

## Increase of protein and antioxidant activity of orito banana silage. Technical note

### Incremento proteico y actividad antioxidante del ensilado de fruto de banano orito. Nota técnica

W. Caicedo<sup>1,4\*</sup>, Derwin Viáfara<sup>2</sup>, M. Pérez<sup>1</sup>, F.N.A. Ferreira<sup>3</sup>, Karla Pico<sup>4</sup>, Kely Cachago<sup>4</sup>, S. Valle<sup>1</sup> and  
W.M. Ferreira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Ciencias de la Tierra, Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Pastaza, Ecuador*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Bromatología, Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Pastaza, Ecuador*

<sup>3</sup>*Departamento de Servicios Técnicos, Agroceres Multimix, 1411 01JN St., 13502-741, Rio Claro, São Paulo, Brasil*

<sup>4</sup>*Granja Agropecuaria Caicedo, Puyo, Pastaza, Ecuador*

<sup>5</sup>*Departamento de Ciencia Animal, Universidad Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

Email: orlando.caicedo@yahoo.es

ORCID W. Caicedo: <https://orcid.org/0000-0002-2890-3274>

ORCID M. Pérez: <https://orcid.org/0000-0001-9071-5939>

ORCID F.N.A. Ferreira: <http://orcid.org/0000-0002-2225-1674>

ORCID S. Valle: <http://orcid.org/0000-0002-2599-4641>

ORCID W.M. Ferreira: <http://orcid.org/0000-0003-0104-0736>

In order to determine protein content, total phenols and antioxidant activity of green orito banana (*Musa acuminata* AA) fruit silage, inoculated with whey, for its use as animal feeding, a completely randomized design was implemented, with six treatments (ensiling time): 0, 1, 4, 8, 15 and 30 days. The best results ( $P < 0.05$ ) for crude protein were obtained on days 4 (15.54%), 8 (15.44%), 15 (15.41%) and 30 (15.33%). Total phenols showed their best results on day 30 (35,812.85  $\mu\text{Mol GAE/kg DM}$ ) and antioxidant activity on day 15 (3,034.98  $\mu\text{Mol TROLOX/kg DM}$ ). It is concluded that, through fermentation process of the waste green orito banana fruit, between 0 and 30 days, the best protein content and antioxidant activity were achieved at 15 days, which resulted in a food with potential for animal health.

Key words: antioxidants, solid fermentation, residue fruit, microbial protein

In the Ecuadorian Amazon region, there is a great potential for agricultural resources, including orito banana, which is produced and harvested throughout the year. The first quality fruits are intended for human consumption, while the thin and small fruit is used in its natural state for feeding animals of zootechnical interest. It is known, from references, that green banana fruits, in their natural state, contain a high content of secondary metabolites, which can exert a negative effect on the use of nutrients by animals, so it is necessary to use processing techniques, such as solid state silage, to take advantage of these resources (Kamrunnessa *et al.* 2019).

In this sense, previous studies with alternative feeds have shown that through the production of solid silage, protein and antioxidant contents of raw materials can be improved for animal feeding (Salinas *et al.* 2014). The objective of this study was to determine protein content, total phenols and antioxidant activity of green orito banana (*Musa*

Para determinar los contenidos de proteína, fenoles totales y actividad antioxidante del ensilado de fruto de banano orito (*Musa acuminata* AA) verde, inoculado con suero de leche, para su uso en la alimentación animal, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis tratamientos (tiempo de ensilado): 0, 1, 4, 8, 15 y 30 días. Los mejores resultados ( $P < 0.05$ ) para proteína bruta se obtuvieron en los días 4 (15.54%), 8 (15.44%), 15 (15.41%) y 30 (15.33%). Los fenoles totales, en el día 30 (35812.85  $\mu\text{Mol EAG/kg MS}$ ) y la actividad antioxidante en el 15 (3034.98  $\mu\text{Mol TROLOX/kg MS}$ ). Se concluye que mediante el proceso de fermentación, entre 0 y 30 días, del fruto de banano orito verde de rechazo, se lograron a los 15 días los mejores contenidos de proteína y actividad antioxidante, lo que dio lugar a un alimento con potencialidades para la salud de los animales.

