spp.*, because their metabolism is homofermentative, since it mainly uses glucose and

Con el propósito de obtener un biopreparado a partir de un medio de cultivo con extractos acuosos de cáscaras de frutas (banano, piña y papaya) para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 y la evaluación de sus parámetros cinéticos y estabilidad en el tiempo, se caracterizó la composición físico-química de las cáscaras de las frutas. Luego, se desarrolló un experimento con diseño completamente aleatorizado y cinco tratamientos, en los que se evaluaron diferentes mezclas de agua con proporciones de cáscaras de frutas como medio de cultivo. Se determinó biomasa, concentración de azúcares reductores totales, ácido láctico y pH. Después se desarrolló la cinética de crecimiento en el medio seleccionado durante 24 h y se determinó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. Finalmente, se evaluó la viabilidad de la cepa en condiciones de refrigeración, a 4°C, por 48 días. Se demostró que las cáscaras presentan suficientes sólidos solubles (12.50-11.67 °Brix), proteínas (0.33-1.31%) y cenizas (0.53-1.32%) para el crecimiento bacteriano. El medio más adecuado resultó el caldo acuoso de extracto de cáscaras de frutas, que contiene 40 % de cáscaras de frutas y 60 % de agua, con crecimiento de 22.97 LN UFC.mL⁻¹, velocidad de 0.42 h⁻¹ y tiempo de duplicación de 1.12 h. La viabilidad se mantuvo estable durante los primeros 24 días (>22 LN UFC.mL⁻¹) a 4 °C. Se concluye que el biopreparado con *L. plantarum* CAM-6 en caldo extracto acuoso de cáscaras de papaya, piña y banano (40:60) garantiza el crecimiento y viabilidad celular durante 24 días.

Palabras clave: *cáscaras de frutas, medio de cultivo, cinética de crecimiento, bioprosesos.*

Las cáscaras de frutas de papaya (*Carica papaya* L.), piña (*Ananas comosus* L.) y banano (*Musa paradisiaca* L.) son residuos constituidos mayoritariamente por agua, hidratos de carbono, fibra, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, que se pueden utilizar como fuente de nutrientes para bacterias, hongos y levaduras. Estas cáscaras proporcionan los elementos necesarios para el crecimiento de diferentes especies de *Lactobacillus spp.*, debido a que su metabolismo es homofermentativo

fructose, and converts them into lactic acid by means of the Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway (Jurado-Gómez *et al.* 2013 and Ravimannan *et al.* 2014).

The sustainable use of these agricultural residues allows to reduce pollution and consume what usually is discarded and even generate aggregate value products (Cervantes *et al.* 2016). Fruit peels are an abundant source of fermentable sugars, which could be used in the production of microbial biomass, enzymes (Rojas *et al.* 2018), biodiesel (Patel *et al.* 2015) and animal feed (Ospina *et al.* 2012, Tijani *et al.* 2012 and Saheed *et al.* 2013). Currently, most developing or economically advanced countries face the problem of disposal and treatment of these residues, which could be reused and reduce their volume, with technical, economic and environmental benefits (Ali *et al.* 2014 and Hamzah *et al.* 2018).

In Colombia, large concentrations of solid wastes (peel and bagasse) are generated, as a result of obtaining juices and preserves, mainly of papaya, pineapple and banana, which are the most accepted and highly-produced fruits in the country. These residues could be used in the preparation of products of high biological value, such as probiotics, which would contribute to eliminate a major contamination source (Gowe 2015, DNP 2016 and Anbu *et al.* 2017).

Generally, lactic acid bacteria (LAB) are cultivated in media enriched with specific nutrients such as MRS (de Mann *et al.* 1960), which are very expensive and large volumes are required at a laboratory scale. Given these requirements, it is necessary to search for other alternatives to cultivate probiotic lactobacilli in media with national components and high availability.

The objective of this study was to obtain a biopreparation from a culture medium with aqueous fruit extracts (banana, pineapple and papaya) for growing *Lactobacillus plantarum* CAM-6 and for the evaluation of its kinetic parameters and stability over time.

Materials and Methods

Physicochemical analysis of fruit peels. Three samples were randomly taken of each peel (papaya, banana and pineapple) and then crushed in a mortar. Total sugar content, °Brix, was determined using a portable refractometer (Toledo Refracto 30P, Spain). In addition, pH (pH meter, OAKLON®, Spain), humidity, protein, ash and acidity (expressed in % of malic acid and citric acid) were also analyzed, according to AOAC (1997).

Strain used. To establish the culture medium destined for the growth of *L. plantarum* CAM-6, *Lactobacillus plantarum* CAM-6 strain (GenBank accession number: MK523644) was used, which comes from the content of the rectum of Zungo pigs. This strain is deposited in the stock of the

facultativo, ya que utiliza principalmente la glucosa y la fructosa y las convierten en ácido láctico por medio de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (Jurado-Gómez *et al.* 2013 y Ravimannan *et al.* 2014).

El uso sustentable de estos residuos agrícolas permite reducir la contaminación y consumir lo que usualmente se desecha e incluso generar productos con valor agregado (Cervantes *et al.* 2016). Las cáscaras de frutas son fuente abundante de azúcares fermentables, que podrían utilizarse en la producción de biomasa microbiana, enzimas (Rojas *et al.* 2018), biodiesel (Patel *et al.* 2015) y alimentos para los animales (Ospina *et al.* 2012, Tijani *et al.* 2012 y Saheed *et al.* 2013). En la actualidad, la mayoría de los países en vías de desarrollo o económicamente avanzados enfrentan el problema de la disposición y el tratamiento de estos residuos, cuya reutilización podría reducir su volumen, con beneficios técnicos, económicos y ambientales (Ali *et al.* 2014 y Hamzah *et al.* 2018).

