

Development of probiotics for animal production. Experiences in Cuba

Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba

Dailyn Sosa Cossio¹, Yaneisy García Hernández¹ and J.C. Dustet Mendoza²

¹*Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque.*

²*Grupo de Biotecnología Aplicada, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría", La Habana
Email: dsosa@ica.co.cu*

Probiotic additives intended for animal production has been studied for decades. This review deals, mainly, with aspects related to technological process for the development of these additives, which includes selection of strains, design of culture media, microbial growth conditions, more efficient fermentation methods and recovery of the product of interest. Information is also collected on the progress obtained in this area by several research groups in Cuba. It is considered that the development of economically feasible probiotics is indispensable because of the benefits offered by these additives for animal production. For this reason, the country should continue the studies aimed at obtaining these products and increasing work relationships between national and international institutions to strengthen research and achieve its application in livestock systems.

Key words: *microbial additive, culture media, fermentation*

INTRODUCTION

Probiotics are dietary additives, formed by live microorganisms that have a beneficial effect on the health of the host (FAO/WHO 2002). Generally, the application of these additives in animal production is related to the stabilization and protection of the gastrointestinal ecosystem, improvements in metabolic and digestive processes, as well as in the modulation of the immune system. These effects allow to increase the productive yields and, therefore, the availability and quality of milk, meat and eggs destined to the population (García *et al.* 2016). Currently, probiotics are an alternative to the use of antibiotics promoters of animal growth, since the use of the latter is limited or prohibited in many countries, due to the appearance of residual effects in food and problems of microbial resistance, associated with human and animal diseases (Blajman *et al.* 2015 and Gao *et al.* 2017).

In animal studies, microorganisms grown in the laboratory or commercial probiotics are used. The scaling from the laboratory to an industrial stage is not a trivial process, so for conceiving commercial probiotics, technologies must be designed to guarantee their development and efficiency. In this sense, the most important aspects are the adequate selection of the strain or strains, culture medium and fermentative conditions that allow obtaining a high level of viability during the process (FAO 2016). In general, in the available scientific literature, there is not abundant information

La obtención de aditivos probióticos destinados a la producción animal se ha estudiado durante décadas. Esta reseña aborda, fundamentalmente, los aspectos relacionados con el proceso tecnológico para el desarrollo de estos aditivos, que incluye selección de cepas, diseño de medios de cultivo, condiciones de crecimiento microbiano, métodos de fermentación más eficientes y recuperación del producto de interés. Se recopila además, información acerca de los avances alcanzados en esta temática por varios grupos de investigación en Cuba. Se considera que el desarrollo de probióticos económicamente factibles es indispensable por los beneficios que ofrecen estos aditivos para la producción animal. Por esta razón, el país debe continuar las investigaciones encaminadas a la obtención de estos productos e incrementar las relaciones de trabajo entre instituciones nacionales e internacionales para fortalecer las investigaciones y lograr su aplicación en los sistemas ganaderos.

Palabras clave: *aditivo microbiano, medios de cultivo, fermentación*

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son aditivos dietéticos, formados por microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso en la salud del hospedero (FAO/WHO 2002). Generalmente, la aplicación de estos aditivos en la producción animal se relaciona con la estabilización y protección del ecosistema gastrointestinal, mejoras en los procesos metabólicos y digestivos, así como en la modulación del sistema inmune. Estos efectos permiten incrementar los rendimientos productivos y por ende, la disponibilidad y calidad de leche, carne y huevos destinados a la población (García *et al.* 2016). En la actualidad, los probióticos constituyen una alternativa a la utilización de antibióticos promotores del crecimiento animal, pues el uso de estos últimos está limitado o prohibido en muchos países, debido a la aparición de efectos residuales en los alimentos y a los problemas de resistencia microbiana, asociada con enfermedades del hombre y animales (Blajman *et al.* 2015 y Gao *et al.* 2017).

En los estudios con animales se utilizan microorganismos cultivados en el laboratorio o probióticos comerciales. El escalado desde el laboratorio a una etapa industrial no es un proceso trivial, por lo que para la concepción de probióticos comerciales se deben diseñar tecnologías que garanticen su desarrollo y eficacia. En este sentido, los aspectos de mayor importancia son la selección adecuada de la cepa o cepas, el medio de cultivo y las condiciones fermentativas que permitan obtener un alto nivel de viabilidad durante el proceso (FAO 2016). De forma general, en la literatura

about the production processes of probiotics or their economic studies, perhaps because they belong to transnational companies and, sometimes, associated with research groups that do not have the publishing of these aspects among their objectives.

In Cuba, at industrial scale, there is no production of probiotics for animals although several multidisciplinary groups study this subject and have microorganisms with these characteristics. Among them, there are strains of *Lactobacillus* (Brizuela *et al.* 2001, Rondón *et al.* 2012 and García *et al.* 2016), *Bacillus* (Milián *et al.* 2014) and yeasts (García *et al.* 2012b). In addition, it should be highlighted that high prices of probiotic products in the international market make them not affordable for their application in Cuban cattle rearing.

This study synthesizes the development of probiotics intended to animal production and the achievements of their research in Cuba

TECHNOLOGICAL PROCESS FOR OBTAINING PROBIOTICS

In the technological process for the development of probiotics, fermentations constitute the essential step and should be correctly defined for reaching high productive yields. Besides, two types of processes are included, which are known as upstream and downstream (figure 1). The former comprise the selection of the microorganism or microorganisms, their growth conditions and culture medium preparation. The second covers the recovery of the product of interest through different unit operations (Soccol *et al.* 2007). Figure 1 shows the fundamental elements of each stage.

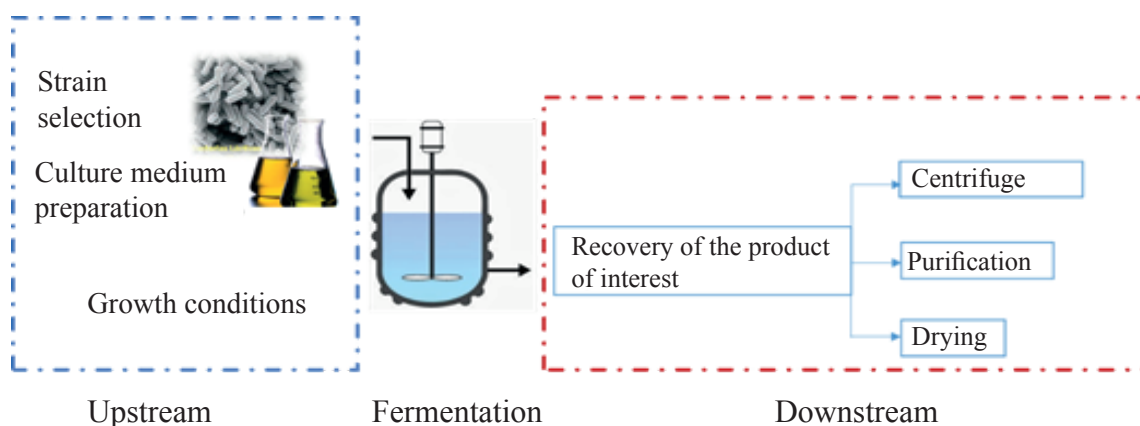


Figure 1. Technological process for obtaining a probiotic

UPSTREAM PROCESS. SELECTION OF PROBIOTIC STRAINS

The selection of microbial strain or strains is the first step towards the conception of a probiotic product. These should be Generally Recognized as Safe (GRAS) microorganisms, able to survive in the gastrointestinal tract and tolerate low pH and high

científica disponible no existe abundante información acerca de los procesos de producción de los probióticos ni de sus estudios económicos, debido quizás a que estos se encuentran en manos de empresas transnacionales y, en ocasiones, asociados a grupos de investigación que no tienen entre sus objetivos publicar estos aspectos.

En Cuba, a escala industrial, no se producen los probióticos para animales a pesar de que varios grupos multidisciplinarios de investigación trabajan en esta temática y disponen de microorganismos con estas características. Entre ellos, se encuentran cepas de *Lactobacillus* (Brizuela *et al.* 2001, Rondón *et al.* 2012 y García *et al.* 2016), *Bacillus* (Milián *et al.* 2014) y levaduras (García *et al.* 2012b). Además, se debe señalar que los altos precios de los productos probióticos en el mercado internacional los hacen incosteables para su aplicación en la ganadería cubana.

Este trabajo sintetiza los avances alcanzados en el desarrollo de probióticos destinados a la producción animal y los logros de su investigación en Cuba.

PROCESO TECNOLÓGICO PARA LA OBTENCIÓN DE PROBIÓTICOS.

En el proceso tecnológico para el desarrollo de probióticos, las fermentaciones constituyen el paso fundamental y deben estar correctamente definidas para lograr altos rendimientos productivos. Además, se incluyen dos tipos de procesos denominados, por sus nombres en inglés, upstream y downstream (figura 1). Los primeros comprenden la selección del microorganismo o microorganismos, sus condiciones de crecimiento y la preparación del medio de cultivo. Los segundos abarcan la recuperación del producto de interés mediante diferentes operaciones unitarias (Soccol *et al.* 2007). La figura 1 muestra los elementos fundamentales de cada etapa.

PROCESO UPSTREAM. SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

La selección de la cepa o cepas microbianas es el primer paso para la concepción de un producto probiótico. Estos deben ser microorganismos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y tolerar pH

concentrations of bile salts (Pintado *et al.* 2014). Other desirable characteristics are the ability of adherence of the probiotic strains to the intestinal epithelium for subsequent colonization (Endo and Gueimonde 2016), to be genetically stable microorganisms and to possess high growth rates. In addition, the chosen strain must maintain its viability and probiotic activity during the manufacturing, transport and storage processes (Dima *et al.* 2014 and Anadón *et al.* 2016). According to FAO/WHO (2002) reports, probiotics should have a minimum concentration of 10^6 - 10^7 cells mL^{-1} or g^{-1} of product to ensure its effectiveness. Likewise, other aspects should be considered, such as dose, frequency and application method, physiological state and age of the host.

