

Caracterización microbiológica de harina hiperproteica de quinoa obtenida en molino de abrasión

Microbiological characterization of high protein quinoa flour obtained in an abrasion mill

Karen Sofía Muñoz Pabón¹

Diego Fernando Roa²

José Luis Hoyos³

Jesús Eduardo Bravo⁴

Universidad Nacional Abierta y a Distancia / Universidad del Cauca, Colombia

Resumen

La harina de quinoa es una materia prima interesante para la industria de alimentos por su balanceado contenido de nutrientes, a partir de esta se pueden obtener diferentes alimentos de panadería como snack, pasta, pan, entre otros. Razón por la cual es importante que cumpla con la calidad microbiológica estipulada por la norma técnica colombiana NTC. En el presente trabajo se realizó una caracterización microbiológica de harina hiperproteica de quinoa bajo metodologías establecidas por la NTC que aplican para cada microorganismo. Las harinas presentaron contenidos en casi todos los microorganismos ensayados, destacándose el recuento de hongos, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ninguna de las muestras presentó coliformes totales ni *Salmonella spp.* Hasta donde

¹ Docente investigadora, Grupo de investigación Giepronol, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. <https://orcid.org/0000-0001-6496-7083> / kspabon@unicauca.edu.co

² Docente investigador, Grupo de investigación Asubagroin, Universidad del Cauca, <https://orcid.org/0000-0002-7198-9827> / droa@unicauca.edu.co

³ Docente investigador, Grupo de investigación Asubagroin, Universidad del Cauca, <https://orcid.org/0000-0001-9025-9734> / jlhoyos@unicauca.edu.co

⁴ Docente investigador, Grupo de investigación Gipa, Universidad del Cauca, <https://orcid.org/0000-0001-6462-3512> / jebravo@unicauca.edu.co

sabemos, esta es la primera caracterización microbiológica de la harina hiperproteica de quinoa.

Palabras clave: análisis microbiológico, harina de quinoa, microorganismos patógenos, productos de panadería.

Abstract

Quinoa flour is an interesting raw material for the food industry due to its balanced nutrient content, from which different bakery foods such as snacks, pasta, bread, among others, can be obtained. For this reason, it is important that it complies with the microbiological quality stipulated by the Colombian technical standard NTC. In the present work, microbiological characterization of hyperprotein quinoa flour was carried out. The microbiological analysis was carried out under the NTC that applies to each microorganism. The flours presented contents in almost all the microorganisms tested, highlighting the count of fungi, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, none of the samples presented total coliforms or *Salmonella* spp. To our knowledge, this is the first microbiological characterization of quinoa hyperproteic flour.

Keywords: Microbiological analysis, quinoa flour, pathogenic microorganisms, bakery products.

1. Introducción

Uno de los pseudocereales más cultivados en el departamento del Cauca es la quinoa, la cual está compuesta principalmente por macronutrientes como el almidón, el agua, las proteínas, lípidos, otros micronutrientes y compuestos bioactivos (Mira Vásquez & Roca Argüelles, 2017). En las diferencias encontradas entre las harinas de quinoa y otras como el trigo, la cebada o el arroz podría destacarse la composición proteica, siendo el contenido en prolamina y glutenina (así como en gluten) mayor en las harinas de trigo (Vega-Gálvez *et al.*, 2010). Este último aspecto también hace atractiva la harina de quinoa porque se pueden obtener derivados sin gluten.

En alimentos como la harina de quinoa donde la a_w es inferior a 0.85, la *Salmonella* y otras bacterias patógenas pueden sobrevivir en un estado viable pero no cultivable durante largos períodos de tiempo debido al aumento de la resistencia a proceso térmicos (Subedi *et al.*, 2020).

Aunque el crecimiento de los microorganismos no se mantiene con una actividad de agua tan baja, las bacterias y los hongos transmitidos por los alimentos pueden contaminar fácilmente la harina y sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Varios estudios de Australia, Europa y Norteamérica informan de la presencia de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y otros microorganismos deteriorantes en alimentos como las harinas, además de los patógenos transmitidos por los alimentos, la contaminación con micotoxinas es entre los problemas más graves que afectan a la seguridad y la calidad de los cereales y sus productos (Cardoso *et al.*, 2019). Razón por la cual en este estudio se realizó el análisis microbiológico de una materia prima como la harina de quinoa, que será empleada en diferentes preparaciones.