En Colombia se generan grandes concentraciones de desechos sólidos (cáscara y bagazo), producto de la obtención de jugos y conservas, principalmente de papaya, piña y banano, que son las frutas más aceptadas y de elevada producción en el país. Estos residuos se podrían aprovechar en la elaboración de productos de alto valor biológico, como son los probióticos, lo que contribuiría a eliminar una fuente de contaminación importante (Gowe 2015, DNP 2016 y Anbu *et al.* 2017).

Generalmente, las bacterias ácido lácticas (BAL) se cultivan en medios enriquecidos con nutrientes específicos como el MRS (de Mann *et al.* 1960), que resultan muy costosos y a escala de laboratorio se requieren en grandes volúmenes. Ante estos requerimientos, se hace necesaria la búsqueda de otras alternativas para cultivar lactobacilos probióticos en medios con componentes nacionales y de alta disponibilidad.

El objetivo de este trabajo fue obtener un biopreparado a partir de un medio de cultivo con extractos acuosos de frutas (banano, piña y papaya) para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 y para la evaluación de sus parámetros cinéticos y estabilidad en el tiempo.

Materiales y Métodos

Análisis físicoquímico de las cáscaras de frutas. Se tomaron aleatoriamente tres muestras de cada una de las cáscaras (papaya, banano y piña) que se trituraron en un mortero. Se determinó el contenido de azúcares totales, °Brix, mediante un refractómetro portátil (Toledo Refracto 30P, España). Se analizó, además, el pH (pH metro, OAKLON®, España), la humedad, proteínas, cenizas y acidez (expresada en % ácido málico y ácido cítrico), según los métodos de la AOAC (1997).

Cepa empleada. Para establecer el medio de cultivo destinado al crecimiento de *L. plantarum* CAM-6, se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* CAM-6 (número de acceso al GenBank: MK523644), que proviene del contenido del recto de cerdos zungos pelados. Esta cepa se halla depositada en el cepario del Laboratorio de

Biotechnology Laboratory of the University of Cordoba, Colombia.

Agro-industrial waste treatment. Peels of papaya, banana and pineapple, coming from the processing plant for the handcrafted preparation of fruit salad of Monteria market, Cordoba, Colombia, were transferred to facilities of the Laboratory of Fermentations and Bioprocesses of the University of Cordoba, for obtaining the aqueous extract of fruit peels (CEACF). Peels were washed and mixed in a 1:1:1 proportion. Then, they were crushed in potable water, according to the design, in an industrial blender (Fitmix, Germany). Subsequently, the aqueous extract was filtered three times. The first filtration was carried out through a sieve, the second with a gauze and the third with filter paper.

Design of the culture medium. For the culture medium design, a completely randomized experiment was carried out with five treatments and three repetitions: CEACF-1: 70% of drinking water and 30% of fruit peels, CEACF-2: 60% of drinking water and 40 % of fruit peels, CEACF-3: 50 % of drinking water and 50 % of fruit peels, CEACF-4: 40 % of water and 60 % of fruit peels and CEACF-5: 30 % of water and 70 % of fruit peels. For each treatment, 100 mL of the extract obtained were added in Erlenmeyers of 250 mL capacity, which were adjusted to pH 5.6 ± 0.2 (HANNA pHmeter, USA), with calcium citrate or citric acid, at a concentration of 99 and 96 % purity, respectively. Then, they were sterilized at 121 °C for 15 min. in an autoclave (Systec VB-55, Germany).

Lactobacillus plantarum CAM-6 strain, cultivated in MRS broth for 18 h, at 37 °C (10^{10} CFU.mL⁻¹), was inoculated at 10 % (v/v) in each Erlenmeyer. Subsequently, a cap was placed and a venoclysis was adapted as a sample extraction system. Fermentation was carried out at room temperature (30 ± 2 °C), with constant agitation at 100 rpm. on an orbital shaker (SK-o330-Pro LB PRO, USA) for 24 h.

Evaluated indicators. In the 24 h samples, *L. plantarum* CAM-6 growth was quantified by dry weight (Harrigan and McCance 1968) and the concentration of total reducing sugars (TRS) was also determined according to Miller (1959) technique, as well as lactic acid (AOAC 1997). The pH was calculated with a digital potentiometer (Metrohm 744, Switzerland).

Evaluated indicators and design. Growth kinetics of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 was evaluated in an experiment with a completely randomized design. For this, the strain was inoculated in MRS broth and incubated at 30 °C for 18 h. This inoculum was cultivated at 10 % (v/v) in 27 Erlenmeyers containing the previously selected medium (CEACF-4). The Erlenmeyers were kept in incubation at 30 °C for 24 h. Every three hours, three repetitions were taken to determine viable count by the method of serial dilutions in peptone water (1 %, w/v). For colony

Biotechnología de la Universidad de Córdoba, Colombia.

Tratamiento de los residuos agroindustriales. Las cáscaras de papaya, banana y piña, procedentes de la planta procesadora para la elaboración artesanal de ensalada de frutas del mercado de Montería, Córdoba, Colombia, se trasladaron a las instalaciones del Laboratorio de Fermentaciones y Bioprocessos de la Universidad de Córdoba, para la obtención del caldo extracto acuoso de cáscaras de frutas (CEACF). Las cáscaras se lavaron y mezclaron en una proporción 1:1:1. Luego, se trituraron en agua potable según el diseño en una licuadora industrial (Fitmix, Alemania). Posteriormente, el extracto acuoso se filtró tres veces. La primera filtración se realizó mediante un colador, la segunda con gasa y la tercera con papel de filtro.