The beneficial effects of probiotics do not depend on the strain origin. In fact, it is very difficult to confirm the source of a microorganism (FAO / WHO 2001). The specificity of the action depends on the strain or strains that are used in the products (Endo and Gueimonde 2016), so before its production, commercialization and application must be correctly identified, characterized *in vitro* and evaluated *in vivo*. In addition, the efficacy of probiotic preparations can be increased when more efficient strains are selected, mixtures of strains are used, genetic manipulations are carried out or when probiotics and synergistic components such as prebiotics are combined (Bomba *et al.* 2002). However, because there is no single methodology for the evaluation of probiotics, since different doses and application methods of these additives are used, inconsistent results may be obtained as there are strains with specific actions and others are multifunctional.

Taking into account the above characteristics, FAO (2016) classified probiotics into four large groups that are related and exemplified in table 1.

bajos y altas concentraciones de sales biliares (Pintado *et al.* 2014). Otras características deseables son la capacidad de adherencia de las cepas probióticas al epitelio intestinal para su posterior colonización (Endo y Gueimonde 2016), ser microorganismos estables genéticamente y poseer altas velocidades de crecimiento. Además, la cepa elegida debe mantener su viabilidad y actividad probiótica durante los procesos de fabricación, transporte y almacenamiento (Dima *et al.* 2014 y Anadón *et al.* 2016). Según informes de FAO/WHO (2002), los probióticos deben tener una concentración mínima de 10^6 - 10^7 células mL^{-1} o g^{-1} de producto para garantizar su eficacia. Asimismo, se deben considerar otros aspectos, como la dosis, frecuencia y modo de aplicación, edad y estado fisiológico del hospedero.

Los efectos benéficos de los probióticos no dependen del origen de la cepa. De hecho, es muy difícil confirmar la fuente de un microorganismo (FAO/WHO 2001). La especificidad de la acción depende de la única o varias cepas que se empleen en los productos (Endo y Gueimonde 2016), por lo que antes de su producción, comercialización y aplicación se deben identificar correctamente, caracterizar *in vitro* y evaluar *in vivo*. Además, la eficacia de los preparados probióticos se puede incrementar cuando se seleccionan cepas más eficientes, se emplean mezclas de cepas, se realizan manipulaciones genéticas o cuando se combinan probióticos y componentes sinérgicos como los prebióticos (Bomba *et al.* 2002). Sin embargo, debido a que no existe una metodología única para la evaluación de probióticos, ya que se utilizan diferentes dosis y modos de aplicación de estos aditivos, se pueden obtener resultados inconsistentes pues existen cepas con acciones específicas y otras son multifuncionales.

Al tener en cuenta las características anteriores, la FAO (2016) clasificó los probióticos en cuatro grandes grupos que se relacionan y ejemplifican en la tabla 1.

Table 1. Clasification of microorganisms used as probiotics (adapted from FAO 2016)

Classification	Examples	References
1 Bacterial	Lactobacillus y Bifidobacterium	Pedroso <i>et al.</i> (2013) and Mookiah <i>et al.</i> (2014)
Non bacterial	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shim <i>et al.</i> (2012)
2 Spore forming	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ahmed <i>et al.</i> (2014)
Non-spore forming	Lactobacillus y Bifidobacterium	Pedroso <i>et al.</i> (2013) and Mookiah <i>et al.</i> (2014)
3 Individual	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Abdel <i>et al.</i> (2012)
Multispecies	Lactobacillus, Bacillus and Streptococcus	Rahman <i>et al.</i> (2013)
4 Foreign	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bai <i>et al.</i> (2013)
Endemic	<i>Lactobacillus pentosus</i>	García <i>et al.</i> (2016)

According to Anadón *et al.* (2016), the microorganisms most commonly used as probiotics are strains of Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Enterococcus genera and yeasts. In the available scientific literature, most of the studies only take into account *in vitro* tests to demonstrate the probiotic potentials of strains.

Según Anadón *et al.* (2016), los microorganismos más utilizados como probióticos son cepas de los géneros Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Enterococcus y levaduras. En la literatura científica disponible, la mayoría de los estudios solo toman en cuenta ensayos *in vitro* para demostrar las potencialidades probióticas

Some examples of these are those developed with *Lactobacillus plantarum* (Cebeci and Gürakan 2003), *Lactobacillus acidophilus* BS and *Lactobacillus salivarius* AWH (Orłowski and Bielecka 2006), *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 (AIGburi *et al.* 2016). All these microorganisms grew at low pH and at high concentrations of bile salts, they were able to produce antimicrobial compounds and inhibit the growth of pathogenic species, which gives them potentialities as probiotics.

In animal production, a great variety of these microorganisms are obtained and evaluated in different species and animal category. In this sense, Bai *et al.* (2013) showed the stimulation of the immune system, without affecting productive yields, when they used a multispecies probiotic with *Lactobacillus fermentum* JS and *Saccharomyces cerevisiae* in concentrations of 10^7 cfu·g⁻¹ and 10^6 cfu·g⁻¹, respectively (table 2) in the diet of broilers.

de las cepas. Algunos ejemplos de estos son los desarrollados con *Lactobacillus plantarum* (Cebeci y Gürakan 2003), *Lactobacillus acidophilus* BS y *Lactobacillus salivarius* AWH (Orłowski y Bielecka 2006), *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 y *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 (AIGburi *et al.* 2016). Todos estos microorganismos crecieron a bajos pH y a altas concentraciones de sales biliares, fueron capaces de producir compuestos antimicrobianos e inhibir el crecimiento de especies patógenas, lo que les confiere potencialidades como probióticos.

En la producción animal se obtienen y evalúan gran variedad de estos microorganismos en diferentes especies y categoría animal. En este sentido, Bai *et al.* (2013) demostraron la estimulación del sistema inmune, sin afectar los rendimientos productivos, cuando utilizaron en la dieta de pollos de ceba un probiótico multispecie con *Lactobacillus fermentum* JS y *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de 10^7 ufc·g⁻¹ y 10^6 ufc·g⁻¹, respectivamente (tabla 2).

Table 2. Effect of multispecies probiotic on subpopulations of intestinal intraepithelial lymphocytes in broilers at 21 and 42 d (Bai *et al.* 2013)

	Base diet	Base diet + antibiotic	0.1 % Probiotic	0.2 % Probiotic	SE	P-value
21 d						
CD ₃₊ (%)	13.0 ^c	12.6 ^c	43.1 ^b	46.9 ^a	1.01	<0.001
CD ₄₊ (%)	0.9 ^c	1.1 ^c	5.1 ^b	6.6 ^a	0.20	<0.001
CD ₈₊ (%)	13.6 ^c	10.0 ^d	22.6 ^b	25.8 ^a	0.39	<0.001
42 d						
CD ₃₊ (%)	20.7 ^b	17.5 ^c	33.1 ^a	31.6 ^a	0.58	<0.001
CD ₄₊ (%)	1.4 ^c	1.5 ^c	4.3 ^b	5.0 ^a	0.14	<0.001
CD ₈₊ (%)	18.8 ^b	15.8 ^c	28.9 ^a	28.4 ^a	0.72	<0.001

^{a, b, c, d} Values with different letters in the same line differ at P<0.05

CD₃₊ = T cells of poultry; CD₄₊ = auxiliary T lymphocytes of poultry; CD₈₊ = cytotoxic T lymphocytes of poultry

Afsharmanesh and Sadaghi (2014) reported improvements in the productive yields of this species, as well as an increase in the relation villus height/depth of the crypt in the duodenum, by providing a probiotic strain of *Bacillus subtilis*. Ahmed *et al.* (2014) reported the benefits of including a dose of 20 g of *Bacillus amyloliquefaciens*/kg of food in the diet by increasing immunoglobulin levels and decreasing *Escherichia coli*. The results of this last study are shown in the table 3.

During the last two decades, Cuba reached important results in obtaining and evaluating probiotics with beneficial effects in digestive physiology, health and productive performance of animals. Research groups from the Institute of Animal Science (ICA, initials in Spanish), the Cuban Institute of the Sugar Cane Derivatives (ICIDCA, initials in Spanish) and the University of Matanzas Camilo Cienfuegos (UMCC) are leaders in the field with the development of joint

Afsharmanesh y Sadaghi (2014) informaron mejoras en los rendimientos productivos de esta especie animal, así como aumento de la relación altura de las vellosidades/profundidad de la cripta en el duodeno, al suministrar una cepa probiótica de *Bacillus subtilis*. Ahmed *et al.* (2014) señalaron los beneficios de incorporar en la dieta una dosis de 20 g de *Bacillus amyloliquefaciens*/kg de alimento mediante el incremento de los niveles de inmunoglobulina y la disminución de *Escherichia coli*. Los resultados de este último estudio se muestran en la tabla 3.