2. Metodología

Se realizó la caracterización microbiológica de harina hiperproteica de quinoa bajo metodologías establecidas por la NTC que aplica para cada microorganismo.

- Coliformes totales NTC 4458 Rec. De *Escherichia Coli* NTC 4458 UFC/g < 10.

Según la norma NTC 4458 se toman 10 g de harina hiperproteica por triplicado, después se diluyen en 90 mL de agua peptonada y se mezclan a 150 rpm durante 10 min en shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific USA), una vez culminado este tiempo se toma 1 mL de cada réplica y se siembra en caja de Petri previamente estéril, mediante conteo en placa de profundidad en el agar chromogenic colinstant durante 24-48 h de incubación a 35 ° C.

- Mesófilos NTC 4519 UFC/g 300.000 Máx.

Según norma NTC 4519 se toma una muestra representativa de harina hiperproteica, por duplicado, 10 g en 90 mL agua peptonada, después se mezclan en shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific USA), enseguida se toma 1 mL de muestra de cada réplica, realizando diluciones hasta la 10^{-3} , se siembra por inmersión cada dilución en cajas de Petri previamente estériles, en agar PCA, el cual no es específico, durante 24 a 72 h a 30° C.

- Hongos y levaduras NTC 5698-2 UFC/g 5000 Máx.

Según la norma NTC 5698-2 se toman 10 g de harina hiperproteica por duplicado, después se diluyen en 90 mL de agua peptonada y se mezclan

a 150 rpm durante 10 min en shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific USA), una vez culminado este tiempo se toma 100 µL de cada réplica y se siembra por superficie en caja de Petri previamente estéril, mediante conteo en placa de superficie en el agar PDA selectivo para hongos y levaduras durante 24-72 h de incubación a 30 ° C.

- *Bacillus cereus* NTC 4679

Según la norma NTC 4679 se toman 10 g de harina hiperproteica por duplicado, después se diluyen en 90 mL de agua peptonada y se mezclan a 150 rpm durante 10 min en shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific USA), una vez culminado este tiempo se toma 100 µL de cada réplica y se siembra por superficie en caja de Petri previamente estéril, mediante conteo en placa de superficie en el agar MYP con yema de huevo específico para *Bacillus cereus* durante 24 h de incubación a 37 ° C.

- *Staphylococcus aureus* NTC 4779 <100

Según la norma NTC 4779 se toman 10 g de harina hiperproteica por duplicado, después se diluyen en 90 mL de agua peptonada y se mezclan a 150 rpm durante 10 min en shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific USA), una vez culminado este tiempo se toma 100 µL de cada réplica y se siembra por superficie en caja de Petri previamente estéril, mediante conteo en placa de superficie en el agar Baird Parker específico para *Staphylococcus* durante 24 h de incubación a 35 ° C el protocolo con todos los detalles se presenta en el informe 6 de la contratista Astrid Parra.

- *Salmonella* NTC 4574 en 25g ausencia

Según la norma NTC 4574 se toman 25 g de harina hiperproteica por duplicado, después se diluyen en 225 mL de agua peptonada tamponada y se mezclan a 150 rpm durante 10 min en shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific USA), una vez culminado este tiempo se dejan en incubación a 37°C durante 18 h, al cabo de las cuales se inoculan 100 µL en 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis verde malaquita (medio RVS) a 41.5°C durante 24 h y 1000 µL en 10 mL de caldo Tetratonate Mueller Kauffmann (MKTTn medio) a 37°C durante 24 h, transcurrido este tiempo se siembra mediante un asa la superficie de una caja de Petri que contenga agar XLD medio selectivo de tal forma que se obtengan colonias asiladas, se procede de la misma manera con el *Salmonella Shiguella* agar, se incuban a 34°C durante 24 h, al cabo de las cuales se observan colonias típicas de *Salmonella*.

3. Discusión

Como se ve en la Tabla 1, durante el almacenamiento de la harina de quinoa en bolsas de polietileno a temperatura ambiente no hay presencia de coliformes, cumpliendo la norma NTC 4458 UFC/g < 10, de acuerdo con Forsido *et al.*, (2021), en alimentos a base de harinas los procesos de calentamiento como el tostado, el cual se realiza entre 280 y 300 °C, mejoran las cualidades de conservación al reducir la carga microbiana, la actividad enzimática y la destrucción de insectos.

Resultados similares fueron obtenidos por Väkeväinen *et al.*, (2020), en productos a base de harina de quinoa.