Diseño del medio de cultivo. Para el diseño del medio de cultivo, se realizó un experimento completamente aleatorizado con la disposición de cinco tratamientos y tres repeticiones: CEACF-1: 70 % de agua potable y 30 % de cáscaras de frutas, CEACF-2: 60 % de agua potable y 40 % de cáscaras de frutas, CEACF-3: 50 % de agua potable y 50 % de cáscaras de frutas, CEACF-4: 40 % de agua y 60 % de cáscaras de frutas y CEACF-5: 30 % de agua y 70 % de cáscaras de frutas. Por cada tratamiento se adicionaron 100 mL del extracto obtenido en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad, los que se ajustaron a pH 5.6 ± 0.2 (pHmetro HANNA, EE.UU.), con citrato de calcio o ácido cítrico, a concentración de 99 y 96 % de pureza, respectivamente. Luego, se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. en una autoclave (Systec VB-55, Alemania).

La cepa *Lactobacillus plantarum* CAM-6, cultivada en caldo MRS durante 18 h, a 37 °C (10^{10} UFC.mL⁻¹), se inoculó al 10 % (v/v) en cada uno de los Erlenmeyers. Posteriormente, se colocó un tapón y se adaptó una venoclysis como sistema para la extracción de muestras. La fermentación se realizó a temperatura ambiente (30 ± 2 °C), con agitación constante a 100 r.p.m. en un agitador orbital (SK-o330-Pro LB PRO, EE.UU.) durante 24 h.

Indicadores evaluados. En las muestras de 24 h se cuantificó el crecimiento de *L. plantarum* CAM-6 mediante el peso seco (Harrigan y McCance 1968) y se determinó, además, la concentración de azúcares reductores totales (ART) de acuerdo con la técnica de Miller (1959) y el ácido láctico (AOAC 1997). El pH se calculó con un potenciómetro digital (Metrohm 744, Suiza).

Diseño e indicadores evaluados. La cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 se evaluó en un experimento con diseño completamente aleatorizado. Para ello se inoculó la cepa en caldo MRS y se incubó a 30 °C durante 18 h. Este inóculo se sembró al 10 % (v/v) en 27 Erlenmeyers que contenían el medio seleccionado anteriormente (CEACF-4). Los Erlenmeyers se mantuvieron en incubación durante 24 h a 30 °C. Cada tres horas se tomaron tres repeticiones para determinar el conteo de viables mediante el método de las diluciones seriadas en agua de peptona (1%, p/v). Para el conteo de las colonias (Harrigan y McCance 1968), se procedió a

counting (Harrigan and McCance 1968), cultivation was performed in dishes with MRS agar for 48 h, at 30 °C. The MRS broth was used as reference medium, where the strain was cultivated under the same conditions. Dispersion curves were prepared with the use of Microsoft Excel program and data obtained from growth kinetics. By applying the fitting method, the corresponding polynomials and specific growth rate values (μ) were obtained. Duplication time (td) was determined by the formula $td = \frac{\ln 2}{\mu}$ (Madigan *et al.* 1997).

Reducing sugars were quantified by the dinitrosalicylic (DNS) method, according to Miller (1959). Acidity, expressed in lactic acid, was calculated using titratable acidity, according to AOAC (1997). The pH in each sampling was measured with a digital pH meter (Sartorius Meter PP-25, Göttingen, Germany).

Experimental design and viable cell count. For the development of this test, the inoculum was obtained from the cultivation of CAM-6 strain in MRS broth for 18 h, at 37 °C, under static conditions. It was cultivated at 10 % (v/v) in three Erlenmeyers of 5 L capacity, with four liters of the selected medium and pH 5. Erlenmeyers were kept at 37 °C for 24 h. Subsequently, a test was carried out with the use of a completely randomized design, by distributing the content of each Erlenmeyer into 35 sterile glass flasks, with 50 mL of effective volume and rubber cap. Samples were kept in refrigeration (4 °C) for 48 d. In each sampling (every eight days), five flasks were taken, from which 1 mL was extracted. They were cultivated (10^{-7} - 10^{-9}) in dishes with MRS agar by means of serial dilutions in peptone water (1 %, w/v). After incubation at 37 °C for 48 h, CFU count was performed.

Statistical processing. In the physical-chemical analysis of fruit peels, data was processed using descriptive statistics (standard deviation and coefficient of variation). For determining the best variant of CEACF and viability studies of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 over time, one-way analysis of variance (ANOVA) were performed, with prior determination of normality, data homogeneity and a significance level of $P < 0.05$. Duncan (1955) test was used for multiple comparison among means, using SPSS statistical package, version 21.0 (Pardo and Ruíz 2002). Results of growth kinetics were processed using Microsoft Excel 2016 program, with which the Monod (1949) model was run. Viable microorganism counts were transformed to LN to ensure normal conditions.

Results and Discussion

Table 1 shows the results of chemical composition of papaya, banana and pineapple peels. These values are similar to those reported in the literature. FAO (2007) stated that papaya has approximately 13 % sugars, 85 % humidity and 0.6 % protein. They pointed out

la siembra en placas con agar MRS durante 48 h, a 30 °C. Como medio de referencia se utilizó el caldo MRS, donde se cultivó la cepa en las mismas condiciones. A partir del programa Microsoft Excel y los datos obtenidos de la cinética de crecimiento, se confeccionaron las curvas de dispersión. Mediante la aplicación del método de ajuste se obtuvieron los polinomios correspondientes y los valores de la velocidad específica de crecimiento (μ). El tiempo de duplicación (td) se determinó mediante la fórmula $td = \frac{\ln 2}{\mu}$ (Madigan *et al.* 1997).

Los azúcares reductores se cuantificaron por el método de dinitrosalisílico (DNS), según Miller (1959). La acidez, expresada en ácido láctico, se calculó mediante la acidez titulable, según AOAC (1997). El pH en cada muestreo se midió con pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25, Göttingen, Alemania).