Durante las últimas dos décadas, Cuba obtuvo importantes resultados en la obtención y evaluación de probióticos con efectos benéficos en la fisiología digestiva, la salud y comportamiento productivo de los animales. Grupos de investigación del Instituto de Ciencia Animal (ICA), Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos (UMCC) son líderes en

Table 3. Effects of supplementation with probiotics of *Bacillus amyloliquefaciens* on serum concentration of immunoglobulins and caecal microbiota of broilers at 35 d (Ahmed *et al.* 2014)

Immunoglobulins ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (g/kg)					SE	P-value	
	0	1	5	10	20		Linear	Square
IgG	386	384	419	418	437	13.14	0.01	0.91
IgA	295	304	344	346	368	9.971	<0.0001	0.76
IgM	76.1	77.4	81.7	82.4	81.0	2.396	0.08	0.35
Microorganisms (cfu/g)								
<i>LactoBacillus spp.</i>	6.60	6.79	6.86	6.81	6.92	0.266	0.47	0.80
<i>Bacillus spp.</i>	7.22	7.64	7.31	7.56	7.88	0.307	0.29	0.78
<i>Eschericia coli</i>	7.56	7.39	6.99	6.80	6.29	0.259	0.003	0.66

studies. Most of the studies isolated, identified and characterized strains from the gastrointestinal tract of broilers and other environments. The main results of these researches in different species and animal category are reported in table 4.

Other Cuban institutions also conducted research with a mixed culture of *Lactobacillus acidophilus*

la temática con el desarrollo de estudios conjuntos. En la mayoría de los estudios se aislaron, identificaron y caracterizaron cepas del tracto gastrointestinal de pollos de ceba y otros ambientes. En la tabla se informan los principales resultados de estas investigaciones en diferentes especies y categoría animal.

Otras instituciones cubanas también realizaron

Table 4. Main results of Cuban institutions, which are leaders in obtaining and evaluating probiotic additives for animal production

Strain	Animal species and category	Beneficial action	References
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB/103-1-5 (active principle of the product known as Probid)	Pigs, broilers, laying hens and tilapia	<ul style="list-style-type: none"> · Increase of weight and mean daily gain · Reduction of diarrheas and mortality · Control of intestinal microbiota · Restriction of the development of pathogens 	Brizuela <i>et al.</i> (2001) Boucourt <i>et al.</i> (2004) García <i>et al.</i> (2012a)
<i>Lactobacillus salivarius</i> C65	Broilers and lactating pigs	<ul style="list-style-type: none"> · Increase of weight, mean daily gain and decrease of diarrheas · Beneficial effects on yield of lactating pigs 	Rondón (2009) Rondón <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> E44	Broilers, rabbits, gestating and lactating sows, lactating and growing pigs	<ul style="list-style-type: none"> · Improves in fermentative and morpho-physiological indicators · Improves in microbial balance of caecum and of the immune system · Obtaining of more vigorous piglets at weaning and reduction of mortality at this life stage · Increase of immunoglobulin concentration and of healthy pig lungs 	Milián <i>et al.</i> (2013) Milián <i>et al.</i> (2014) Pérez <i>et al.</i> (2015a) Pérez <i>et al.</i> (2015 b) Rubio (2012) Ayala <i>et al.</i> (2012a) Ayala <i>et al.</i> (2012b) Ayala <i>et al.</i> (2015a) Ayala <i>et al.</i> (2015b)
Mixture of <i>Lactobacillus salivarius</i> C65 and <i>Bacillus subtilis</i> E44	Beginning birds of B ₄ heavy pure lines	<ul style="list-style-type: none"> · Increase of liveweight, conversion and viability per bird · Decrease of mortality 	Rodríguez <i>et al.</i> (2015)
<i>Lactobacillus pentosus</i> LB-31	Broilers, rainbow trouts and growing pigs	<ul style="list-style-type: none"> · Modulation of immune system, beneficial effects on morpho-physiological, productive and health indicators on animals 	García <i>et al.</i> (2016) García and Pérez (2015) Ayala <i>et al.</i> (2014)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> LV-6	Boilers	<ul style="list-style-type: none"> · Increase of relative weight of caeca and breast yield · Improves in health indicators and response to vaccines 	García <i>et al.</i> (2012b) García <i>et al.</i> (2014)
Multispecies probiotic (<i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	Broilers, pigs and milking goats	<ul style="list-style-type: none"> · Hypocholesterolemic action · Increase of weight gain, weight relative to intestine proportions · Increase of total protein and albumin values · Reduction of diarrheas and mortality · Increase of quality and production of goat milk 	García <i>et al.</i> (2007) Ayala <i>et al.</i> (2008) Reyes <i>et al.</i> (2015)

and *Streptococcus termophilus* in growing pigs (Rodríguez *et al.* 2009), mixed culture of lactic bacteria and yeasts (Marin *et al.* 2007 and Miranda *et al.* 2017), *Lactobacillus* isolated from fermented cabbage evaluated in white shrimp (Sánchez *et al.* 2013) and strains of the same genus, native to the gastrointestinal tract of neonatal calves (Sánchez *et al.* 2015). Similarly, the mixture of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* was used in young and growing sheep (López *et al.* 2014, 2015) and in the obtaining of marine actinomycetes with probiotic action in oysters and shrimps (García 2016).

Despite the progress made in obtaining and evaluating probiotics in animals, there is little research to bring these additives to production level. Most of the studies focus on the search for new strains, and there is a gap in the development of the technological process to obtain probiotics at higher scales. This would be very important in animal feed from an economic and productive point of view.

CULTURE MEDIA FOR THE GROWTH OF PROBIOTIC STRAINS

The selection of suitable and economical culture media for industrial scale productions is an important aspect in obtaining probiotics. Generally, the culture media are selected according to the physiological characteristics of the strain of interest. However, Santos *et al.* (2016) consider that an appropriate culture medium should have peptides as nitrogen source, sugars as carbon source, yeast extract as growth factor, magnesium and manganese at optimum concentrations.

One of the most used selective media for the isolation, identification and growth of lactic acid bacteria is the De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, pH 6.2 ± 0.2), designed by De Man *et al.* (1960). According to Santos *et al.* (2016), MRS can be more selective or differential depending on the modifications made to its composition. These may include the replacement of the carbon and nitrogen source, the decrease in pH or changes in incubation conditions (temperature, time and presence of oxygen). Before the formulation of MRS, Rogosa *et al.* (1951) described another means for *Lactobacillus*. It is considered that Rogosa medium is more selective than the MRS, due to its higher acidity (pH 5.4 ± 0.2) and the presence of high concentrations of sodium acetate (17 g / L), which is an inhibitor of other lactic acid bacteria (*Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*) (Reuter 1985).

In general, cited media are widely used for probiotic strain growth at the lab in this stage. Most of researches are focused, according to the used strain, on optimization of media for the response surface methodology. However, the use of optimized media in the industry is not feasible due to the complexity of

investigaciones con un cultivo mixto de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en cerdos en crecimiento (Rodríguez *et al.* 2009), cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras (Marin *et al.* 2007 y Miranda *et al.* 2017); *Lactobacillus* aislados de col fermentada evaluados en camarón blanco (Sánchez *et al.* 2013) y cepas del mismo género, autóctonas del tracto gastrointestinal de terneros neonatos (Sánchez *et al.* 2015). De forma similar, se trabajó con la mezcla de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en crías ovinas y ovinos en crecimiento (López *et al.* 2014, 2015) y en la obtención de actinomicetos marinos con acción probiótica en ostiones y camarones (García 2016).

A pesar de los avances alcanzados en la obtención y evaluación de probióticos en animales, son escasas las investigaciones para llevar a nivel de producción estos aditivos. La mayoría de los estudios se centran en la búsqueda de nuevas cepas, y queda un vacío en el desarrollo del proceso tecnológico para la obtención de probióticos a escalas superiores. Esto resultaría de gran interés en la alimentación animal desde el punto de vista económico y productivo.

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS

La selección de medios de cultivo adecuados y económicos para las producciones a escala industrial es un aspecto importante en la obtención de probióticos. Generalmente, los medios de cultivo se seleccionan según las características fisiológicas de la cepa de interés. Aunque Santos *et al.* (2016) consideran que un medio de cultivo apropiado debe tener péptidos como fuente de nitrógeno, azúcares como fuente de carbono, extracto de levadura como factor de crecimiento, magnesio y manganeso en concentraciones óptimas.

Uno de los medios selectivos más utilizados para el aislamiento, identificación y crecimiento de bacterias ácido lácticas es el De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, pH 6.2 ± 0.2), diseñado por De Man *et al.* (1960). Según Santos *et al.* (2016), MRS puede ser más selectivo o diferencial en función de las modificaciones que se realicen a su composición. Estas pueden incluir el reemplazo de la fuente de carbono y nitrógeno, la disminución del pH o cambios en las condiciones de incubación (temperatura, tiempo y presencia de oxígeno). Antes de la formulación del MRS, Rogosa *et al.* (1951) describieron otro medio para *Lactobacillus*. Se considera que el medio Rogosa es más selectivo que el MRS, debido a su mayor acidez (pH 5.4 ± 0.2) y a la presencia de altas concentraciones de acetato de sodio (17 g/L), que es inhibidor de otras bacterias ácido lácticas (*Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) (Reuter 1985).

De forma general, los medios citados se usan ampliamente para el crecimiento de cepas probióticas a nivel de laboratorio en esta etapa. La mayoría de las investigaciones se enfocan, según la cepa que se utilice, en la optimización de los medios por la metodología de

their composition and the high prices in the market. Every time an industrial culture medium is selected, technologists consider factors like costs, capacity for production of a great number of cells and fermentation methods (Santos *et al.* 2016). It is stated that the cost of culture medium constitutes around 30 % of the total cost of fermentation (Rodrigues *et al.* 2006).

Due to the previous reasons, it is necessary to increase the efforts in the search of more economic nutrient sources for the production of probiotic biomass at superior scales. The use of agro-industrial residues, such as substrata for microbial growth, has great importance because it deals with two fundamental problems. First, it provides less expensive nitrogen and carbon sources and, therefore, production costs decrease, and second, allow the use of wastes that should be treated before their removal, adds value to these last.

