

## Solid-state fermentation of post- harvest wastes of *Solanum tuberosum* and a microbial preparation

### Fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y un preparado microbiano

L. M. Borrás<sup>1</sup>, Elaine. C. Valiño<sup>2</sup>, A. Elías<sup>2†</sup>, J. J. Martínez<sup>1</sup>, A. M. Sanabria<sup>1</sup> and Mónica. L. Becerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pedagogical and Technological University of Colombia, GIBNA research group UPTC. Avenida Central del Norte, Tunja, Boyacá, Colombia

<sup>2</sup>Animal Science Institute, ICA, Carretera Central km 47 1/2, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba  
E.mail: luis.borras@uptc.edu.co

L. M. Borrás: <https://orcid.org/0000-0002-3284-027X>

Elaine C. Valiño Cabrera: <https://orcid.org/0000-0003-4178-32>

J. J. Martínez: <http://orcid.org/0000-0002-4906-7121>

A. M. Sanabria: <https://orcid.org/0000-0002-8026-3163>

Mónica L. Becerra: <https://orcid.org/0000-0002-0275-9008>

With the objective of studying the solid -state fermentation of post - harvest wastes of *S. tuberosum* and a microbial preparation, an experiment with a completely randomized design with factorial arrangement (3x3) and three repetitions was carried out. The factors were temperature (20, 25 and 30 °C) and fermentation time (0, 24 and 48 h). Measurements of the indicators pH, ammonia, organic acids, crude fiber, crude protein and true protein, dry matter, ash and microbiological analysis were performed. The results of the microbiological analysis carried out on the fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* shows a high concentration of lactic acid bacteria (LAB) and the low pH found eliminated the pathogens agent( $p < 0.0001$ ). In the solid fermentation with the microbial preparation, low propionic acid and ammonia values were recorded at 20 °C and an increase in lactic acid ( $p < 0.0001$ ). There is a marked effect of temperature on humidity during fermentation. Low fiber and DM values were recorded. True protein increased at 24 h by 2.7 percentage units at 25 °C in correspondence with the microbial concentration of mesophilic bacteria ( $5.5 \times 10^7$  CFU/mL), LAB ( $6.1 \times 10^7$  CFU/mL) and yeasts ( $1.3 \times 10^4$  CFU/mL). It is concluded that the solid state fermentation of post- harvest wastes of *Solanum tuberosum* and a microbial preparation with lactic activity favors this process and other formulations with drying and fibrous material should be studied for an effective ensiling process of the final product.

Key words: *lactic bacteria, agro-industrial wastes, organic acids*

The solid-state fermentation is a potential technology for food production, fuel, industrial chemicals products, and pharmaceuticals products (Zhao *et al.* 2019 and Chohan *et al.* 2020). Its application offers advantages in bioprocesses such as bioleaching, bio-benefiting, and bioremediation (Romero and Vargas 2017). It is also used for the recycling of agro-industrial wastes and offers an alternative that allows, through simple technologies, to modify or alter the fermentation processes with the addition of microbial preparations rich in lactic bacteria, and with this improve the quality and safety of the process ( Elías and Herrera 2008 and

Con el objetivo de estudiar la fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y un preparado microbiano, se realizó un experimento con diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (3x3) y tres repeticiones. Los factores fueron la temperatura (20, 25 y 30 °C) y el tiempo de fermentación (0, 24 y 48 h). Se realizaron mediciones de los indicadores pH, amóniaco, ácidos orgánicos, fibra bruta, proteína bruta y verdadera, materia seca, cenizas y análisis microbiológico. Los resultados del análisis microbiológico realizado a la fermentación de residuos poscosecha de *S. tuberosum* muestra alta concentración de bacterias ácido lácticas (BAL) y el bajo pH encontrado eliminó los agentes patógenos ( $p < 0.0001$ ). En la fermentación sólida con el preparado microbiano se registraron valores bajos a los 20°C de ácido propiónico y amoniaco, y aumento del ácido láctico ( $p < 0.0001$ ). Hay marcado efecto de la temperatura en la humedad durante la fermentación. Se registraron valores bajos de fibra y MS. La proteína verdadera se incrementó a las 24 h en 2.7 unidades porcentuales a 25°C en correspondencia con la concentración microbiana de bacterias mesófilas ( $5.5 \times 10^7$  UFC/mL), BAL ( $6.1 \times 10^7$  UFC/mL) y levaduras ( $1.3 \times 10^4$  UFC/mL). Se concluye que la fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y un preparado microbiano con actividad láctica favorece este proceso y deben ser estudiadas otras formulaciones con material seco y fibroso para un proceso efectivo de ensilado del producto final.