Diseño del experimento y conteo de células viables. Para el desarrollo de este ensayo se obtuvo el inóculo a partir del cultivo de la cepa CAM-6 en caldo MRS durante 18 h, a 37 °C, en condiciones estáticas. Se sembró al 10 % (v/v) en tres Erlenmeyers de 5 L de capacidad, con cuatro litros del medio seleccionado y pH 5. Los Erlenmeyer se mantuvieron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizó un ensayo en el que se aplicó un diseño completamente aleatorizado, al distribuir el contenido de cada Erlenmeyer en 35 frascos de cristal estériles, de 50 mL de volumen efectivo y tapa de goma. Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta los 48 d. En cada muestreo (cada ocho días) se tomaron cinco frascos, de los cuales se extrajo 1 mL. Mediante diluciones seriadas en agua de peptona (1 %, p/v) se sembraron (10^{-7} - 10^{-9}) en placas con agar MRS. Después de la incubación a 37 °C durante 48 h se realizó el conteo de las UFC.

Procesamiento estadístico. En el análisis físico-químico de las cáscaras de frutas, los datos se procesaron mediante estadística descriptiva (desviación estándar y coeficiente de variación). Para la determinación de la mejor variante de CEACF y los estudios de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 en el tiempo, se realizaron análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), con previa determinación de la normalidad, homogeneidad de los datos y con un nivel de significación de $P < 0.05$. La prueba de Duncan (1955) se usó para la comparación múltiple entre las medias mediante el paquete estadístico SPSS, versión 21.0 (Pardo y Ruíz 2002). Los resultados de la cinética de crecimiento se procesaron mediante el programa Excel 2016, con el cual se ejecutó el modelo de Monod (1949). Los conteos de microorganismos viables se transformaron a LN para garantizar las condiciones de normalidad.

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestran los resultados de la composición química de las cáscaras de papaya, banano y piña. Estos valores se corresponden con lo informado en la literatura. La FAO (2007) refiere que la papaya posee, aproximadamente, 13 % de azúcares, 85 % de humedad y 0,6 % de proteínas. Señala que la piña

that pineapple contains from 12 to 15 % sugars, 80 to 85 % water and 0.58 % protein, and banana has 79.2 % humidity, 0.83 % protein and 12 % sugars.

contiene de 12 a 15 % de azúcares, de 80 a 85 % de agua y 0.58 % de proteína. Para el banano informa 79.2 % de humedad, 0.83 % de proteínas y 12 % de azúcares.

Table 1. Chemical composition of papaya, banana and pineapple peel, from the fruit processing plant of Montería market, Cordoba, Colombia (n=3)

Indicators	Papaya peel	SD	CV, %	Banana peel	SD	CV, %	Pineapple peel	SD	CV, %
Soluble solids, °Brix	11.67	0.251	2.14	11.67	0.208	1.78	12.50	0.264	2.11
pH	6.42	0.059	0.91	5.85	0.005	0.08	4.91	0.551	11.22
Acidity*, %	0.18	0.018	10.00	0.31	0.038	12.25	0.47	0.036	7.65
Humidity, %	87.59	0.722	0.82	88.06	0.114	0.13	82.24	1.18	1.43
Crude protein, %	1.31	0.007	0.53	0.33	0.009	2.72	1.14	0.086	7.54
Ashes, %	0.55	0.039	7.09	1.23	0.068	5.52	0.89	0.075	8.42

*Acidity is expressed according to the abundant acid: malic acid in papaya and banana and citric acid in pineapple. Data of chemical composition is expressed under humid basis.

SD: standard deviation

CV: coefficient of variation

Regarding soluble solids, expressed in degrees Brix, values between 11.6 and 12.5 are referred in fruit peels, levels that are considered admitted as established as the minimum acceptable for commercial growers (Zhou *et al.* 2000). Low pH is due to the contribution of acids, depending on the type of fruit. The high humidity is given by the high water content of these residues (Hamzah *et al.* 2018).

Even though protein level of different tested fruit peels is low, the content is sufficient for bacteria growth. Proteins are part of the structure of microbial cells and are necessary for the growth of microorganisms (Prescott *et al.* 2004). As it is known, fermentation industry uses inorganic nitrogen sources, which tend to be expensive in culture media, and make them a limitation for preparing organic products obtained by fermentation (Serna and Torres 2015).

Ash value, obtained in banana peels (1.23 %), demonstrates its high mineral content (Ca, K and Mg). Mineral composition of residues will contribute to the development of some metabolic reactions of bacteria in the formulated culture medium (Anbu *et al.* 2017 and Saleem and Saeed 2019).

Studies carried out by De Oliveira *et al.* (2015) and Vargas *et al.* (2019) confirm that fruit peels have a higher concentration of mineral elements, total sugars and crude protein than pulp, which indicates that these residues have great potential for their use as raw material for animal feed production. These authors refer that, due to ash content of peels, they are considered as potential mineral sources. Ash composition varies according to the fruit, maturity state, variety and harvest season, as well as cultivation conditions (Priego 2007).

The use of agro-industrial residues as low-cost raw material represents an option to transform waste into compounds with beneficial properties (Carota *et al.* 2016, Yoong *et al.* 2017 and Vargas *et al.* 2019). It was confirmed that fruit peels contain carbohydrates,

Con respecto a los sólidos solubles, expresados en grados Brix, se refieren valores entre 11.6 y 12.5 en las cáscaras de frutas, niveles que se consideran admitidos según lo establecido como el mínimo aceptable para los cultivadores comerciales (Zhou *et al.* 2000). El pH bajo se debe al aporte de ácidos, según el tipo de fruta. La alta humedad está dada por el elevado contenido de agua de estos residuos (Hamzah *et al.* 2018).

Aun cuando el nivel de proteína que presentan las diferentes cáscaras de frutas ensayadas es bajo, el contenido es suficiente para el crecimiento de las bacterias. Las proteínas forman parte de la estructura de las células microbianas y son necesarias para el crecimiento de los microorganismos (Prescott *et al.* 2004). Como se sabe, en la industria de las fermentaciones se utilizan fuentes inorgánicas de nitrógeno, las cuales tienden a ser costosas en los medios de cultivo, lo que las convierte en una limitante para la elaboración de productos orgánicos obtenidos por fermentación (Serna y Torres 2015).