Palabras clave: antioxidantes, fermentación sólida, fruto de rechazo, proteína microbiana.

En la Amazonía Ecuatoriana existe un gran potencial de recursos agrícolas, entre ellos el cultivar de banano orito, que se produce y cosecha durante todo el año. Los frutos de primera calidad se destinan para el consumo humano, mientras que la fruta delgada y pequeña se utiliza en estado natural para la alimentación de animales de interés zootécnico. Se conoce por la literatura que los frutos de banano verde, en estado natural, contienen un elevado tenor de metabolitos secundarios, que puede ejercer un efecto negativo en el aprovechamiento de nutrientes por parte de los animales, por lo que es necesario emplear técnicas de procesamiento, como el ensilado en estado sólido, para aprovechar estos recursos (Kamrunnessa *et al.* 2019).

En este entorno, estudios precedentes con alimentos alternativos han demostrado que mediante la producción de ensilados sólidos se pueden mejorar los contenidos de proteína y antioxidantes de las materias primas para su uso en la alimentación animal (Salinas *et al.* 2014). El objetivo de este estudio fue determinar los contenidos de proteína, fenoles totales y actividad antioxidante del ensilado de fruto de banano

*acuminata* AA) fruit silage, inoculated with whey, for its application as food for animals.

For silage, waste green orito banana fruit was obtained in Mariscal market, in Puyo city, Pastaza province, Ecuador. Immediately, it was transported for 5 min. to the microbiology laboratory of the Universidad Estatal Amazónica (UEA). Once there, they were washed and ground in a hammer mill, equipped with a blade and a 2-cm screen. A part of the chopped material (2 kg) was collected and transferred to the Bromatology Laboratory of UEA, to determine the content of crude protein (CP), total phenols and antioxidant activity.

The fruit in its natural state had 4.26% CP, 3,888.46  $\mu$ Mol GAE/kg DM of total phenols and 351.85  $\mu$ Mol TROLOX/kg DM of antioxidant activity. Silage was produced with the remaining chopped orito banana, combining raw materials: chopped green orito banana fruit (67%), wheat powder (20%), Pecutrin (0.5%), molasses (2%), calcium carbonate (0.5%) and fresh whey (10%). Mixing lasted 5 min., as homogeneous as possible, and was introduced into 18 polyethylene microsilos, with a capacity of 1 kg each. Three microsilos were evaluated for each conservation time (0, 1, 4, 8, 15 and 30 d).

CP determination was carried out by Kjeldahl method. Total phenols, in gallic acid equivalent (GAE), were determined according to Folin-Ciocalteu, and antioxidant activity in TROLOX by FRAP (2,4,6-tripyridyl-s-triazine). The analyzes were carried out by triplicate at the UEA bromatology laboratory. Analysis of variance was performed and Duncan (1955) test ( $P < 0.05$ ) was applied for comparison of means. All analyzes were carried out with Infostat statistical program, version (2012) for Windows.

Table 1 shows CP contents, total phenols and antioxidant activity of orito banana fruit silage. The highest protein values were achieved on days 4, 8, 15 and 30, without significant differences among them, and they were superior ( $P < 0.05$ ) to days 0 and 1. Regarding content of total phenols, fermentation presented the highest value ( $P < 0.05$ ) on day 30, while day 0 had the lowest one. As to the antioxidant activity, the best value ( $P < 0.05$ ) was obtained on day 15, and the lowest result was obtained at day 0.

orito (*Musa acuminata* AA) verde, inoculado con suero de leche, para su aplicación como alimento destinado a los animales.

Para el ensilado, el fruto de banano orito verde de desecho se obtuvo en el mercado Mariscal, en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza, Ecuador. Inmediatamente se trasladó durante 5 min. al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica (UEA). Una vez allí, se efectuó el lavado y se picó en un molino martillo, provisto de cuchilla y criba de 2 cm. Una parte del material picado (2 kg) se recogió y trasladó al laboratorio de Bromatología de la UEA, para determinar el contenido de proteína bruta (PB), fenoles totales y actividad antioxidante.