Palabras clave: *bacterias lácticas, desechos agroindustriales, ácidos orgánicos*

La fermentación en estado sólido es una tecnología potencial para la producción de alimentos, combustibles, productos químicos industriales y productos farmacéuticos (Zhao *et al.* 2019 y Chohan *et al.* 2020). Su aplicación ofrece ventajas en bioprocésos como biolixiviación, biobeneficiación y bioremediación (Romero y Vargas 2017). Se emplea además, para el reciclaje de los residuos agroindustriales y ofrece una alternativa que permite, a través de tecnologías sencillas, modificar o alterar los procesos fermentativos con la adición de preparados microbianos ricos en bacterias lácticas, y con esto mejorar la calidad e inocuidad del

The wastes of potato (*Solanum tuberosum*) harvest are a raw matter that can be included in animal feeding. According to the Ministry of Agriculture and Rural Development (2015), it has great nutritional value since it is a rich source of protein, carbohydrates, potassium, vitamin C, other vitamins and minerals to a lesser proportion (Waglaya *et al.* 2019). These characteristics favor the fermentation processes when inoculants are added (Tamasi *et al.* 2015), so the objective of this research was to study the solid -state fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* with a microbial preparation as inoculant.

## Materials and Methods

The experiment of solid-state fermentation (SSF) was carried out under the high tropic conditions (2860 m o.s.l.), in the laboratory of biochemical and animal nutrition from Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), located in the north central avenue, Tunja-Paipa road, in Tunja municipality, Boyacá department, Colombia. It has an average temperature of 15 °C and annual average rainfalls of 553 mm.

*Experimental procedure.* A yogurt with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (LAB) (commercial freeze-dried, Liofast Y452B, SACCO ®) was prepared. This was added at 2 % and a concentration of  $0.99 \times 10^8$  CFU/mL to the microbial preparation prepared according to Borrás (2017) methodology.

For the SSF, the post-harvest wastes of the potatoes obtained commercially, clean and chopped (approximate 3x3mm particle size) were used. A 2 % of the microbial preparation, 1 % urea, 0.5 % mineral premix and 0.5 % sodium sulfate were added (modification made to the methodology proposed by Elías and Herrera. 2008). These ingredients were mixed until obtaining a homogeneous paste. They were distributed in plastic bags with 1 kg capacity. They were incubated at different temperatures 20 °C, 25 °C and 30 °C, in individual Memmert® incubators, for 48 hours. Each bag represented an experimental unit, with three repetitions each, according to the treatments. Samples at 0, 24 and 48 fermentation hours were taken.

The content of the bags of each treatment was collected in its entirety and homogenized, then 5g of sample were taken and placed in 100 mL Erlenmeyers and 45 mL of sterile distilled water were added with three repetitions. The preparation was shaken for 30 minutes on an Adams® electric shaker and subsequently the filtrate was obtained for pH measurement in an Okaton® automatic potentiometer for microbiological analysis.

The total of solids left in the bags were dried and ground in a UDY®, hammer mill with a 1 mm sieve, for chemical quantification analysis using the following

proceso (Elías y Herrera 2008 y Díaz *et al.* 2014).

Los residuos de la cosecha de la papa (*Solanum tuberosum*) son una materia prima que se puede incluir en la alimentación animal. Según el Ministerio de la Agricultura y Desarrollo Rural (2015), tiene gran valor alimenticio pues es una fuente rica en proteína, carbohidratos, potasio, vitamina C, otras vitaminas y minerales en menor proporción (Waglaya *et al.* 2019). Estas características favorecen los procesos fermentativos cuando se le adicionan inoculantes (Tamasi *et al.* 2015), por lo que el objetivo de la presente investigación fue estudiar la fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *S. tuberosum* con un preparado microbiano como inoculante.