El valor de las cenizas, obtenido en las cáscaras de banano (1.23 %) demuestra su alto contenido de minerales (Ca, K y Mg). La composición mineral de los residuos contribuirá al desarrollo de algunas reacciones metabólicas de las bacterias en el medio de cultivo formulado (Anbu *et al.* 2017 y Saleem y Saeed 2019).

Estudios realizados por De Oliveira *et al.* (2015) y Vargas *et al.* (2019) confirman que las cáscaras de los frutos tienen mayor concentración de elementos minerales, azúcares totales y proteína bruta que la pulpa, lo que indica que esos residuos poseen gran potencial de uso como materia prima para la elaboración de alimentos para animales. Estos autores refieren que, por el contenido de cenizas en las cáscaras, se consideran fuentes potenciales de minerales. La composición de cenizas varía de acuerdo con el fruto, estado de madurez, variedad y temporada de cosecha, así como por las condiciones de cultivo (Priego 2007).

La utilización de residuos agroindustriales como materia prima de bajo costo representa una opción para

proteins, vitamins, and minerals, which could meet the nutritional needs of *Lactobacillus plantarum* CAM-6.

Table 2 shows the results of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 growth in each of the evaluated treatments to obtain the CEACF culture medium. It was verified that the highest ($P < 0.05$) biomass, lactic acid and TRS production was presented in CEACF-4 and CEACF-5 media. It was also demonstrated that the lowest pH values were found in the last two variants. These results demonstrate that *Lactobacillus plantarum* CAM-6 is capable of producing acids that lower pH in these media. Probiotic bacteria, especially lactobacilli, transform carbon sources into organic acids that intervene in the inhibition of pathogenic microorganisms and in mineral solubilization, in addition to contribute to the maintenance of the intestinal mucosa integrity (Vera *et al.* 2018).

transformar los desechos en compuestos con propiedades benéficas (Carota *et al.* 2016, Yoong *et al.* 2017 y Vargas *et al.* 2019). Se comprobó que las cáscaras de frutas contienen carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, que podrían satisfacer las necesidades nutricionales de *Lactobacillus plantarum* CAM-6.

La tabla 2 muestra los resultados del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 en cada uno de los tratamientos evaluados para la obtención del medio de cultivo CEACF. Se comprobó que la mayor ($P < 0.05$) producción de biomasa, ácido láctico y ART se presentó en los medios CEACF-4 y CEACF-5. También se pudo ver que los menores valores de pH se encontraron en las dos últimas variantes. Estos resultados demuestran que *Lactobacillus plantarum* CAM-6 es capaz de producir ácidos que disminuyen el pH en estos medios. Las bacterias probióticas, especialmente los lactobacilos, transforman las fuentes de carbono en ácidos orgánicos

Table 2. Characteristics of growing *L. plantarum* CAM-6 in different variants of CEACF of papaya, banana and pineapple at 30 °C for 24 h

Indicators	CEACF-1	CEACF-2	CEACF-3	CEACF-4	CEACF-5	SE±	P
Biomass, g	25.49 ^b	34.37 ^b	44.16 ^{ab}	55.18 ^a	60.46 ^a	2.977	0.003
pH	5.83 ^a	5.57 ^a	5.28 ^a	4.72 ^b	4.68 ^b	0.066	0.014
Lactic acid, g.L ⁻¹	3.49 ^b	5.41 ^b	5.57 ^b	7.01 ^a	7.11 ^a	0.262	0.001
TRS, g.L ⁻¹	21.12 ^c	33.27 ^b	44.04 ^a	48.00 ^a	47.00 ^a	0.803	0.001

^{a,b,c} Means with different letters in the same line differ at $P < 0.05$ (Duncan 1955)

TRS: total reducing sugars

Fruit peels constitute a potential raw material for the production of biopreparations, as vehicles for the administration of probiotics, due to their high carbohydrate content (Vargas *et al.* 2019). TRS concentration was higher in CEACF-3, CEACF-4 and CEACF-5 variants, indicating that after 24 h of fermentation, these media still contain available carbon sources for these bacteria. Specifically, CEACF-4 and CEACF-5 variants presented high biomass production, lactic acid and lower pH values, which could contribute to their conservation over time. On the other hand, with the application of the complete additive (cells + acid), acids will contribute to exerting greater action in animals. CEACF-4 was chosen, since this medium has a lower percentage of fruit peels in its composition, which represents savings in raw material.

Figure 1A shows the results of growth kinetics of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 in CEACF-4 and MRS media for 24 h. It is demonstrated that there are no differences in the count of CFUs during the sampling hours, when both substrates are used ($P > 0.05$). In each case, the initial population began its growth from the first hours, and once in the exponential phase, cells reproduce at maximum speed without limitation of nutritional substances. Figure 1B shows that the higher the lactic acid production, the lower

que intervienen en la inhibición de microorganismos patógenos y en la solubilización de minerales, además de contribuir al mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal (Vera *et al.* 2018).

Las cáscaras de frutas constituyen un potencial de materia prima para la producción de biopreparados como vehículos para la administración de probióticos, debido a su alto contenido de carbohidratos (Vargas *et al.* 2019). La concentración de ART fue mayor en las variantes CEACF-3, CEACF-4 y CEACF-5, lo que indica que después de 24 h de fermentación, estos medios todavía contienen fuentes de carbono utilizables por estas bacterias. Específicamente, las variantes CEACF-4 y CEACF-5 presentaron alta producción de biomasa, ácido láctico y valores de pH menores, lo que podría contribuir a su conservación en el tiempo. Por otra parte, si se aplica el aditivo completo (células + ácido), estos últimos (ácidos) contribuirán a ejercer mayor acción en los animales. Se optó por el CEACF-4, ya que este medio posee en su composición menor porcentaje de cáscaras de frutas, lo que representa ahorro de materia prima.