According to Santos *et al.* (2016), molasses, starch, rice and wheat bran, sugar cane or casava bagasse and lignocellulosic materials are among the most used agro-industrial by-products. There are also some animal origin wastes that can be used like cheese serum, whey permeate (Aguirre *et al.* 2009), whey protein hydrolyzed (Kim *et al.* 2006) and fish and shrimp wastes (Gao *et al.* 2006). It should be taken into account that the design of these new media may vary the probiotic properties of the selected strains (Dong *et al.* 2014), as the adherence ability at the intestinal epithelium (Deepika *et al.* 2012), the production of antimicrobial substances and modulation of immune system (Santos *et al.* 2016).

In Cuba, Brizuela (2003) used a modified MRS medium, called M7, for the growth of *L. rhamnosus* LB/103-1-5. This author substituted glucose for final molasses and nitrogen sources for basic hydrolyzed of *Torula* yeast. With this new medium, results were similar to control, with values of 4.01 g/L of biomass, 0.60 h⁻¹ of maximum growth speed, 15.70 g/L of lactic acid, 34 % of biomass/substratum yield and 2.06 g/Lh⁻¹ of process productivity.

Likewise, Rondón (2009) and Milián (2009) also designed media with final molasses and an enzymatic hydrolyzed of *S. cerevisiae* yeast for the culture of *L. salivarius* C65 and *B. subtilis* E44, respectively. In each case, similar biomass values to those from the traditional medium were obtained (figures 2 and 3).

From the previous results, authors determined specific growth speed and time of biomass duplication for each strain in the evaluated media. Table 5 shows those indicators. In all cases, values were found in the proper interval for the strains to be used as probiotic additives in animal production.

Miranda *et al.* (2015) used sweet cheese serum for the growth of *L. acidophilus* and *S. thermophilus*. These authors obtained microbial concentrations in the order of 10⁸ cfu•mL⁻¹ and, from the animal performance point of

superficie de respuesta. Sin embargo, no es factible la utilización de los medios optimizados a nivel industrial por la complejidad de su composición y sus altos precios en el mercado. Cuando se elige un medio de cultivo industrial, los tecnólogos consideran factores como los costos, la capacidad de producir gran número de células y el método de fermentación (Santos *et al.* 2016). Se plantea que, aproximadamente, 30 % del costo total de la fermentación lo constituye el costo del medio de cultivo (Rodrigues *et al.* 2006).

Por las razones anteriores, es necesario empeñar esfuerzos en la búsqueda de fuentes de nutrientes más económicas para la producción de biomasa probiótica a escalas superiores. El uso de residuos agroindustriales, como sustratos para el crecimiento microbiano, tiene gran importancia, puesto que aborda dos problemas fundamentales. Suministra fuentes de carbono y nitrógeno menos costosas y, por ende, disminuye los costos de producción, y permite la utilización de desechos que deberían ser tratados antes de su eliminación, lo que le agrega valor a estos últimos.

Según Santos *et al.* (2016), entre los subproductos agroindustriales más utilizados se encuentran la miel o melaza de caña de azúcar, el almidón, el salvado de trigo y arroz, el bagazo de caña de azúcar o yuca y materiales vegetales lignocelulósicos. También se utilizan algunos desechos de origen animal, como el suero de queso, permeado de suero de leche (Aguirre *et al.* 2009), hidrolizado de proteínas de suero (Kim *et al.* 2006) y desechos de pescado y camarón (Gao *et al.* 2006). Se debe tener en cuenta que el diseño de estos nuevos medios puede variar las propiedades probióticas de las cepas seleccionadas (Dong *et al.* 2014), como la capacidad de adhesión al epitelio intestinal (Deepika *et al.* 2012), la producción de sustancias antimicrobianas y la modulación del sistema inmune (Santos *et al.* 2016).

En Cuba, Brizuela (2003) utilizó para el crecimiento de *L. rhamnosus* LB/103-1-5 un medio MRS modificado, al cual denominó M7. Este autor sustituyó la glucosa por miel final de caña de azúcar y las fuentes de nitrógeno por hidrolizado básico de levadura *Torula*. Con este nuevo medio, los resultados obtenidos fueron similares al control, con valores de 4.01 g/L de biomasa, 0.60 h⁻¹ de velocidad máxima de crecimiento, 15.70 g/L de ácido láctico, 34 % de rendimiento biomasa/sustrato y 2.06 g/Lh⁻¹ de productividad del proceso.

A su vez, Rondón (2009) y Milián (2009) también diseñaron medios con miel final y un hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* para el cultivo de *L. salivarius* C65 y *B. subtilis* E44, respectivamente. En cada caso, se obtuvieron valores de biomasa similares al medio tradicional (figuras 2 y 3).

A partir de los resultados anteriores, los autores determinaron la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de la biomasa para cada cepa en los medios evaluados. En la tabla 5 se muestran estos indicadores. En todos los casos los valores se encontraron

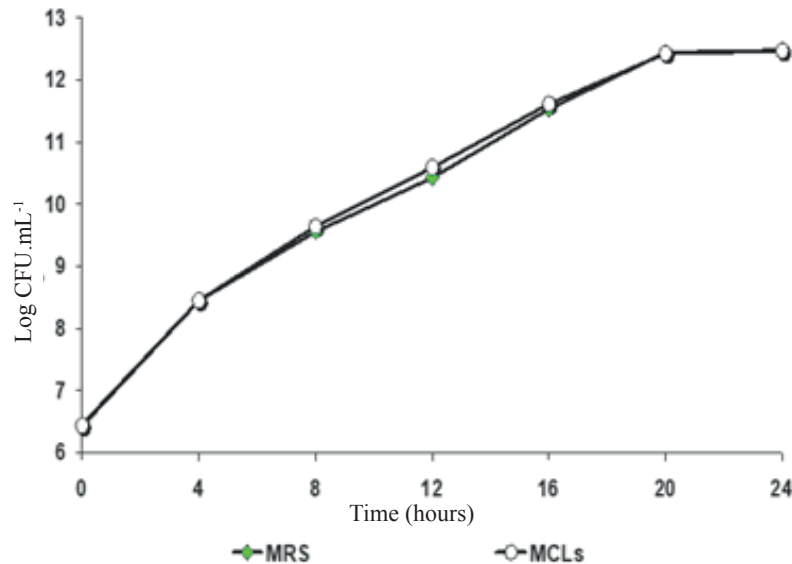


Figure 2. Growth kinetics of *L. salivarius* C65 strain in MRS cultivar media and the new designed culture medium (MCLs) (Rondón 2009)

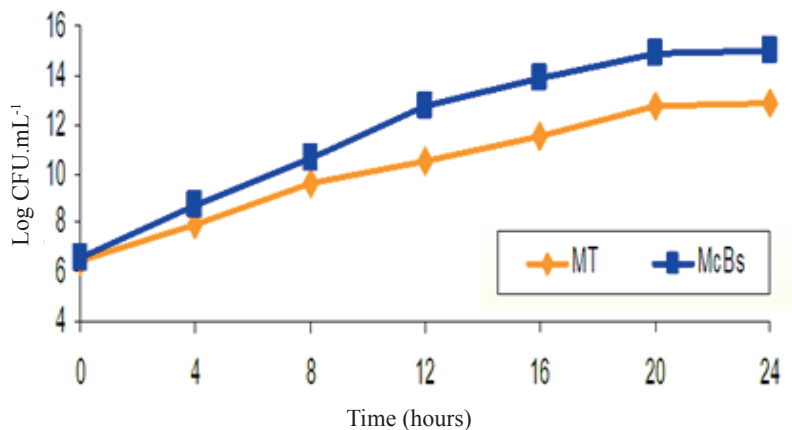


Figure 3. Performance of E44 strain in a traditional medium (TM) and in the new designed medium (McBs) for *Bacillus subtilis* (Milián 2009)

Table 5. Specific growth speed and duplication time of *L. salivarius* C65 (Rondón 2009) and *B. subtilis* E44 (Milián 2009) strains in traditional and new designed media (MCLs and McB)S

Strain	Culture media	Specific growth speed (h ⁻¹)	R ²	Duplication time (h)
<i>L. salivarius</i> C65	MRS	0.58±0.86	0.9977	1.19±0.86
	MCLs	0.60±0.93	0.9978	1.15±0.93
<i>B. subtilis</i> E44	Traditional medium	0.66±0.80	0.98	1.03±0.80
	McBs	1.00±0.90	0.98	0.68±0.90

view, daily mean gains of 292 g/d, besides a reduction of diarrhea incidence up to 1.35 % in pigs treated with this product.

All these studies reached similar biomass concentrations to those obtained in traditional culture media, which were among the values recommended for the use of these additives. From an economical point of view, non-conventional culture media allow to reduce production costs of probiotics. However, it should be pointed out that they increase the amount of impurities, so it would generate higher costs if it is necessary to purify the product of interest. Then, it is

en el intervalo adecuado para que las cepas se puedan utilizar como aditivos probióticos en la producción animal.

Miranda *et al.* (2015) utilizaron suero de queso dulce para el crecimiento de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*. Estos autores obtuvieron concentraciones microbianas en el orden de 10⁸ ufc•mL⁻¹ y, desde el punto de vista de comportamiento animal, ganancias medias diarias de 292 g/d, además de reducción de la incidencia de diarreas hasta 1.35 % en cerdos tratados con este producto.

En todos los estudios se alcanzaron concentraciones de biomasa similares a las que se obtienen en los medios de cultivos tradicionales, las que estuvieron entre los

important to perform studies benefit/cost that justify the use of culture media based on agro-industrial residues.

CONDITIONS OF MICROBIAL GROWTH

It is considered that pH, temperature, agitation speed and dissolved oxygen are the indicators that have more incidence on microbial growth (Páez *et al.* 2013) and probiotic properties (Dong *et al.* 2014). Optimal values of these factors vary with the species and microbial strain, and should be correctly defined to obtain high yields in fermentation.