La fruta en estado natural tenía 4.26 % de PB, 3888.46  $\mu$ Mol EAG/kg MS de fenoles totales y 351.85  $\mu$ Mol TROLOX/kg MS de actividad antioxidante. Con el banano orito picado sobrante se confeccionó el ensilado, combinando las materias primas: fruto de banano orito verde picado (67%), polvillo de trigo (20%), pecutrin vitaminado (0.5%), melaza (2%), carbonato de calcio (0.5%) y suero de leche fresco (10%). La mixtura se hizo durante 5 min. de forma homogénea, y se introdujo en 18 microsilos de polietileno, con capacidad para 1 kg c/u. Se evaluaron tres microsilos para cada tiempo de conservación (0, 1, 4, 8, 15 y 30 d).

La determinación de la PB se efectuó por el método de Kjeldahl. Los fenoles totales en equivalentes de ácido gálico (EAG) según Folin-Ciocalteu, y la actividad antioxidante en TROLOX por FRAP (2,4,6-tripiridil-s-triazina). Los análisis se hicieron por triplicado en el Laboratorio de Bromatología de la UEA. Se efectuó análisis de varianza y se aplicó la dócima de Duncan (1955) ( $P < 0.05$ ) para la comparación de medias. Todos los análisis se ejecutaron con el programa estadístico Infostat, versión (2012) para Windows.

En la tabla 1 se muestran los contenidos de PB, fenoles totales y actividad antioxidante del ensilado del fruto de banano orito. Los mayores valores de proteína se lograron en los días cuatro, ocho, quince y treinta, sin diferencias significativas entre ellos, y superaron ampliamente ( $P < 0.05$ ) los días cero y uno. En relación con el contenido de fenoles totales, el día 30 de fermentación presentó el mayor valor ( $P < 0.05$ ), mientras que el día cero, el menor. Con respecto a la actividad antioxidante, el mejor valor ( $P < 0.05$ ) se obtuvo en el día 15, y el menor resultado en el cero.

Table 1. Percentage and chemical composition of tilapia small fish feed (control)

Variables	Days of fermentation						SE $\pm$	P value
	0	1	4	8	15	30		
CP, %	7.86 <sup>c</sup>	11.61 <sup>b</sup>	15.54 <sup>a</sup>	15.44 <sup>a</sup>	15.41 <sup>a</sup>	15.33 <sup>a</sup>	0.04	P=0.0001
Total phenols, $\mu$ Mol GAE/kg DM	12781.73 <sup>e</sup>	14571.43 <sup>d</sup>	16544.61 <sup>c</sup>	16952.19 <sup>c</sup>	25442.85 <sup>b</sup>	35812.85 <sup>a</sup>	53.48	P=0.0001
Antioxidant activity, $\mu$ Mol TROLOX/kg DM	410.55 <sup>e</sup>	515.87 <sup>d</sup>	576.47 <sup>d</sup>	692.04 <sup>c</sup>	3034.98 <sup>a</sup>	1636.11 <sup>b</sup>	3.28	P=0.0001

<sup>abcde</sup> Different letters in a row differ at  $P < 0.05$ , according to Duncan (1955)

The greatest increase of silage protein with respect to fermentation time, is related to the increase of microbial mass in the substrate (Yunus *et al.* 2015). In this study, fresh milk serum was used as inoculum source, which is rich in *Lactobacillus* sp. and *Enterococcus* sp. (Martínez-López *et al.* 2016). In this regard, Gunawan *et al.* (2015) carried out a research with cassava meal, fermented with *Lactobacillus*, *Saccharomyces* and *Rhizopus* as inocula, in which they reported the highest protein content at 120 h post-inoculation, for the material treated with *Lactobacillus* (from 1.92% in natural meal to 8.58% in fermented material). Khan *et al.* (2018) observed that fermentation reduces the content of bitter free amino acids (phenylalanine, tyrosine and leucine), and increases amino acids with antioxidant potential (taurine, aspartic acid, cysteine, thiazolin cysteine and  $\gamma$ -amino-butyric acid).

Regarding the increase of polyphenol content of the ensiled material during the fermentation time, Dey *et al.* (2016) stated that this is due to the use of the starter culture of lactic acid bacteria through fermentation process. Antioxidant phenolics are produced by microorganisms through a metabolic pathway through extracellular enzymatic action, which increases their concentration in the substrate.