## Materiales y Métodos

El experimento de fermentación en estado sólido (FES) se realizó en condiciones de trópico alto (2860 msnm), en el laboratorio de bioquímica y nutrición animal de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), ubicado en la avenida central del norte, vía Tunja-Paipa, en el municipio de Tunja, departamento de Boyacá, Colombia. Cuenta con una temperatura promedio de 15 °C y precipitación media anual de 553 mm.

*Procedimiento experimental.* Se elaboró un yogurt con *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (BAL) (comercial liofilizado, Liofast Y452B, SACCO ®). Este se adicionó en 2 % y concentración de  $0.99 \times 10^8$  UFC/mL al preparado microbiano elaborado según la metodología de Borrás *et al.* (2017).

Para la FES se emplearon los residuos poscosecha de las papas obtenidas comercialmente, limpios y picados (tamaño aproximado de partícula 3x3mm). Se añadió 2 % del preparado microbiano, 1% de urea, 0.5 % premezcla mineral y 0.5 % de sulfato de sodio (modificación realizada a la metodología propuesta por Elías *et al.* 2008). Estos ingredientes se mezclaron hasta obtener una pasta homogénea. Se distribuyeron en bolsas plásticas de capacidad 1 kg. Se procedió a incubarlas a diferentes temperaturas 20°C, 25°C y 30 °C, en incubadoras individuales marca Memmert®, durante 48 horas. Cada bolsa representó una unidad experimental, con tres repeticiones cada una, según los tratamientos. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas de fermentación.

El contenido de las bolsas de cada tratamiento fue recolectado en su totalidad y homogenizado, luego se tomaron 5g de muestra que se colocaron en Erlenmeyers de 100 mL y se les adicionó 45 mL de agua destilada estéril con tres repeticiones. La preparación se agitó durante 30 minutos en un agitador eléctrico marca Adams® y posteriormente se obtuvo el filtrado para medición del pH en un potenciómetro automático marca Okaton® y para el análisis microbiológico.

El total de los sólidos que quedó en las bolsas se secó y se molieron en un molino de martillo marca UDY®, con criba de 1 mm, para análisis de cuantificación química

analytical techniques: dry matter (DM), crude protein (CP), by AOAC (2005); true protein (TP) according to Berstein cited by Meir (1986) and crude fiber (CF) according to Van Soest *et al.* (1991).

The ammonia ( $\text{NH}_3$ ) was determined by the Berthelot technique (Martínez *et al.* 2003). The quantification of short chain acids (SCFA) was carried out by the method reported by Dinkci *et al.* (2007). By means of high efficiency liquid chromatography HPLC, the Gemini 5u C18 110A column (PHENOMENEX) was used, with a UV vis light detector at 214nm at room temperature (15 °C), with a mobile phase of  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  0.5 % W/V; acetonitrile 0.4 % V/V, pH was fitted to 2.24 with  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (filtered with a 0.22  $\mu\text{m}$  pore membrane, degassed by sonication and bubbling with hydrogen) and a flow of 0.5 mL/min was applied, quantified with Claritychrom software version 5.0.5.98.

The microbiological composition was determined at 0, 24 and 48h of fermentation, in a certified laboratory for the microbiological control, located in Boyacá, Colombia. For aerobic mesophiles (forming colony units per milliliter, UFC/mL) (AOAC 966.23.C: 2001), total coliforms, Most probably number (MPN) (ICMSF NMP: 2000), total and fecal coliforms (NMP), (ICMSF NMP: 2000), spores of Clostridium sulfite reductor (UFC/mL), (ISO 15213: 2003), fungi and yeasts (UFC/mL)(ISO 7954: 987), Salmonella (AS 5013.10: 2009) and lactic acid bacteria (LAB) (NTC 5034: 2002).