One of the main reasons of growth inhibition of probiotic microorganisms is low pH of culture medium. Therefore, controlling this indicator with a base or an acid, higher biomass yields can be obtained. Another solution is to co-culture a microorganism that counteracts the acid produced during metabolism (Muller *et al.* 2009).

With regard to temperature, most fermentations require between 30 °C and 37 °C to achieve optimal growth of probiotic microorganism. This variable is controlled by the supply of heat or cooling of the fermentation system through heat exchangers such as external jacket, internal and external coil (Doran 1995).

In aerobic bioprocesses, oxygen is an essential substrate that must be continuously supplied, due to its low solubility in culture media. Among the factors that affect the concentration of oxygen dissolved in the microbial suspension are the rate of oxygen transfer from the gaseous to liquid phase, the rate at which oxygen is transported to the cells (where it is consumed) and the rate of oxygen absorption by the microorganism for growth, maintenance and production (García and Gómez 2009).

Regarding the subject that is approached, there is not abundant scientific information available from the studies carried out in Cuba. Brizuela (2003) studied, in fermenters of 5 L of total capacity, temperature influence, agitation and pH on the growth of *L. rhamnosus* LB/103-1-5. The author showed that to obtain a concentration of 10^{10} - 10^{11} cfu \cdot mL⁻¹, it was necessary to work at a temperature of 39 ± 2 °C, pH of 6.3 ± 0.3 and 300 rpm of agitation. These results allowed us to design a technological procedure to obtain a probiotic preparation with characteristics comparable to other similar products, reported in the scientific literature.

In summary, it is necessary to emphasize the importance of correctly defining the growth conditions for the new probiotic microorganisms that are obtained, since these will be different for each strain and will be the basis for future scaling studies.

FERMENTATION PROCESS

Fermentation is the most complex stage in the production of probiotics or any microbial additive.

valores recomendados para el uso de estos aditivos. Desde el punto de vista económico, los medios de cultivo no convencionales permiten reducir los costos de producción de los probióticos. Sin embargo, se debe señalar que estos aumentan la cantidad de impurezas, por lo que se generarían mayores costos si es necesario purificar el producto de interés. Surge entonces, la necesidad de realizar estudios de beneficio/costo que justifiquen el uso de medios de cultivo basados en residuos agroindustriales.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Se considera que el pH, temperatura, velocidad de agitación y oxígeno disuelto son los indicadores que más inciden en el crecimiento microbiano (Páez *et al.* 2013) y las propiedades probióticas (Dong *et al.* 2014). Los valores óptimos de estos factores varían con la especie y cepa microbiana y deben estar correctamente definidos para que se obtengan altos rendimientos en la fermentación.

Una de las principales razones de la inhibición del crecimiento de microorganismos probióticos es el bajo pH del medio de cultivo. Por eso, cuando se controla este indicador con una base o un ácido se pueden obtener mayores rendimientos de biomasa. Otra solución es co-cultivar un microorganismo que contrarreste el ácido producido durante el metabolismo (Muller *et al.* 2009).

La relación con la temperatura, la mayoría de las fermentaciones requieren entre 30 °C y 37 °C para lograr el crecimiento óptimo del microorganismo probiótico. Esta variable se controla con el suministro de calor o enfriamiento del sistema de fermentación a través de intercambiadores de calor como camisa externa, serpentín interno y externo (Doran 1995).

En los bioprosos aeróbicos, el oxígeno es un sustrato imprescindible que se tiene que suministrar continuamente, debido a su baja solubilidad en los medios de cultivo. Entre los factores que afectan la concentración del oxígeno disuelto en la suspensión microbiana se encuentran la tasa de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a líquida, la velocidad a la que el oxígeno se transporta a las células (donde se consume) y la tasa de absorción de oxígeno por el microorganismo para el crecimiento, mantenimiento y producción (García y Gómez 2009).

Respecto al tema que se aborda, no existe abundante información científica disponible de los estudios realizados en Cuba. Brizuela (2003) estudió, en fermentadores de 5 L de capacidad total, la influencia de la temperatura, la agitación y el pH en el crecimiento de *L. rhamnosus* LB/103-1-5. La autora demostró que para obtener una concentración de 10^{10} - 10^{11} ufc \cdot mL⁻¹ se debía trabajar a una temperatura de 39 ± 2 °C, pH de 6.3 ± 0.3 y 300 rpm de agitación. Estos resultados permitieron diseñar un procedimiento tecnológico para obtener un preparado probiótico con características comparables a otros productos similares, informados en la literatura científica.

En resumen, es necesario resaltar la importancia de

This stage consists on the use of the components of the culture medium to produce microbial cells in high concentration, extracellular products (for example, lactic acid), enzymes, amino acids, vitamins and other pharmaceutical compounds (FAO 2016). In addition, it can be performed in the presence or absence of oxygen, called aerobic or anaerobic fermentation, respectively (Bamforth 2005).

There are different fermentation methods for the production of probiotics at industrial level, including continuous batch and fed-batch fermentation (Alfonso *et al.* 2011). Batch processes are the most used because they are the cheapest (Muller *et al.* 2009). However, continuous and fed-batch cultures may be useful for improving yield of industrial fermentations (Doleyres *et al.* 2004).

Batch fermentations consist of mixing the substrate and the inoculum in a bioreactor and not adding or removing any component during growth. Once the desired cell concentration or the product of interest is reached, the fermentation is stopped and the process is repeated (Santos *et al.* 2016). In the case of continuous fermentation, the fresh culture medium is continuously added to the bioreactor, while the microbial cells and the metabolites produced are removed simultaneously at an identical rate (Lamboley *et al.* 1997). In this way, the continuous production of probiotic is maintained without inhibiting microbial growth. However, there is a greater risk of contamination when this technology is applied on an industrial scale (Lacroix and Yildirim 2007).

In the case of fed-batch fermentations limiting nutrients are added during growth and no component is removed until the end of the process (Muller *et al.* 2009 and Radwan *et al.* 2011). This technique increases microbial concentrations, since it allows controlling the metabolism of the strain (Thiry and Cingolani 2002). In addition, it can be used to induce a stress response to bacteria and protect them from later stages, such as downstream processes (Muller *et al.* 2009). Aguirre *et al.* (2009) showed that this process offered better yields than fed-batch fermentation to obtain probiotic biomass of *Lactobacillus casei* in goat serum permeate at 37 °C and pH 5.5 (table 6).

Other methods for obtaining probiotic biomass are fermentations in membranes and immobilized cells. According to Santos *et al.* (2016), in the former, cells are retained with an ultrafiltration or membrane microfiltration system and fresh culture medium is continuously supplied. The smaller molecules are spread through the pores of the membrane, cells are concentrated and inhibitory metabolic products are eliminated in the permeate. In these systems, there are different pressures, such as low concentration of nutrients, oxygen, mechanical and osmotic pressure that could affect the viability of the most sensitive

definir correctamente las condiciones de crecimiento para los nuevos microorganismos probióticos que se obtengan, ya que estas serán diferentes para cada cepa y serán la base para los futuros estudios de escalado.

PROCESO DE FERMENTACIÓN

La fermentación es la etapa más compleja en la producción de los probióticos o cualquier aditivo microbiano. Esta etapa consiste en la utilización de los componentes del medio de cultivo para producir células microbianas en gran concentración, productos extracelulares (por ejemplo, ácido láctico), enzimas, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos farmacéuticos (FAO 2016). Además, se puede realizar en presencia o ausencia de oxígeno, denominada fermentación aerobia o anaerobia, respectivamente (Bamforth 2005).

Existen diferentes métodos de fermentación para la producción de probióticos a nivel industrial. Entre ellos se incluyen las fermentaciones discontinuas, continuas y la alimentación incrementada (Alfonso *et al.* 2011). Los procesos discontinuos son los más utilizados, por ser los menos costosos (Muller *et al.* 2009). Sin embargo, los cultivos continuos y alimentación incrementada pueden ser útiles para mejorar el rendimiento de las fermentaciones industriales (Doleyres *et al.* 2004).

Las fermentaciones discontinuas consisten en mezclar el sustrato y el inóculo en un biorreactor y no añadir o eliminar ningún componente durante el crecimiento. Cuando se alcanza la concentración celular deseada o el producto de interés, se detiene la fermentación y se repite el proceso (Santos *et al.* 2016). En el caso de la fermentación continua, el medio de cultivo fresco se añade continuamente al biorreactor, mientras que las células microbianas y los metabolitos producidos se retiran de forma simultánea a una velocidad idéntica (Lamboley *et al.* 1997). De este modo, se mantiene la producción continua del probiótico sin que se inhiba el crecimiento microbiano. Sin embargo, existe mayor riesgo de contaminación cuando se aplica esta tecnología a escala industrial (Lacroix y Yildirim 2007).

En el caso de las fermentaciones con alimentación incrementada, se añaden los nutrientes limitantes durante el crecimiento y no se retira ningún componente hasta el final del proceso (Muller *et al.* 2009 y Radwan *et al.* 2011). Esta técnica incrementa las concentraciones microbianas, pues permite controlar el metabolismo de la cepa (Thiry y Cingolani 2002). Además, se puede utilizar para inducir una respuesta de estrés a las bacterias y protegerlas de etapas posteriores, como los procesos downstream (Muller *et al.* 2009). Aguirre *et al.* (2009) demostraron que este proceso ofrecía mejores rendimientos que la fermentación discontinua para la obtención de biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* en permeado de suero de leche de cabra a 37 °C y pH de 5,5 (tabla 6).