En la figura 1A se muestran los resultados de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 en los medios CEACF-4 y MRS durante 24 h. Se muestra que no existen diferencias en el conteo de las UFC en las horas de muestreo, cuando se emplean ambos sustratos ($P > 0.05$). En cada caso, la población inicial comenzó

the TRS concentration and pH in CEACF-4 medium. LABs are known to use fermentable carbohydrates as an energy source mainly to form lactic acid (Zamudio and Zavaleta 2003).

su crecimiento desde las primeras horas, y una vez en la fase exponencial, las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a velocidad máxima. En la figura 1B se muestra que a mayor producción de ácido láctico

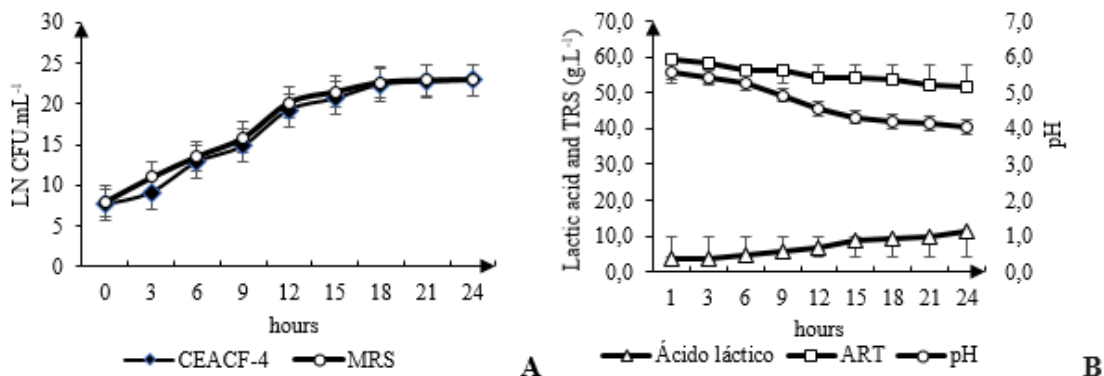


Figure 1A. Performance of growth kinetics of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 in CEACF-4 and MRS culture media
Figure 1B. Production of lactic acid, TRS concentration and pH for 24 h. Bars represent standard deviation

CEACF-4 medium was suitable for the growth of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 (table 3). Comparing growth of the strain in this medium with respect to MRS, no differences were observed.

disminuyó la concentración de ART y el pH en el medio CEACF-4. Se conoce que las BAL utilizan carbohidratos fermentables como fuente de energía para formar ácido láctico principalmente (Zamudio y Zavaleta 2003).

Table 3. Growth of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 in MRS and CEACF-4 media at 30 °C

Strain	Medium	LN CFU.mL ⁻¹ 24 h	SE ±	P	μ (h ⁻¹)	td, h	R ²
<i>Lactobacillus plantarum</i> CAM-6	MRS	21.97 (3.5X10 ⁹)	0.572	0.281	0.46 ± 0.83	1.05 ± 0.83	0.9977
	CEACF-4	22.97 (9.5X10 ⁹)			0.42 ± 0.86	1.12 ± 0.86	0.9981

¹Growth of bacterial strains are expressed in LN
() original data
μ: specific growth rate
td: duplication time
R²: coefficient of determination

Results indicate that CEACF-4 components meet the nutritional requirements of these microorganisms in a similar way to the reference medium, so it could be used as a culture medium for probiotic production. For CEACF-4 medium, a specific growth rate of 0.42 ± 0.86 h⁻¹ and a duplication time of 1.12 ± 0.86 h were obtained, with R² = 0.9981 data fit. These values are very close to the values obtained by Aguirre *et al.* (2010).

Garriga *et al.* (1998) report that, for evaluating potentialities of candidate strains for probiotics, it must be verified that they have a high growth rate and a duplication time equal to or approximately one hour. This way, used microorganisms will have greater possibilities of being duplicated quickly in the gastrointestinal tract, to achieve their predominance in this ecosystem. This was demonstrated in this study, in which it was demonstrated that *Lactobacillus plantarum* CAM-6 strain has these characteristics.

El medio CEACF-4 resultó adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 (tabla 3). Al comparar el crecimiento de la cepa en este medio con respecto al MRS, no se observaron diferencias.

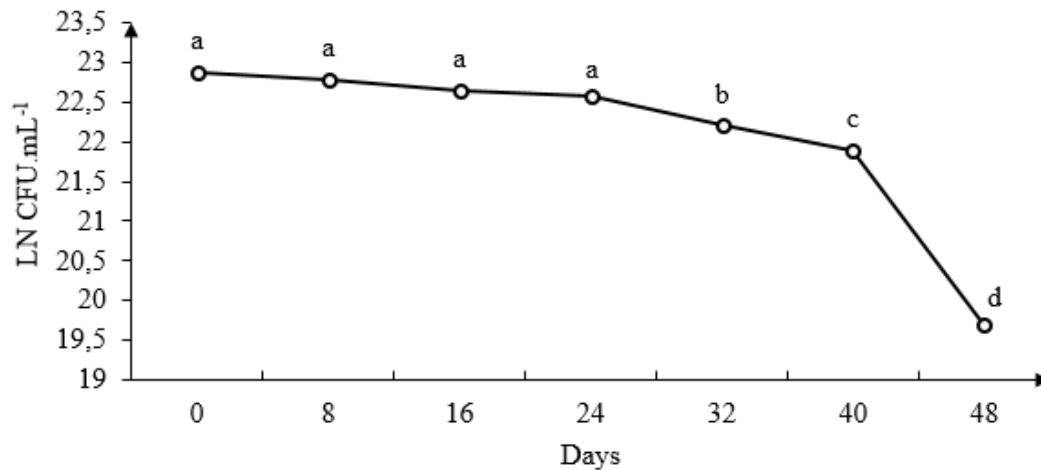
Los resultados indican que los componentes del CEACF-4 suplen los requerimientos nutricionales de estos microorganismos de forma similar al medio de referencia, por lo que podría ser utilizado como medio de cultivo para la elaboración de probióticos. Para el medio CEACF-4, se obtuvo una tasa específica de crecimiento de 0.42 ± 0.86 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 1.12 ± 0.86 h, con ajuste de los datos R² = 0.9981. Estos valores se hallan muy cercanos a los valores obtenidos por Aguirre *et al.* (2010).