**Experimental design and statistical analysis.** Analysis of variance was carried out according to a completely randomized design with (3x3) factorial arrangement and three repetitions. The factors were temperature (20, 25 and 30 °C) and fermentation time (0, 24 and 48 hours) for the following indicators: pH,  $\text{NH}_3$ , SCFA, CF, CP, TP and microbial groups. Duncan's test was applied for  $P < 0.05$  when necessary. The statistical package INFOSTAT, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used for the analysis. In the case of the microorganism counts, the data did not follow the normal distribution, so they were transformed according to  $\log X$ .

## Results and discussion

Table 1 shows the interaction of the results achieved in the solid fermentation with the post-harvest wastes of *S. tuberosum* and the microbial preparation at different temperatures and fermentation times, which was designed to obtain higher protein biomass and metabolite production.

The performance of the SCFAs studied shows the absence of acetic, butyric, isovaleric and isobutyric acid and only propionic acid values were recorded at 24 and 48 h (9.34 mmol/L and 20.65 mmol/L, respectively) at a 20 °C temperature. These values are not significant to influence on the fermentation deterioration, while at this same temperature high productions of lactic acid during the process were observed. However, a temperature effect was found with notable

mediante las siguientes técnicas analíticas: materia seca (MS), proteína bruta (PB), por la AOAC (2005); proteína verdadera (PV) según Bernstein citado por Meir (1986) y la fibra bruta (FB) de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991).

El amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se determinó por la técnica de Berthelot (Martínez *et al.* 2003). La cuantificación de ácidos de cadena corta (AGCC) se realizó por el método reportado por Dinkci *et al.* (2007). Por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC se utilizó la columna Gemini 5u C18 110A (PHENOMENEX), con detector de luz UV vis a 214nm a temperatura ambiente (15 °C), con fase móvil de  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  0.5 % P/V; acetonitrilo 0.4 %V/V, se ajustó pH a 2.24 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (filtrada con membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, desgasificada por sonicación y burbujeo con hidrógeno) y se aplicó un flujo de 0.5 mL/min, se cuantificó con el software Claritychrom versión 5.0.5.98.

Se determinó la composición microbiológica a 0, 24 y 48 h de fermentación en un laboratorio certificado de Control Microbiológico ubicado en Boyacá, Colombia. Para aerobios mesófilos (unidades formadoras de colonia por mililitro, UFC/mL) (AOAC 966.23.C: 2001), coliformes totales Número más probable (NMP) (ICMSF NMP: 2000), coliformes totales y fecales (NMP), (ICMSF NMP: 2000), esporas de Clostridium Sulfito reductor (UFC/mL), (ISO 15213:2003), hongos y levaduras (UFC/mL)(ISO 7954:1987), Salmonella (AS 5013.10:2009) y bacterias ácido lácticas (NTC 5034: 2002).

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Se realizó análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (3x3) y tres repeticiones. Los factores fueron la temperatura (20, 25 y 30 °C) y el tiempo de fermentación (0, 24 y 48 horas) para los siguientes indicadores: pH,  $\text{NH}_3$ , AGCC, FB, PB, PV y grupos microbianos. Se aplicó dócima de Duncan para  $P < 0.05$  en los casos necesarios. El paquete estadístico utilizado para los análisis fue INFOSTAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). En el caso de los conteos de microorganismos, los datos no siguieron la distribución normal por lo que se transformaron según  $\log X$ .

## Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra la interacción de los resultados alcanzados en la fermentación sólida con los residuos poscosecha de *S. tuberosum* y el preparado microbiano a diferentes temperaturas y tiempos de fermentación, la que fue diseñada para obtener mayor biomasa proteica y producción de metabolitos.