Otros métodos para la obtención de biomasa probiótica son las fermentaciones en membranas y de células inmovilizadas. Según Santos *et al.* (2016), en las primeras se retienen las células con un sistema de

Table 6. Process variables in two fermentation systems (batch and fed-batch) (Aguirre *et al.* 2009)

Indicator	Batch fermentation	Fed-batch fermentation
Residence time (h)	15	Cycles of 6 h
Mean productivity (g/Lh ⁻¹)	0.21±0.02	0.46±0.01
Biomass production (g/L)	3.25±0.3	3.5±0.2
Consumed substrate (g/L)	28.36±1.7	33.0
Biomass/substrate yield (g biomass/g substrate)	0.0990±0.021	0.1060±0.01
Cellular concentration (cfu/g)	5.17•10 ⁹	2.43•10 ¹⁰

microorganisms. Immobilized cell technology consists of microbial growth on solid porous supports during incubation in rich media. The formation of a region of high cellular density is obtained with this technology.

An important aspect for the conception of a commercial probiotic additive is the scaling process. At present, it is a challenge to bring laboratory-level results to an industrial scale. This is because, at higher scales, most fermentation processes provide lower yields than those obtained in the laboratory (Bylund *et al.* 2000). In general, when the scale changes, multiple difficulties appear with the design of the equipment, mass and energy transfer phenomena, pH control, temperature, aeration, agitation and sterilization of the medium. There are also important incidences, in the biological factors associated with the development of the microorganism, its probability of mutation and contamination (Helene 2004).

In the consulted scientific literature, there was not abundant information about the technologies and scaling of probiotics in Cuba. Brizuela (2003) studied the effect of scale change on the physiological, kinetic and productive parameters of the *Lactobacillus rhamnosus* strain LB/103-1-5 in a 20 L fermenter. Figure 4 shows production curves of biomass and acid that were obtained at this scale for the MRS medium and a culture medium designed from more economic sources.

membranas de ultrafiltración o microfiltración y se alimenta continuamente medio de cultivo fresco. Las moléculas más pequeñas difunden a través de los poros de la membrana, las células se concentran y los productos metabólicos inhibidores se eliminan en el permeado. En estos sistemas existen diferentes tensiones, como la baja concentración de nutrientes, oxígeno, tensiones osmóticas y mecánicas que podrían afectar la viabilidad de los microorganismos más sensibles. La tecnología de células inmovilizadas consiste en el crecimiento microbiano sobre soportes sólidos porosos durante la incubación en medios ricos. Se obtiene con esta tecnología la formación de una región de alta densidad celular.

Un aspecto importante para la concepción de un aditivo probiótico comercial es el escalado del proceso. En la actualidad, es un reto llevar los resultados de nivel de laboratorio a escala industrial. Esto se debe a que en escalas superiores, la mayoría de los procesos de fermentación brindan menor rendimiento del que se obtiene en el laboratorio (Bylund *et al.* 2000). De forma general, cuando la escala cambia aparecen múltiples dificultades con el diseño de los equipos, fenómenos de transferencia de masa y energía, control del pH, temperatura, aireación, agitación y esterilización del medio. Existen incidencias importantes además, en los factores biológicos asociados al desarrollo del microorganismo, su probabilidad de mutación y contaminación (Helene 2004).

En la literatura científica consultada no se encontró abundante información acerca de las tecnologías y escalado

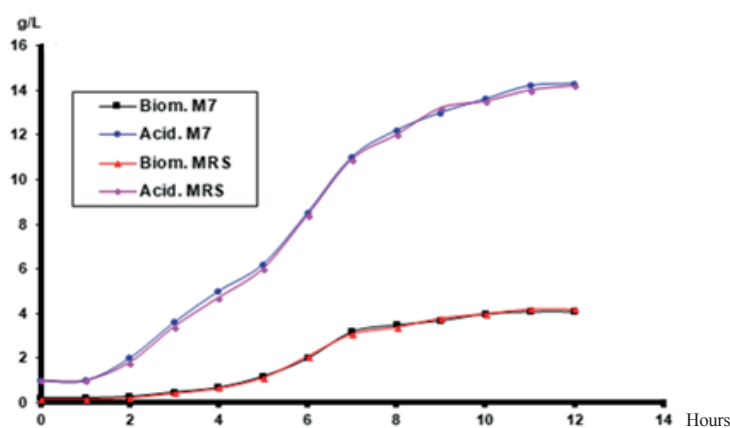


Figure 4. Curves of production of biomass and acid in a fermenter of 20 L (Brizuela 2003)

Table 7 shows values of different kinetic and productive parameters reached in these conditions.

Based on the previous results, the author pointed out that for this volume of production, there were no significant differences in the productive parameters of the microorganism. These researches demonstrate the possibilities of obtaining probiotics at national level and, with it, diminishing costs by concepts of import to the

de probióticos en Cuba. Brizuela (2003) estudió el efecto del cambio de escala en los parámetros fisiológicos, cinéticos y productivos de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 en un fermentador de 20 L. En la figura 4 se muestran las curvas de producción de biomasa y ácido que se obtuvieron a esta escala para el medio MRS y un medio de cultivo diseñado a partir de fuentes más económicas.

En la tabla 7 se muestran los valores de los diferentes

Table 7. Kinetic and productive parameters of LB/103-1-5 strain in MRS and M7 media in a fermenter of 20 L (Brizuela 2003)

Parameters	MRS medium	M7 medium
Sugar intake (g/L)	10.20	10.00
Specific growth speed (h ⁻¹)	0.507	0.472
Duplication time (h)	1.37	1.47
R ²	0.9985	0.9986
Biomass/substrate yield (%)	39.22	38.50
Productivity (g/Lh ⁻¹)	2.03	1.82

country of this type of product that has beneficial effects on animal production.

The scaling of the fermentative process is long and expensive and must be reduced, in order to shorten the time between the conception of a product and its introduction into the market. In the definition of the limits between one scale and another, there is a great diversity of criteria. The best one is selected according to the objectives and results that are pursued with each of these scales. Usually, only the laboratory, pilot plant and industrial plant stages are taken into account. In summary, the success of the scaling will be given by obtaining results that show that there is no difference between small and large scale.

DOWNSTREAM PROCESS

Downstream processes, as mentioned before, cover the recovery of the product obtained from fermentation through different unit operations. In this case, if the interest is only biomass, it can be separated by centrifugation or filtration. Then, if it is required, the product can be dried to facilitate transportation and storage.

Generally, probiotics are dried by lyophilization because it is a less aggressive method, which allows the conservation of live bacteria (Foerst 2016). Spray drying, vacuum drying and fluidized bed drying are also used (Broeckx *et al.* 2016). These latest techniques are characterized by lower costs of investment, energy, shorter times and the possibility of continuous processing (Foerst 2016). All these operations can cause stress to the probiotic strains and with it, the loss of their viability (Saarela and Mattila 2007). Therefore, it is necessary to check this indicator, after using any of the mentioned methods. Studies with Probicid product, for example, showed that spray drying was not

parámetros cinéticos y productivos alcanzados en estas condiciones.

A partir de los resultados anteriores, el autor señaló que para este volumen de producción no se apreciaron diferencias considerables en los parámetros productivos del microorganismo. Estas investigaciones demuestran las posibilidades de obtener probióticos a nivel nacional y con ello, disminuir los costos por conceptos de importación al país de este tipo de producto que tiene efectos beneficiosos en la producción animal.

El escalado del proceso fermentativo es largo y costoso y se debe reducir, con el fin de acortar el tiempo entre la concepción de un producto y su introducción en el mercado. En la definición de los límites entre una escala y otra, existe gran diversidad de criterios. El mejor se selecciona según los objetivos y resultados que se persiguen con cada una de estas escalas. Usualmente, solo se tienen en cuenta las etapas de laboratorio, planta piloto y planta industrial. En síntesis, el éxito del escalado estará dado por la obtención de resultados que muestren que no hay diferencia entre la pequeña y la gran escala.

PROCESO DOWNSTREAM

Los procesos downstream, como antes se mencionó, abarcan la recuperación del producto obtenido de la fermentación mediante diferentes operaciones unitarias. En este caso, si el interés es solo la biomasa, esta se puede separar por centrifugación o filtración. Luego, si se requiere, el producto se puede secar para facilitar su transportación y almacenamiento.

Generalmente, los probióticos se secan por liofilización por ser un método menos agresivo, que permite la conservación de bacterias vivas (Foerst 2016). También se utiliza el secado por pulverización, secado al vacío y en lecho fluidizado (Broeckx *et al.* 2016). Estas últimas técnicas se caracterizan por menores costos de

efficient, since it affected 99 % of cell viability. Thus, the authors proposed formulations of the probiotic preparation with chemical repressors of water activity (Febles *et al.* 2016).

For the above reasons, the maintenance of cell stability and viability throughout the downstream process is highly important for a successful production of probiotics. Recent studies show that microencapsulation allows the protection of probiotic cells under conditions of stress, storage and during passage through the gastrointestinal tract of animals (Eckert *et al.* 2017 and Hai *et al.* 2017).

FINAL CONSIDERATIONS

The development of probiotics for animal production is essential, due to the benefits offered by these additives. For this reason, it is vital to define the technological process, taking into account that the conditions of growth and operation of the fermentations are specific to the species and strain used.