Tabla 1. Conteo de bacterias aeróbicas totales (mesófilos), hongos y levaduras, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* en harina hiperprotéica en agar PCA, PDA, MYP y Baird Parker respectivamente

Log ₁₀ UFC/g coliformes totales	Log ₁₀ UFC/g mesofilos	Log ₁₀ UFC Hongos y levaduras	Log ₁₀ UFC <i>Bacillus cereus</i>	Log ₁₀ UFC <i>Staphylococcus aureus</i>	Log ₁₀ UFC <i>Salmonella</i>	a _w	pH
ausencia	4,48±0,10	3,19±0,03	3,20±0,02	2,92±0,081	Ausencia	0,46±0,00	6,74±0,13

Como se ve en la Tabla 1, se presentan 10⁴ UFC/g de mesófilos, conteo que se encuentra dentro de los límites de la NTC 4519 (UFC/g 300.000 Máx). Se presentaron 10³ UFC/g de hongos y levaduras NTC 5698-2 5000 Máx. Según las fuentes de contaminación microbiana de los granos se pueden encontrar a lo largo de la cadena de producción del cultivo, incluidas las etapas de precosecha, cosecha, transporte, almacenamiento y procesamiento, pueden ser transferidos por diferentes elementos como animales, aire, agua, polvo y equipos contaminados; además, las diferentes condiciones climáticas, como el nivel de precipitación y el nivel de humedad relativa, así como la microflora específica del campo, pueden influir en el tipo y la cantidad de carga microbiana en los granos (Magallanes López & Simsek, 2021). Los microorganismos que se encuentran en los granos incluyen patógenos entéricos, como las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella* y las bacterias Gram positivas *Bacillus cereus*, levaduras y hongos productores de micotoxinas del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, entre otros (Laca *et al.*, 2006). Aunque se recomienda someter a horneado o calentamiento a las harinas, para el caso de mezclas sin hornear o no calentadas como la harina instantánea pueden ser vulnerables a la

contaminación y por ende contraer una enfermedad transmitida por alimentos (Chen *et al.*, 2021).

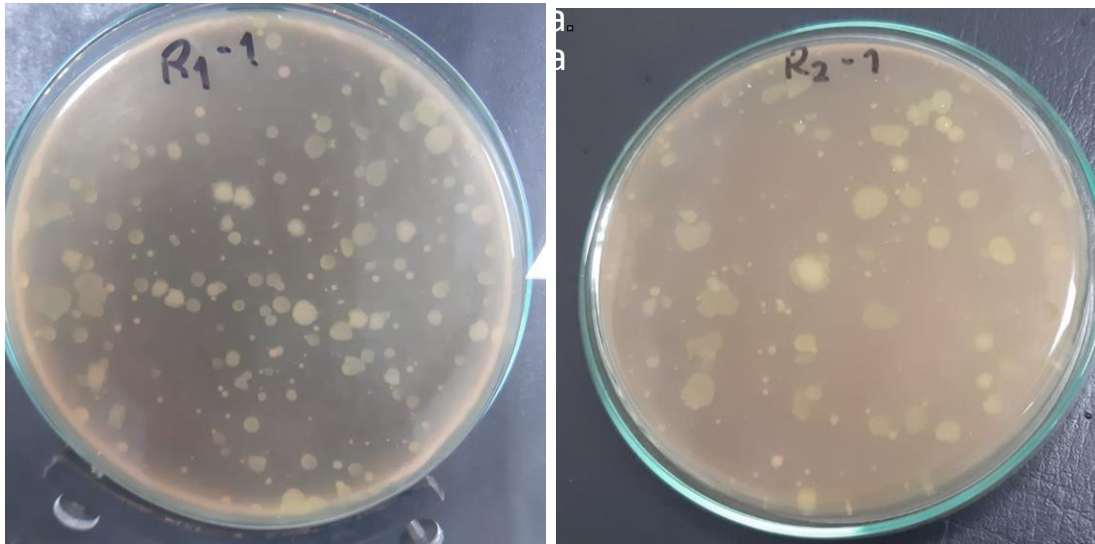


Figura 1. Colonias de *Bacillus cereus* en harina hiperproteica en agar MYP después de 24 h. a: réplica 1 conteo de hongos y levaduras harina hiperproteica, b: réplica 2 conteo *Bacillus cereus* harina hiperproteica.

Bacillus cereus (Figura 1) es una bacteria formadora de espora que se encuentra en alimentos con baja humedad, puede reproducirse y generar toxinas a temperaturas de almacenamiento superiores a 6 °C (Granum & Lund, 1997).