El comportamiento de los AGCC estudiados muestra ausencia del ácido acético, butírico, isovalérico, isobutírico y solo se registraron valores del ácido propiónico a las 24 y 48 h de (9.34 mmol/L y 20.65 mmol/L, respectivamente) a una temperatura de 20 °C. Estos valores son despreciables para influir en el deterioro de la fermentación, mientras que a esta misma temperatura se observaron altas producciones del ácido láctico durante el proceso. Sin embargo, se encontró un efecto de la temperatura con diferencias notables a los

Table 1. Performance of pH, NH<sub>3</sub> and SCFA, in relation to temperature during 48 hours of fermentation of post-harvest wastes of *Solanum tuberosum* with the microbial preparation

Indicator	Temperature °C	Fermentation time (h)			SE±Sig
		0	24	48	
pH	20	5.70 <sup>a</sup>	5.10 <sup>b</sup>	4.51 <sup>c</sup>	0.040
	25		4.62 <sup>c</sup>	4.44 <sup>c</sup>	P<0.0001
	30		4.31 <sup>c</sup>	4.42 <sup>c</sup>	
Lactic acid mmol/L	20	16.86 <sup>a</sup>	165.64 <sup>g</sup>	160.57 <sup>f</sup>	0.003
	25		54.40 <sup>e</sup>	41.89 <sup>c</sup>	P<0.0001
	30		50.20 <sup>d</sup>	23.71 <sup>b</sup>	
Propionic acid mmol/L	20	14.33 <sup>d</sup>	9.34 <sup>c</sup>	20.65 <sup>e</sup>	0.003
	25		0.002 <sup>a</sup>	0.002 <sup>b</sup>	P<0.0001
	30		0.002 <sup>a</sup>	0.002 <sup>b</sup>	
NH <sub>3</sub> meq/L	20	1.79 <sup>a</sup>	4.19 <sup>c</sup>	5.47 <sup>f</sup>	0.003
	25		4.57 <sup>e</sup>	4.37 <sup>d</sup>	P<0.0001
	30		3.88 <sup>b</sup>	6.02 <sup>g</sup>	

<sup>a, b, c, d,d, e, f, g</sup>Means with different letters show differences to P<0.05 according Duncan (1955)

differences at 25 and 30 °C of fermentation of 118.68 and 136.86 mmol/L respectively at 48h. This could be influenced by the concentration of lactic bacteria, considering that the amount ( $0.99 \times 10^8$  CFU/mL) as a starter or accelerator culture is adequate to maintain low pH values. This result is considered important in the elaboration of strategy for biological accelerators for the fermentation processes of the post-harvest wastes of *Solanum tuberosum* and to eliminate undesirable pathogens.

Differences in the performance of pH (P <0.05) with respect to time were also observed and low pH was obtained in the three temperatures evaluated at 48h, where the low ammonia production favors the pH indicator. According to Okubo *et al.* (2018), the main objective of applying microbial preparations in post-harvest wastes, in addition to accelerating the microbial synthesis processes, is to reduce the pH faster to preserve carbohydrates and proteins (Muck *et al.* 2018), and inhibit the growth of microorganisms that could deteriorate it. Therefore, the concentration used for fermentation and in the chemical and microbiological composition of the microbial preparation was effective, according to Borrás (2017) methodology.

When there is a low pH, such as that obtained in the treatments at 24 and 48 h of fermentation, the NH<sub>3</sub> produced is retained in the substrate by the high humidity of the potato post-harvest wastes, as observed for the three studied temperatures. This performance can be attributed to the use of available sugars by some microorganisms that prevail in the product and to non-protein nitrogen in the mixture of the components to be fermented, for the formation of their cellular protoplasm.

The low NH<sub>3</sub> values coincide with that reported by

25 y 30 °C de fermentación de 118.68 y 136.86 mmol/L respectivamente a las 48h. Lo que pudiera estar influido por la concentración de bacterias lácticas, considerando que la carga ( $0.99 \times 10^8$  UFC/mL) como cultivo iniciador o acelerante es adecuada para mantener valores de pH bajos. Este resultado se considera importante en la estrategia de elaboración de acelarantes biológicos para los procesos de fermentación de los residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y para eliminar patógenos indeseables.