Cuba has important contributions to knowledge in obtaining probiotic strains, although research aimed at the development of these additives, which are economically feasible to achieve their application in livestock systems, must be continued. It is also necessary to increase work relationships between national and international institutions to strengthen research and contribute to the scientific and technical progress in this area. Likewise, it would be interesting to establish national policies that prioritize and guarantee the obtaining, production and application of probiotics destined for animal production.

inversión, energía, tiempos más cortos y la posibilidad de un procesamiento continuo (Foerst 2016). Todas estas operaciones pueden causar estrés a las cepas probióticas y con ello, la pérdida de su viabilidad (Saarela y Mattila 2007). Por ello es necesario que se compruebe este indicador, después de emplear cualquiera de los métodos mencionados. Los estudios con el producto Probicid, por ejemplo, demostraron que el secado por pulverización no era eficiente, ya que afectaba 99 % de la viabilidad celular. De ahí que los autores propusieran formulaciones del preparado probiótico con represores químicos de la actividad de agua (Febles *et al.* 2016).

Por las razones anteriores, el mantenimiento de la estabilidad y viabilidad celular durante todo el proceso downstream es de gran importancia para la producción exitosa de probióticos. Estudios recientes demuestran que la microencapsulación permite la protección de las células probióticas ante condiciones de estrés, almacenamiento y durante el tránsito por el tracto gastrointestinal de los animales (Eckert *et al.* 2017 y Hai *et al.* 2017).

CONSIDERACIONES FINALES

El desarrollo de probióticos para la producción animal es indispensable, debido a los beneficios que ofrecen estos aditivos. Por esta razón, es fundamental definir el proceso tecnológico, teniendo en cuenta que las condiciones de crecimiento y de operación de las fermentaciones son específicas de la especie y la cepa que se utilice.

Cuba posee importantes aportes al conocimiento en la obtención de cepas probióticas, aunque se deben continuar las investigaciones encaminadas al desarrollo de estos aditivos, que sean económicamente factibles para lograr su aplicación en los sistemas ganaderos. También es necesario incrementar las relaciones de trabajo entre instituciones nacionales e internacionales para fortalecer las investigaciones y contribuir al avance científico-técnico en esta temática. Asimismo, resultaría de interés que se tracen políticas nacionales que prioricen y garanticen la obtención, producción y aplicación de los probióticos destinados a la producción animal.

References

- Abdel Raheem, S.M., A.R., Abd-Allah, S.M. & Hassanein, K.M. 2012. The effects of prebiotic, probiotic and synbiotic supplementation on intestinal microbial ecology and histomorphology of broiler chickens. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*. 6(4): 277-289.
- Afsharmanesh, M. & Sadaghi, B. 2014. Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*. 23(3): 717-724.
- Aguirre Ezkauriatza, E.J., Ramírez-Medrano, A., Aguilar-Yáñez, J.M. & Álvarez, M.M. 2009. Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8(1): 67-76.
- Ahmed, S.T., Islam, M.M., Mun, H.S., Sim, H.J., Kim, Y.J. & Yang, C.J. 2014. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. *Poultry Science*. 93(8): 1963-1971.
- Alfonso, D.M, Bermúdez, A., Rodríguez, F. & Carvajal, F.O. 2011. Producción de biomasa y escalamiento de microorganismos ruminales con potencial probiótico. In: Desarrollo de probióticos para ganaderías productoras de leche. Rodríguez, F. & Carvajal, F.O. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. ISBN: 978-958-740-064-9.
- AlGhuri, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E.M., Chistyakov, V.A., Mazanko, M.S., Bren, A.B., Dicks, L.M.T. & Chikindas,

- M.L. 2016. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*. 6: 432-452.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Arés, I. & Aránzazu Martínez, M. 2016. Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits. In: *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion*. Vol 1. Watson, R.R. & Preedy, V.R. King's College London, London, UK, p. 3. ISBN: 978-0-12-802189-7.
- Ayala, L., Bocourt, R., Castro, M., Martínez, M. & Herrera, M. 2015a. Effect of the probiotic additive *Bacillus subtilis* and their endospores on milk production and immune response of lactating sows. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 49(1): 71-74.
- Ayala, L., Bocourt, R., Castro, M., Milián, G., Oliva, D. & Herrera, M. 2012a. Suministro de un cultivo de *Bacillus subtilis* a cerdas gestantes. Respuesta productiva en su descendencia. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 19(4): 260-263.
- Ayala, L., Bocourt, R., Martínez, M., Castro, M. & Hernández, L. 2008. Respuesta productiva, hematológica y morfométrica de un probiótico comercial en cerdos jóvenes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 42(2): 181-184.
- Ayala, L., Bocourt, R., Milián, G., Castro, M., Herrera, M. & Guzmán, J. 2012b. Assessment of a probiotic based on *Bacillus subtilis* and its endospores in the obtainment of healthy lungs of pigs. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 46: 391-394.
- Ayala, L., García, Y., Savón, L.L., Boucourt, R., Castro, M. & Herrera, M. 2014. Evaluación de la actividad probiótica del *Lactobacillus pentosus* en indicadores de salud y productivos de cerditos destetados. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 21(3): 130-133.
- Ayala, L., Oliva, D., Boucourt, R., Castro, M., Dihigo, L., Herrera, M. & Ly, J. 2015b. Ambiente gastrointestinal en cerditos procedentes de cerdas tratadas con un probiótico antepartum y durante la lactancia. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 22(4): 217-220.
- Bai, S.P., Wu, A.M., Ding, X.M., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K.Y. & Chio, J.S. 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science*. 92: 663-670.
- Bamforth, C.W. 2005. *Food, fermentation and microorganisms*. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, United State of America. ISBN: 978-0632-05978-4.
- Blajman, J., Gaziano, C., Zbrun, M.V., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Romero, A., Signorini, M. & Frizzo L. 2015. *In vitro* and *in vivo* screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 101: 50-56.
- Bomba, A., Nemcová, R., Mudroňová, D. & Guba, P. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *TRENDS Food Science and Technology*. 13: 121-126.
- Boucourt, R., Savón, L., Díaz, J., Brizuela, M.A., Serrano, P., Prats, A. & Elías, A. 2004. Effect of the probiotic activity of *Lactobacillus rhamnosus* on productive and health indicators of piglets. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 38(1): 75-79.
- Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. PhD Thesis. La Habana. Cuba.
- Brizuela, M.A., Serrano, P. & Pérez, Y. 2001. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. *Archives of Biology and Technology*. 44 (1): 95-99.
- Broeckx, G., Vandenhuevel, D., Claes, I.J.J., Lebeer, S. & Kiekens, F. 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics* 505 (1-2): 303-318.
- Bylund F., Castan, A., Mikkola, R., Veide, A. & Larsson, G. 2000. Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. *Biotechnology and Bioengineering*. 69 (2): 119-128.
- Cebeci, A. & Gürakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*. 20: 511-518.
- De Man, J.C., Rogosa, M & Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*. 23(1): 130-135.
- Deepika, G., Karunakaran, E., Hurley, C.R., Biggs, C.A. & Charalampopoulos, D. 2012. Influence of fermentation conditions on the surface properties and adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microbial Cell Factories*. 11: 116-125.
- Dima, S., Bahrim, G.E. & Iordăchescu, G. 2014. Sources, production and microencapsulation of probiotics. In: *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health*. Ötleş, S. Taylor & Francis Group, LLC, Turkey, p. 25. ISBN: 978-1-4665-8624-6 (eBook - PDF).
- Doleyres, Y., Fliss, I. & Lacroix, C. 2004. Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*. 20(1): 145-150.
- Dong, Z., Gu, L., Zhang, J., Wang, M., Du, G., Chen J. & Li, H. 2014. Optimization for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology. *International Dairy Journal*. 34: 230-236.
- Doran P. 1995. *Bioprocess engineering principles*. 2nd Edition. Academic Press. London: Academic Press. ISBN: 0122208552. 430 p.
- Eckert, C., Garcia Serpa, V., Felipe dos Santos, A.C., Marinês da Costa, S., Dalpubel, V., Neutzling Lehn, D. & Volken de Souza, C.F. 2017. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. *LWT-Food Science and Technology*. 82: 176-183.
- Endo, A. & Gueimonde, M. 2016. Isolation, Identification and characterization of potential new probiotics. In: *Advances in Probiotic Technology*. Foerst, P. & Santivarangkna, C. Taylor & Francis Group, LLC, p. 45. ISBN: 978-1-4987-3458-5.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. *Probiotics in animal nutrition-Production, impact*