Garriga *et al.* (1998) refieren que cuando se evalúan las potencialidades de las cepas candidatas a probióticas se debe comprobar que presenten alta velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación igual o aproximado a una hora. De esta manera, los microorganismos que se utilicen tendrán mayores posibilidades de ser duplicados

Figure 2 represents performance dynamics of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 viability, grown in CEACF-4, from the first day to 48 d of sampling. Until 24 d, the biopreparation showed count stability under refrigeration conditions (>21 LN CFU.mL⁻¹). It is precisely after that time that the decrease in viable cells in the biopreparation is evident, although cell population that contains at 48 d (19 LN CFU.mL⁻¹) is sufficient to develop probiotic activity ($>10^8$ CFU.mL⁻¹). Jin *et al.* (1998) defined that probiotic biopreparations should contain 10^9 CFU.mL⁻¹ to exert their effect.

rápida en el tracto gastrointestinal para lograr su predominio en este ecosistema. Esto se demostró en este trabajo, donde se pudo comprobar que la cepa *Lactobacillus plantarum* CAM-6 presenta dichas características.

En la figura 2 se representa la dinámica del comportamiento de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 cultivada en el CEACF-4, desde el día primero hasta los 48 d de muestreo. Hasta los 24 d, el biopreparado mostró estabilidad en el conteo en condiciones de refrigeración (>21 LN UFC.mL⁻¹). Es precisamente después de ese tiempo, cuando se evidencia la disminución de las células viables en el biopreparado,



a,b,c,d Different letters differ at $P < 0.05$ (Duncan 1955)
($P < 0.001$)
SE ± 0.094

Figure 2. Dynamics of *Lactobacillus plantarum* CAM-6 viability in the biopreparation, under refrigeration conditions, at 4 °C

It is concluded that the bioprepared with *L. plantarum* CAM-6 in aqueous extract broth of papaya, pineapple and banana peels (40:60) has the necessary nutrients to guarantee a high population of cells, with a higher growth rate and duplication time. Furthermore, cell viability was observed for 24 d, under refrigeration conditions, at 4 °C.

Acknowledgements

The authors would like to thank specialists from the Laboratorio de Ingeniería de Alimentos of the Universidad de Córdoba.

aunque la población de células que contiene a los 48 d (19 LN UFC.mL⁻¹) es suficiente para desarrollar actividad probiótica ($> 10^8$ UFC.mL⁻¹). Jin *et al.* (1998) definieron que los biopreparados probióticos ejercerán su efecto, si contienen 10^9 UFC.mL⁻¹.

Se concluye que el biopreparado con *L. plantarum* CAM-6 en caldo extracto acuoso de cáscaras de papaya, piña y banano (40:60) posee los nutrientes necesarios que garantizan una alta población de células, con mayor velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación. Además, se observó viabilidad celular durante 24 d, en condiciones de refrigeración, a 4 °C.

Agradecimientos

Se agradece a los especialistas del Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Córdoba.

References

- Aguirre, E.J., Aguilar, J.M., Ramírez, A. & Alvarez, M.M. 2010. "Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed batch cultures". *Bioresource Technology*, 101(8): 2837-2844, ISSN: 0960-8524, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.047>.
- Ali, S.M., Pervaiz, A., Afzal, B., Hamid, N. & Yasmin, A. 2014. "Open dumping of municipal solid waste and its hazardous impacts on soil and vegetation diversity at waste dumping sites of Islamabad city". *Journal of King Saud University-Science*, 26(1): 59-65, ISSN: 1018-3647, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.08.003>.
- Anbu, S., Padma, J., Punithavalli, K. & Saranraj, P. 2017. "Fruits peel waste as a novel media for the growth of economically