Se observó, también, diferencias en el comportamiento del pH (P<0.05) con respecto al tiempo y se obtuvieron pH bajos en las tres temperaturas evaluadas a las 48h, donde la baja producción de amoniaco favorece el indicador de pH. Según Okubo *et al.* (2018), el principal objetivo de aplicar preparados microbianos en desechos de poscosecha, además de acelerar los procesos de síntesis microbiana es reducir el pH más rápido para preservar los carbohidratos y proteínas (Muck *et al.* 2018), e inhibir el crecimiento de microorganismos que pudieran deteriorarlo. Por lo que, fue efectivo la concentración utilizada para la fermentación y en la composición química y microbiológica del preparado microbiano, según metodología de Borrás (2017).

Cuando se tiene un pH bajo, como el obtenido en los tratamientos a las 24 y 48 h de fermentación, el NH<sub>3</sub> producido es retenido en el sustrato por la alta humedad de los residuos poscosecha de la papa como se observa para las tres temperaturas estudiadas. Este comportamiento se puede atribuir a la utilización de los azúcares disponibles, por parte de los algunos microorganismos que prevalecen en el producto y al nitrógeno no proteico en la mezcla de los componentes a fermentar, para la formación de su protoplasma celular.

Los bajos valores de NH<sub>3</sub>, coinciden con lo reportado por Ramos *et al.* (2007) con inoculaciones del 5 % de

Ramos *et al.* (2007) with inoculations of 5 % of Vitafert, in Sacchasorgo and Sacchapulido, at a temperature of 25 °C. Nout (2014) stated that the inoculation of *S. tuberosum* wastes in the silage showed a reduction in the concentration of N-ammonia in comparison with the group without the addition of the inoculant. However, Díaz *et al.* (2014) found a different tendency where the pH initially increases at hour 8 of the process, and then slowly decreases towards the end of the fermentation (96 h) under conditions similar to those described for this preparation, but with other agro-industrial wastes that could influence on the result.

Table 2 shows the results of the performance of the chemical indicators of the post-harvest wastes of *S. tuberosum* with the microbial preparation ( $P < 0.05$ ) at different incubation temperatures.

Vitafert, en Sacchasorgo y Sacchapulido, a temperatura de 25 °C. Nout (2014) manifestó que la inoculación en desechos de *S. tuberosum* en el ensilaje, mostraron reducción en la concentración de N-amoniocal en comparación con el grupo sin la adición de inoculante. Sin embargo, Díaz *et al.* (2014) encontraron una tendencia diferente donde el pH aumenta inicialmente a la hora 8 del proceso, para luego descender lentamente hacia el final de la fermentación (96 h) en condiciones similares a las descritas para este preparado, pero con otros desechos agroindustriales que pudieron influir en el resultado.

En la tabla 2 se muestran los resultados del comportamiento de los indicadores químicos de los residuales poscosecha de *S. tuberosum* con el preparado microbiano ( $P < 0.05$ ) a diferentes temperaturas de incubación.

Table 2 Performance of the chemical indicators of the post-harvest wastes of *S. tuberosum* with the microbial preparation

Indicator (%)	Temperature (°C)	Fermentation time (h)			SE±Sign
		0	24	48	
DM	20	15.83 <sup>a</sup>	38.13 <sup>c</sup>	19.30 <sup>b</sup>	0.30
	25		39.48 <sup>c</sup>	19.18 <sup>b</sup>	P<0.0001
	30		38.59 <sup>c</sup>	17.98 <sup>b</sup>	
CP	20	15.55 <sup>ab</sup>	21.05 <sup>c</sup>	16.68 <sup>b</sup>	0.420
	25		20.83 <sup>c</sup>	14.85 <sup>a</sup>	P<0.0001
	30		20.28 <sup>c</sup>	14.84 <sup>a</sup>	
TP	20	8.84 <sup>ab</sup>	10.85 <sup>c</sup>	10.31 <sup>bc</sup>	0.480
	25		11.54 <sup>c</sup>	10.31 <sup>bc</sup>	P=0.0125
	30		7.83 <sup>a</sup>	8.24 <sup>a</sup>	
CF	20	5.08 <sup>a</sup>	8.43 <sup>ab</sup>	9.71 <sup>b</sup>	1.170
	25		8.43 <sup>ab</sup>	9.71 <sup>b</sup>	P=0.0038
	30		9.04 <sup>b</sup>	7.24 <sup>ab</sup>	
Ash	20	6.39 <sup>a</sup>	7.89 <sup>b</sup>	16.17 <sup>e</sup>	0.42
	25		8.40 <sup>b</sup>	11.01 <sup>c</sup>	P<0.0001
	30		13.94 <sup>d</sup>	6.63 <sup>a</sup>	