B. cereus puede causar dos tipos de síntomas de intoxicación alimentaria que incluyen diarrea y emesis, el primer síntoma es causado por las actividades de las enterotoxinas, incluidas las enterotoxinas hemolíticas (HBL), las toxinas no hemolíticas (NHE) y la citotoxina K (CytK), mientras que el último síntoma es causado por la toxina cereulida, un cíclico dodecadepsipéptido codificado por genes *ces*; los casos de intoxicación alimentaria inducida por *B. cereus* pueden ser graves e incluso provocar la muerte, además, algunas infecciones no gastrointestinales como infecciones oculares, meningitis, endocarditis y osteomielitis (Guo *et al.*, 2021).

La carga microbiana se encuentra típicamente en la superficie de los granos, sin embargo, durante el proceso de molienda en seco, la contaminación microbiana se redistribuye entre los productos molidos, la baja actividad hídrica ($a_w < 0,60$) de la harina no favorece el crecimiento

microbiano; sin embargo, las esporas contaminantes junto con los microorganismos inactivos seguirán siendo viables durante períodos prolongados y constituirán un peligro potencial para la salud (Magallanes López & Simsek, 2021).

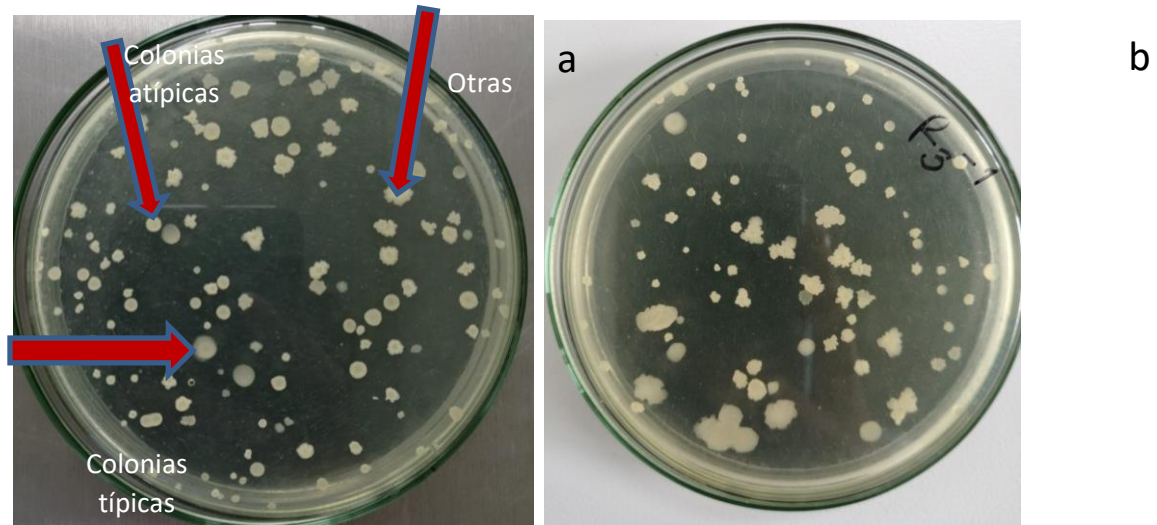


Figura 2. Colonias de *Staphylococcus* en harina hiperproteica en agar Baird Parker después de 24 h. a: réplica 1 conteo de colonias atípicas de fondo de *Staphylococcus* harina hiperproteica, b: réplica 2 conteo de colonias atípicas *Staphylococcus* harina hiperproteica.

Como se ve en la Tabla 1, el conteo *S. aureus* es de $2,92 \pm 0,081$, que se encuentra por encima de la norma NTC 4779 < 100 , se presentan colonias típicas de *S. aureus* (Figura 2), las cuales son grises brillantes y convexas de 1 a 1,5 mm con zonas claras, colonias atípicas son grises sin zonas claras, las cuales están formadas principalmente por *Staphylococcus* coagulasa positiva contaminantes y otras colonias consideradas flora de fondo. No se realiza confirmación.