- important fungi". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6): 426-428, ISSN: 2278-4136.
- AOAC (Official Method of Analysis: Association of Official Analytical Chemists). 1997. 16th Ed. Ed. AOAC International. Arlington, Virginia, USA, ISBN: 0935584544.
- Carota, E., Stazi, S.R., Gallo, A.M. & D'Annibale, A. 2016. "Aqueous extract from orange peel waste as a valuable growth substrate for microbial oil production". *New Biotechnology*, 33: S143-S144, ISSN: 1871-6784, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1218>.
- Cervantes, K., Cruz, A. & Campos, M. 2016. "Subproductos obtenidos a partir de distintas cáscaras de fruta". *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 3(5): 1-12, ISSN: 2007-8412.
- De Mann, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. 1960. "A medium for the cultivation of lactobacilli". *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1): 130-135, ISSN: 1365-2672, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.
- De Oliveira, S., Araújo, A.R., de Sousa, A.N., Alencar, T., Simone, G., Rodrigues, S., Correia, M., Narciso, F.A. & de Vasconcelos, M.G. 2015. "Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements". *Journal of Chemistry*, 2015: 264-284, ISSN: 2090-9071, DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/264284>.
- Departamento Nacional de Planificación (DNP). 2016. Pérdida y desperdicio de alimentos en Colombia. Estudio de la Dirección de Seguimiento y Evaluación de Políticas Públicas. Available: <<https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Prensa/Publicaciones/P%C3%A9rdida%20y%20desperdicio%20de%20alimentos%20en%20colombia.pdf>> [Consulted: November 12th, 2019].
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- FAO. 2007. Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (papaya, piña, plátano, cítricos). Available: <<http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm>> [Consulted: November 23th, 2019].
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. & Hugas, M. 1998. "Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts". *Journal of Applied Microbiology*, 84(1): 125-132, ISSN: 1365-2672, DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00329.x>.
- Gowe, Ch. 2015. "Review on potential use of fruit and vegetables by-products as a valuable source of natural food additives". *Food Science and Quality Management*, 45: 47-61, ISSN 2225-0557.
- Hamzah, N., Wan-Ishak, W.R. & Rahman, N.A. 2018. "Nutritional and pharmacological properties of agro-industrial by-products from commonly consumed fruits". *Journal of Food Science & Technology*, 3(4): 396-416, ISSN: 2472-6419.
- Harrigan, W.F. & McCance, M.E. 1968. *Métodos de laboratorio de Microbiología*. Editorial Academia. León, España, ISBN: 012326040X.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A. & Jalaludin, S. 1998. "Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures". *Poultry Science*, 77(9): 1259-1265, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/77.9.1259>.
- Jurado-Gómez, H., Ramírez, C. & Aguirre, D. 2013. "Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico". *Veterinaria y Zootecnia*, 7(2): 37-53, ISSN 2011-5415.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. 8th Ed. Ed. Prentice Hall International, Inc. New York, USA, ISBN: 9780135208755.
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428, ISSN: 1520-6882, DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Monod, J. 1949. "The growth of bacterial cultures". *Annual Review of Microbiology*, 3 : 371-394, ISSN: 1545-3251, DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- Ospina, S.M., Hernández-Rodríguez E.N. & Lozano-Moreno, C.A. 2012. Estudio experimental del proceso de fermentación de residuos agroindustriales del mango (*Manguifera indica* L) usando *Saccharomyces cerevisiae*. Diploma Thesis. Universidad Católica de Manizales, Caldas, Colombia.
- Pardo, A. & Ruiz, M.A. 2002. SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, ISBN: 84-481-3750-7.
- Patel, A., Sindhu, D.K., Arora, N., Singh, R.P., Pruthi, V. & Pruthi, P.A. 2015. "Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of Cassia fistula L. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1". *Bioresource Technology*, 197: 91-98, ISSN: 0960-8524, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.039>.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2004. *Microbiology*. 5th Ed. Ed. McGraw-Hill Publishers. London, UK, p. 105-106, ISBN: 0-07-282905-2.
- Priego, N. 2007. Obtención de fibra dietética a partir de sáculos de naranja aplicando un tratamiento con vapor. Diploma Thesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México. Available: <http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10354.pdf>, [Consulted: November 21th, 2019].
- Ravimannan, N., Arulanantham, R., Pathmanathan, S. & Niranjana, K. 2014. "Alternative culture media for fungal growth using different formulation of protein sources". *Annals of Biological Research*, 5(1): 36-39, ISSN: 0976-1233.
- Rojas, L.F., Flórez, C., Zapata, P. & Jiménez, C. 2018. "Extraction and identification of endopeptidases in convection dried papaya and pineapple residues: A methodological approach for application to higher scale". *Waste Management*, 78: 58-68, ISSN: 0956-053X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.020>.
- Saheed, O.K., Jamal, P., Karim, M.I.A., Alam, Z. & Muyibi, S.A. 2013. "Cellulolytic fruits waste: a potential support for enzyme assisted protein production". *Journal of Biological Sciences*, 13(5): 379-385, ISSN: 1812-5719, DOI: <https://doi.org/10.3923/jbs.2013.379.385>.
- Saleem, M. & Saeed, M.T. 2019. "Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent". *Journal of King Saud University-Science*, 32(1): 805-810, ISSN: 1018-3647, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013>.

- Serna, L. & Torres, C. 2015. "Potencial agroindustrial de cáscaras de mango de las variedades Keitt y Tommy Atkins (*Mangifera indica*)". Acta Agronómica, 64(2): 110-115, ISSN: 2323-0118, DOI: <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43579>.
- Tijani, I.D.R., Jamal, P., Alam, M. & Mirghani, M. 2012. "Optimization of cassava peel medium to an enriched animal feed by the white rot fungi *Panus tigrinus* M609RQY". International Food Research Journal, 19(2): 427-432, ISSN: 2231 7546.
- Vargas, M.L., Figueroa-Brito, H., Tamayo, J.A., Toledo, V.M. & Moo, V.M. 2019. "Aprovechamiento de cáscaras de frutas: análisis nutricional y compuestos bioactivos". Ciencia Ergo-Sum, 26(2): 1-11, ISSN: 2395-8782, DOI: <https://doi.org/10.30878/ces.v26n2a6>.
- Vera, R., Ormaza, J., Muñoz, J., Arteaga, F. & Sánchez, L. 2018. "*Lactobacillus plantarum* strains with probiotic potentials isolated from creole pigs". Revista de Salud Animal, 40(2): 1-12, ISSN: 0253-570X.
- Yoong, C., Mohd, N., Rahman, R.A., Abedin, N.H.Z., Hussain, N. & Sulaiman, R. 2017. "Current trends of tropical fruit waste utilization". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58(3): 335-361, ISSN: 1549-7852, DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1176009>.
- Zamudio, K. & Zavaleta, A. 2003. "Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales". Ciencia e Investigación, 6(1): 30-35, ISSN: 1609-9044.
- Zhou, L., Christopher, D. & Paull, R. 2000. "Defoliation and fruit removal effects on papaya fruit production, sugar metabolism, and sucrose metabolism". Journal of the American Society for Horticultural Science, 125(5): 644-652, ISSN: 2327-9788, DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.125.5.644>.

Received: January 31, 2020

Accepted: June 16, 2020