The fermented material on day 15 showed the highest antioxidant activity, which was partially reduced on day 30 of evaluation. Guan *et al.* (2020) stated that lactic acid bacteria in the silage show an optimal activity until day 14, which later tends to reduce in the substrate. The best antioxidant activity in fermented foods of plant origin is related to the rupture of ester bonds in free phenolic compounds, due to the action of lactic acid bacteria with a probiotic effect. Hole *et al.* (2012) evaluated the bioavailability of phenolic acids in whole barley and oat meals, after fermentation with three probiotic strains (*Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus reuteri* SD2112 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5) of lactic acid bacteria. These strains exhibited maximum increases in free phenolic acids, from 2.55 to 69.91  $\mu\text{g g}^{-1}$  DM and from 4.13 to 109.42  $\mu\text{g g}^{-1}$  DM, in whole barley and oat, respectively.

In a study conducted by Khan *et al.* (2018) on dry pulp of *Dimocarpus longan*, it was demonstrated that, through fermentation, an increase of 17.4% in the amount of free phenolic content was achieved. Also, the phenolic composition, determined by HPLC, revealed significant changes in the content of free gallic acid (37.9%) and 4-methylcatechol (25.7%). Similarly, fermentation improved ferric reducing antioxidant power (18.3%), absorption capacity of free and total radicals (11.8%), and free phenolic fraction (37.4%), respectively. Finally, phenolic acids, released by the enzymatic action of lactic bacteria, constitute antioxidant peptides to formulate functional and nutraceutical foods for humans and animals.

El mayor incremento de la proteína del ensilado con respecto al tiempo de fermentación se relaciona con el aumento de la masa microbiana en el sustrato (Yunus *et al.* 2015). En este estudio, se empleó suero de leche fresco como fuente de inóculo, rico en *Lactobacillus* sp. y *Enterococcus* sp. (Martínez-López *et al.* 2016). Al respecto, Gunawan *et al.* (2015) realizaron una investigación con harina de yuca fermentada con *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Rhizopus* como fuente de inóculos, donde informan mayor contenido de proteína a las 120 h post-inoculación, para el material tratado con *Lactobacillus* (de 1.92 % en la harina natural a 8.58 % en el material fermentado). Khan *et al.* (2018) observaron que la fermentación reduce el contenido de aminoácidos libres con sabor amargo (fenilalanina, tirosina y leucina), y aumenta los aminoácidos (taurina, ácido aspártico, cisteína, cisteína tiazolina y ácido  $\gamma$ -amino-butírico) con potencial antioxidante.

En relación con el aumento en el tenor de polifenoles del material ensilado durante el tiempo de fermentación, Dey *et al.* (2016) manifiestan que esto se debe al empleo del cultivo iniciador de bacterias lácticas mediante el proceso de fermentación. Los fenólicos antioxidantes se producen por los microorganismos mediante una vía metabólica por acción enzimática extracelular, lo que aumenta su concentración en el sustrato.

El material fermentado en el día 15 mostró la mayor actividad antioxidante, que se redujo parcialmente en el día 30 de evaluación. Guan *et al.* (2020) manifiestan que las bacterias lácticas en el ensilado dejan ver una actividad óptima hasta el día 14, que en lo posterior se tiende a reducir en el sustrato. La mejor actividad antioxidante en los alimentos fermentados de origen vegetal se relaciona con la ruptura de los enlaces ésteres en compuestos fenólicos libres, por la acción de las bacterias lácticas con efecto probiótico. Hole *et al.* (2012) evaluaron la biodisponibilidad de los ácidos fenólicos en harinas de cebada integral y avena, después de la fermentación con tres cepas probióticas (*Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus reuteri* SD2112 y *Lactobacillus acidophilus* LA-5) de bacterias ácido lácticas. Estas cepas exhibieron incrementos máximos en ácidos fenólicos libres, de 2.55 a 69.91  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS y de 4.13 a 109.42  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS, en cebada integral y avena, respectivamente.