En comparación con otros patógenos microbianos, *S. aureus* es más peligroso debido a la producción de toxinas, la capacidad de formar colonias en una variedad de entornos (no patógenos y los de importancia clínica), la capacidad de cambiar las tasas metabólicas (por ejemplo, modificaciones de la pared celular, adaptaciones de la población, modulaciones citoplasmáticas) según las condiciones imperantes y alta capacidad para superar el sistema de defensa del huésped (Hussain Chan *et al.*, 2021). Puede sobrevivir durante mucho tiempo en un medio ácido o alcalino (4,5 a 8 pH), a una alta concentración de sal (hasta un 15 %), a baja y alta temperatura (4 a 45 °C) y en condiciones de sequía (Onyango & Alreshidi, 2018). Los alimentos comunes afectados por *S.*

aureus incluyen carnes rojas, alimentos enlatados, productos avícolas, productos lácteos, salsas y productos de panadería rellenos de crema; *S. aureus* se caracteriza por la producción de extracelulares (nucleasa, lipasa, coagulasa, hemolisinas) y enterotoxinas (un grupo de proteína globular monocatenaria heterogénea soluble en agua, resistente al calor y responsable de la intoxicación alimentaria) (Hussain Chan *et al.*, 2021).

Como se puede ver en la Figura 3, no hay presencia de *Salmonella* en 25 g de la muestra de harina de quinoa, resultados similares obtuvieron Cardoso *et al.* (2019) en el análisis microbiológico de diferentes harinas

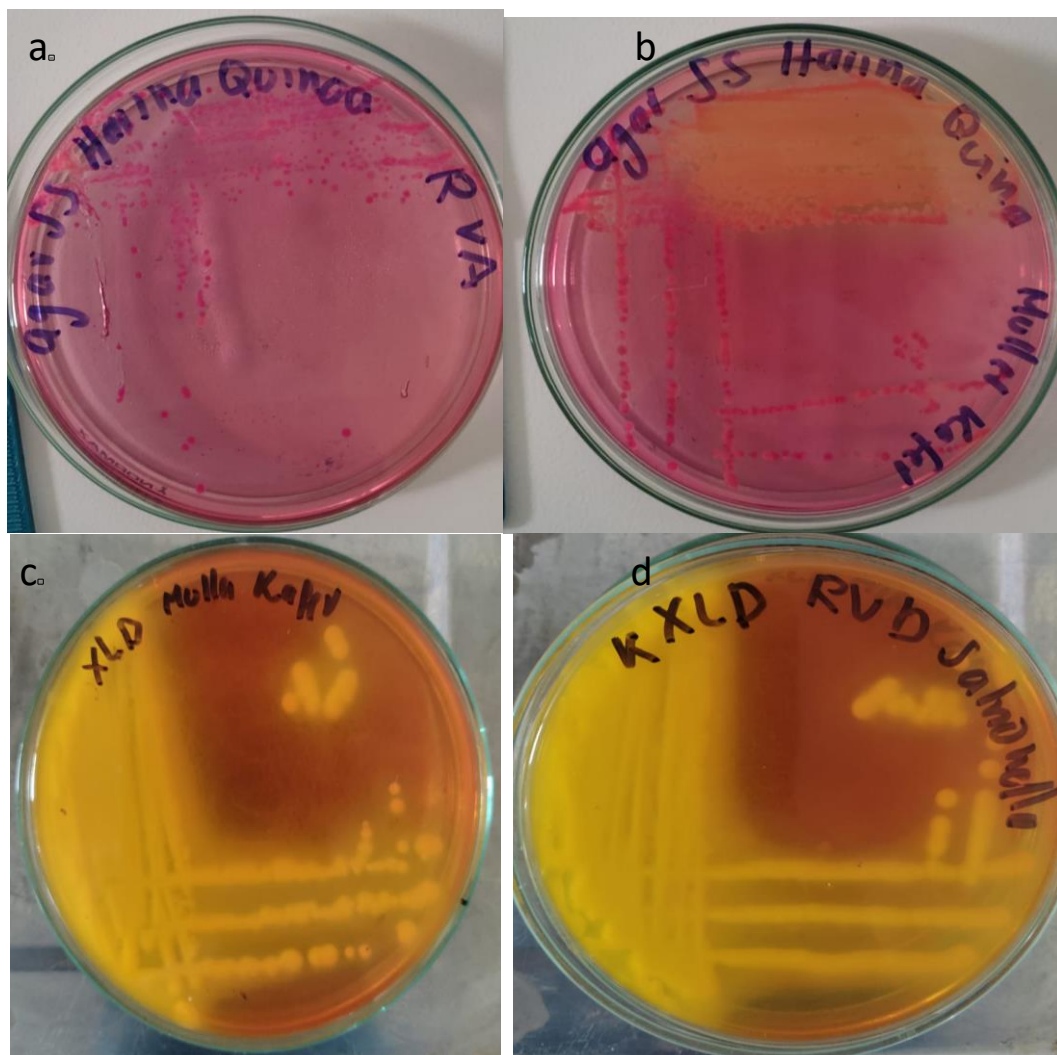


Figura 3. Colonias siembra de muestra harina hiperproteica en agar *Salmonella- Shigella* después de 24 h. a: caldo RVA, b: caldo MKTTn, siembra de muestra harina hiperproteica en agar XLD d: caldo RVA, e: caldo MKTTn .