- and regulation by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30 and May 1. London Ontario, Canada. Available: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (Consulted: October 25, 2016).
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria in food. October 1-4. Cordoba, Argentina. Available on: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. (Consulted: February 2, 2017)
- Febles, D.J., Negrín, Y. & Domenech, F. 2016. Análisis preliminar del efecto de la actividad de agua sobre la viabilidad y estabilidad en formulaciones de probióticos. *Revista Centro Azúcar* 43(1).
- Foerst P. 2016. Alternative drying processes for probiotics and starter cultures. In: *Advances in Probiotic Technology*. Foerst, P. & Santivarangkna, C. Taylor & Francis Group, LLC, p. 242. ISBN: 978-1-4987-3458-5 (eBook-PDF).
- Gao, M., Hirata, M., Toorisaka, E. & Hano, T. 2006. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 97: 2414-2420.
- Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, X., Xu, J. & Zhang, H. 2017. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*. 5: 91-104.
- García, M.R. 2016. Obtención de actinomicetos marinos con acción probiótica en ostiones y camarones. PhD Thesis. Santa Clara, Cuba.
- García, F. & E. Gomez. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* 27: 153-176.
- García, Y., Boucourt, R., Acosta, A., Albelo, N. & Núñez, O. 2007. Efecto de una mezcla probiótica de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en algunos indicadores de salud y fisiológicos de pollos de ceba en el trópico. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 41(1): 71-74.
- García, Y. & Pérez, T. (2015). Obtención de microorganismos con actividad probiótica para animales monogástricos. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 5(3): 1-19.
- García, Y., Pérez, T., Boucourt, R., Balcázar, J.L., Nicoli, J.R., Moreira, J., Rodríguez Z., Fuertes H., Nuñez O., Albelo N. & Halaihel N. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*. 108: 125-132.
- García, Y., Pérez, M., García, Y., Rodríguez, B., Boucourt, R., Torres, V., Albelo, N., Núñez, O., Guzmán, J.A., Febles, M. & Noda, A.C. 2014. Probiotic effect of a strain of *Wickerhamomyces anomalus* on fattening broilers. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 48(2): 125-128.
- García, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L.R., Rosa, C.A., Nicoli, J.R., Elías, A., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R. & Halaihel, N. 2012b. Identification and *in vitro* screening of avian yeast for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*. 93: 798-802.
- García de la Cruz, M.T., Vinjoy Campa, M. & Muñoz Calderón, D.C. 2012a. Uso de PROBICID como potenciador probiótico en tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y su repercusión en la salud piscícola. *Acuacuba*. 14(1): 23-28.
- Hai Yan, C., Xiang Yi, L., Bing Jie, L. & Xiang Hong, M. 2017. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. 29: 248-255.
- Helene, B. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Bioscience and Bioengineering*. 97(6): 347-354.
- Kim, H.O., Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. & Ryu, H.W. 2006. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus sp.* RKY2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 131: 694-704.
- Lacroix, C. & Yildirim S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 18: 176-183.
- Lamboley, L., Lacroix, C., Champagne, C. & Vuilleumard, J. 1997. Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. *Biotechnology and Bioengineering*. 56(5): 502-516.
- López, Y., Arece, J., Ojeda, F. & Molina, M. 2014. Uso del probiótico Sorbifauna en el crecimiento de crías ovinas estabuladas. *Pastos y Forrajes*. 37(1): 61-64.
- López, Y., Arece, J., Ojeda, F. & Molina, M. 2015. Efecto de la inclusión en la dieta del probiótico Sorbifauna sobre el crecimiento posdestete de ovinos estabulados. *Pastos y Forrajes*. 38(2): 202-206.
- Marin Cárdenas, A., García Rodríguez, A., Marrero Suárez, L., Manso, M.J. & González Pérez, M. 2007. Estudio del efecto en lechones lactantes del probiótico de la biomasa proteica obtenida por la tecnología de cultivo de *Lactobacilli* y levaduras en miel "B". *Livestock Research for Rural Development* 19 (12).
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis. Matanzas, Cuba.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Bocourt, R., Rodríguez, Z., Ranilla, M.J., Rodríguez, M. & Carro, M.D. 2013. Evaluation of *Bacillus subtilis* biopreparations as growth promoters in chickens. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 47(1): 61-66.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Samaniego, L.M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, M.J., Carro, M.D., Rodríguez, M. & Laurencio, M. 2014. Isolation and identification of strains of *Bacillus spp.* in different ecosystems, with probiotic

- purposes, and their use in animals. Cuban Journal of Agricultural Science. 48(4): 347-351.
- Miranda Yuquilema, J.E., Marin Cárdenas, A. & Baño Ayala, D. 2017. Elaboración de un biopreparado con efecto probiótico a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras. Bionatura. 2(1): 245-247.
- Miranda, O., Fonseca, P.L., Ponce, I., Borges, M., Cutiño, M., Díaz, R.M., Miranda, M. & Ramírez, R. 2015. Evaluación de bacterias probióticas en suero de queso fermentado para la alimentación de cerdos en crecimiento. Revista Computadorizada de Producción Porcina. 22(2): 102-105.
- Mookiah, S., Sieo, C.C., Ramasamy, K., Abdullah, N. & Ho, Y. W. 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. Journal of the Science of Food and Agriculture. 94(2): 341-348.
- Muller, J.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Stanton, C. 2009. Manufacture of probiotic bacteria. In: Prebiotics and probiotics science and technology. Vol. 2. Charalampopoulos, D. & Rastall, R.A. (eds.). Springer Science+Business Media, p. 725-759. ISBN: 978-0-387-79057-2.
- Orłowski, A. & Bielecka, M. 2006. Preliminary characteristics of Lactobacillus and Bifidobacterium strains as probiotic candidates. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 15/56 (3): 269-275.
- Páez, R., Lavari, L.L., Audero, L.G., Cuatrin, L.A., Zaritzky, L.N., Reinheimer J. & Vinderola, G. 2013. Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. International Journal of Dairy Technology. 66: 155-161.
- Pedroso, A.A., Hurley-Bacon, A.L., Zedek, A.S., Kwan, T.W., Jordan, A.P.O., Avellaneda, G., Hofacre, C.L., Oakley, B.B., Collett, S.R., Maurer, J.J. & Lee, M.D. 2013. Can probiotics improve the environmental microbiome and resistome of commercial poultry production? International Journal of Environmental Research and Public Health. 10(10): 4534-4559.
- Pérez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt Salabarría, R. & Torres, V. 2015a. Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 35: 89-94.
- Pérez, Y., Milián, G., Galindo, J., Domínguez, H., Pérez, M., Portilla, Y. & Rondón, A. 2015b. Evaluación de un biopreparado a base de *Bacillus subtilis* con actividad probiótica en cerdos de las categorías de cría y preceba. Revista Electrónica de Veterinaria. 16(8): 1-13. Available: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- Pintado, M.M., Gomes, & Freitas, A.C. 2014. Probiotic bacteria: from science to consumers' benefit. In: Probiotic bacteria: fundamentals, therapy, and technological aspects. Sousa, J.P. & Freitas, A.C. Taylor & Francis Group, p. 1. ISBN: 978-981-4411-63-9.
- Radwan, H.H., Moussa, I.M. & Alsarra, I.A. 2011. Optimization of a fed-batch fermentation process for production of bleomycin by *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003. African Journal of Biotechnology. 10(9): 1690-1695.
- Rahman, M., Mustari, A., Salaudin, M. & Rahman, M. 2013. Effects of probiotics and enzymes on growth performance and haematobiochemical parameters in broilers. Journal of the Bangladesh Agricultural University. 11(1): 111-118.
- Reuter, G. 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2: 55-68.
- Reyes, J.J., Hurtado, E., Rey, S., Alfonso, F. & Noda, A. 2015. Preliminary evaluation of the Sorbial probiotic as additive for dairy goats in grazing. Cuban Journal of Agricultural Science. 49(1): 11-15.
- Rodrigues, L., Teixeira, J. & Oliveira, R. 2006. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. Biochemical Engineering Journal. 32(3): 135-142.
- Rodríguez, J.C., Carmenate, M.C., Hernández, J.E., Guerra, A., Calero, I., Álvarez, J.M., Martín, E. & Suárez, M. 2009. Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* en cerdos en crecimiento. Revista Computadorizada de Producción Porcina. 16(1): 54-58.
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt, R., Beruvidez, A. & Crespo, E. 2015. Evaluation of a probiotic mixture in the started birds feeding of heavy pure breeds B4 in a production unit. Cuban Journal of Agricultural Science. 49(4): 497-502.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. & Wisemann, R.E. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. Journal of Bacteriology. 62: 132-133.
- Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. PhD Thesis. Matanzas, Cuba.
- Rondón, A.J., Milián, G., Arteaga, F.G., Bocourt, R., Ranilla, M.J., Riaño, J., Samaniego, L.M., Rodríguez, Z., Pérez, M. & Rodríguez, M. 2012. Identification and antimicrobial activity of Lactobacillus strains of poultry origin. Cuban Journal of Agricultural Science. 46(4): 403-409.
- Rondón, A.J., Ojito, Y., Arteaga, F.G., Laurencio, M., Milián, G. & Pérez, Y. 2013. Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* C 65 on productive and health indicators of lactating piglets. Cuban Journal of Agricultural Science. 47 (4): 401-407.
- Rubio, SH. 2012. Estudio del efecto del probiótico *Bacillus subtilis* y sus endosporas en el comportamiento productivo y reproductivo de conejos de la raza Nueva Zelanda Blanco. Master Thesis. Cuba.
- Saarela, M. & Mattila-Sandholm, T. 2007. Functional microbes: Technology for health foods. In: Handbook of food products manufacturing. Vol 2. Hui, Y.H. John Wiley & Sons, Inc, United State of America, p. 67. ISBN: 978-0-470-04964-8.
- Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M. & Ferreira, C.L. 2015. Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. Revista de Salud Animal. 37(2): 94-104.
- Sánchez, I., Martín, L., García, Y., Abad, Z., Franco, R., Ramírez, Y., Zamora, J., Basulto, R., Moreira, A. & Arenal, A. 2013. Efecto de *Lactobacillus sp.* aislado de col fermentada, sobre el peso y los marcadores inmunológicos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Revista de Salud Animal. 35(2): 94-102.
- Santos, M., Tymczyszyn, E., Golowczyc, M., Mobili, P. & Gomez-Zaglia, A. 2016. Probiotic cell cultivation. In: Advances

- in Probiotic Technology. Foerst, P. & Santivarangkna, C. Taylor & Francis Group, LLC, p. 45. ISBN: 978-1-4987-3458-5 (eBook-PDF).
- Shim, Y., Ingale, S., Kim, J., Kim, K., Seo, D., Lee, S., Chae, B. & Kwon, I. 2012. A multimicrobe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science*. 53(4): 482-490.
- Soccol, C.R., Medeiros, A.B.P., Vandenberghe, L.P.S. & Woiciechowski, A.L. 2007. Flavor production by solid and liquid fermentation. In: *Handbook of food products manufacturing*. Vol. 1. Hui, Y.H. John Wiley & Sons, Inc, United State of America, p. 193. ISBN: 978-0-470-04964-8.
- Thiry, M. & Cingolani, D. 2002. Optimizing scale-up fermentation processes. *TRENDS in Biotechnology*. 20(3): 103-105.

Received: September 9, 2017