En un estudio conducido por Khan *et al.* (2018) sobre pulpa seca de *Dimocarpus longan* se demostró que mediante la fermentación se logró incremento de 17.4 % en la cantidad de contenido fenólico libre. También la composición fenólica determinada por HPLC reveló cambios significativos en el contenido de ácido gálico libre (37.9 %) y 4-metilcatecol (25.7 %). De igual manera, la fermentación mejoró el poder antioxidante reductor férrico (18.3 %), la capacidad de absorción de radicales libres y totales (11.8%), y la fracción fenólica libre (37.4 %), respectivamente. Por último, los ácidos fenólicos, liberados por la acción enzimática de las bacterias lácticas, constituyen péptidos antioxidantes para formular alimentos funcionales y nutraceuticos, destinados a humanos y animales.

It is concluded that, through fermentation process of the waste green orito banana fruit, between 0 and 30 days, the best protein content and antioxidant activity were achieved at 15 days. Therefore, a food with potential for animal health was achieved.

#### Acknowledgements

Thanks to the technical staff of the bromatology laboratory, of the Universidad Estatal Amazónica, for their support in the development of this research.

Se concluye que mediante el proceso de fermentación, entre 0 y 30 d, del fruto de banano orito verde de **rechazo**, se obtuvieron a los 15 d los mejores contenidos de proteína y actividad antioxidante. Se logró así un alimento con potencialidades para la salud animal.

#### Agradecimientos

Se agradece al personal técnico del Laboratorio de Bromatología, de la Universidad Estatal Amazónica, por el apoyo para el desarrollo de esta investigación.

#### References

- Dey, T.B., Chakraborty, S., Jain, K.K., Sharma, A. & Kuhad, R.C. 2016. "Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review". *Trends in Food Science & Technology*, 53: 60-74, ISSN: 0924-2244, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.007>.
- 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>.
- Guan, H., Shuai, Y., Yan, Y., Ran, Q., Wang, X., Li, D., Cai, Y. & Zhang, X. 2020. "Microbial Community and Fermentation Dynamics of Corn Silage Prepared with Heat-Resistant Lactic Acid Bacteria in a Hot Environment". *Microorganisms*, 8(5): 719, ISSN: 2076-2607, DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050719>.
- Gunawan, S., Widjaja, T., Zullaikah, S., Ernawati, L., Istianah, N., Apamarta, H.W. & Prasetyoko, D. 2015. "Effect of fermenting cassava with *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Rhizopus oryzae* on the chemical composition of their flour". *International Food Research Journal*, 22(3): 1280-1287, ISSN: 2231-7546.
- Hole, A.A.S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J. & Sahlström, S. 2012. "Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus reuteri*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25): 6369-6375, ISSN: 0021-8561, DOI: <https://doi.org/10.1021/jf300410h>
- Kamrunnessa, A.K., Rahman, M. & Kar, A. 2019. "Extraction and evaluation of phytochemicals from banana peels (*Musa sapientum*) and banana plants (*Musa paradisiaca*)". *Malaysian Journal of Halal Research Journal*, 2(1): 22-26, ISSN: 2616-1923, DOI: <https://doi.org/10.2478/mjhr-2019-0005>.
- Khan, S.A., Liu, L., Lai, T., Zhang, R., Wei, Z., Xiao, J., Deng, Y. & Zhang, M. 2018. "Phenolic profile, free amino acids composition and antioxidant potential of dried longan fermented by lactic acid bacteria". *Journal of Food Science and Technology*, 55(12): 4782-4791, ISSN: 0975-8402, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3411-8>.
- Martínez-López, V., Del Moral, S.T., Sachman, B., Ramírez-Coutiño, L.P. & García-Gómez, M.J. 2016. "Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado". *Nova Scientia*, 8(2): 326-339, ISSN: 2007-0705.
- Salinas, T., Sánchez, T., Ortega, M., Soto, M., Díaz, A., Hernández, J., Nava, C. & Vaquera, H. 2014. "Changes in composition, antioxidant content, and antioxidant capacity of coffee pulp during the ensiling process". *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(9): 492-49, ISSN: 1806-9290, DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000900006>.
- Yunus, F., Nadeem, M. & Rashid, F. 2015. "Single-cell protein production through microbial conversion of lignocellulosic residue (wheat bran) for animal feed". *Journal of the Institute of Brewing*, 121(4): 553-557, ISSN: 2050-0416, DOI: <https://doi.org/10.1002/jib.251>.

Received: June 5, 2020

Accepted: September 8, 2020