4. Conclusiones

En cuanto al análisis microbiológico, en general las muestras de harina de quinoa presentaron contenidos en microorganismos menos *Salmonella spp* y coliformes. Los demás microorganismos estudiados estuvieron bajo los límites permitidos por norma de calidad microbiológica exigida para este tipo de microorganismos. Sin embargo, debe enfatizarse que el presente estudio es un análisis preliminar centrado en la harina de quinoa. Sería interesante continuar este estudio examinando, por ejemplo, parámetros de calidad y seguridad a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Referencias

- Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., Heleno, S. A., Rodrigues, P., González-Paramás, A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chemistry*, *280*, 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.063>
- Chen, D., Mosher, W., Wiertzema, J., Peng, P., Min, M., Cheng, Y., An, J., Ma, Y., Fan, X., Niemira, B. A., Baumler, D. J., Chen, C., Chen, P., & Ruan Chen, R. (2021). Effects of intense pulsed light and gamma irradiation on *Bacillus cereus* spores in mesquite pod flour. *Food Chemistry*, *344*, 128675.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128675>
- Forsido, S. F., Welelaw, E., Belachew, T., & Hensel, O. (2021). Effects of storage temperature and packaging material on physico-chemical, microbial and sensory properties and shelf life of extruded composite baby food flour. *Heliyon*, *7*(4), e06821.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06821>
- Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and Its Food Poisoning Toxins. *FEMS Microbiol Lett*, *157*(2), 223-228.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
- Guo, H., Yu, P., Yu, S., Wang, J., Zhang, J., & Zhang, Y. (2021). Incidence , toxin gene profiling , antimicrobial susceptibility , and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from quick-frozen food in China. *LWT*, *140*, 110824.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110824>
- Hussain Chan, M. W., Mirani, Z. A., Khan, M. N., Ali, A., Khan, A. B., Asadullah, & Rauf, N. (2021). Isolation and characterization of small

- colony variants of *Staphylococcus aureus* in various food samples. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102097.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102097>
- Icontec (2018). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos (NTC 4458).
- Icontec (2018) Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento en placa de mesófilos. Técnica de recuento en placa (NTC 4519)
- Icontec (2018). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* (NTC 4574)
- Icontec (2018). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento en placa de *Bacillus cereus*. Técnica de recuento en placa (NTC 4679)
- Icontec (2018). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento en placa de *Staphylococcus aureus*. Técnica de recuento en placa (NTC 4779).
- Icontec (2018). Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento en placa de hongos y levaduras. Técnica de recuento en placa (NTC 5698-2)
- Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., & Pandiella, S. S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 332–338.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.012>
- Magallanes López, A. M., & Simsek, S. (2021). Pathogens control on wheat and wheat flour: A review. *Cereal Chemistry*, 98(1), 17–30.
<https://doi.org/10.1002/cche.10345>
- Mira Vásquez, J. M., & Roca Argüelles, M. (2017). Características físicas, químicas y funcionales de la harina de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa willd*). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 27(1), 7–11.
- Onyango, L. A. & Alreshidi, M. M. (2018). Adaptive Metabolism in *Staphylococci*: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. *Journal of Pathogens*, 2018(Cm), 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2018/1092632>

- Subedi, S., Du, L., Prasad, A., Yadav, B., & Roopesh, M. S. (2020). Inactivation of Salmonella and quality changes in wheat flour after pulsed light-emitting diode (LED) treatments. *Food and Bioprocess Technology*, *121*, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.02.004>
- Väkeväinen, K., Ludena-Urquiza, F., Korkala, E., Lapveteläinen, A., Peräniemi, S., von Wright, A., & Plumed-Ferrer, C. (2020). Potential of quinoa in the development of fermented spoonable vegan products. *Lwt*, *120*, 108912. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108912>
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(15), 2541–2547. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4158>