<sup>a, b, c, d, e</sup>Means with different letters differ to  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

The results show interaction between the studied factors ( $P < 0.0001$ ). The DM at 24 h increased to 22.3; 23.65 and 22.76 percentage units with respect to zero hours. This condition is not maintained at 48 h, due to the metabolic processes of the microorganisms, both from the microbial preparation and from the post-harvest wastes of potato, which probably caused a DM reduction in the product due to the use of sugars (sucrose, glucose, and fructose) and starch in their metabolic processes which generate water, CO<sub>2</sub> and SCFA. This DM reduction is insufficient for subsequent silage processes, therefore additives such as drying material (calcium carbonate) that do not have an inhibitory effect on microbial synthesis should be considered. Prada (2012) reported humidity values for raw potato storage between 75-76 % attributed to

Los resultados muestran interacción entre los factores estudiados ( $P < 0.0001$ ). La MS a las 24 h incrementó a 22.3; 23.65 y 22.76 unidades porcentuales con respecto a las cero horas. Esta condición no se mantiene a las 48 h, debido a los procesos metabólicos de los microorganismos tanto del preparado microbiano como de los residuales poscosecha de la papa, lo que provocó probablemente una reducción de MS en el producto por la utilización de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y almidón en sus procesos metabólicos lo que genera agua, CO<sub>2</sub> y AGCC. Esta reducción de la MS es insuficiente para los procesos posteriores de ensilado, por lo que debe valorarse aditivos como material secantes (carbonato de calcio) que no tengan efecto inhibidor en la síntesis microbiana. Prada (2012) informó valores de humedad para almacenaje de la papa cruda entre el 75-76 %

Regarding the percentage of ash in the fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* with the microbial preparation, it is considered that they have higher values than the raw potato (Cárdenas *et al.* 2008). The values found in this study depend on the nature of the soil where the tuber was grown and on the 0.5 % mineral premixture added to the substrate for fermentation (Miranda *et al.* 2018).

The mineral composition is important for the microbiota metabolism and achieving protein biomass, which is why there is an increase in CP of 5.5; 5.28 and 4.73 percentage units at 20, 25 and 30 °C, in 24 h of fermentation, respectively. However, it markedly decreased after 48 fermentation hours in the same proportion and became below the control for the highest temperatures. Fonseca and Borrás (2014) determined a value of 7.73 % of CP in the tuber; value exceeded in this study when fermenting the post-harvest wastes of *S. tuberosum* and the product fermented in 24 h at 20 °C reaches up to 21 %, this condition could be attributed to the microbial preparation with lactic acid activity as a biological accelerator. Okubo *et al.* (2018) added a raw potato protein concentrate and supplemented the protein of the silage content without inoculum and obtained favorable results.

The true protein indicator increased 2.01 and 2.7 percentage units at temperatures of 20 and 25 °C, in 24 h of fermentation. The highest ratio of (TP/CP\*100) for these temperatures was 61.2 and 69.42, respectively, at 48 h. fermentation. However, at higher temperatures, microbial synthesis is depressed in 24 h and remains unchanged at 48 h according to the control, so that the increase in 50C for these fermentation conditions limits the microbial growth and therefore could affect protein synthesis.

In this study there was an increase in fiber with respect to the fermentation time, probably due to the increase in the cell walls content, in relation to the starch of potato wastes and the fermentation of sugars by the microorganisms that developed in the system, similar results were found by Aranda *et al.* (2012). However, the values are still very low, which implies the need to combine this food with other foods high in fiber, in order to produce a better use specifically for ruminants.

Table 3 shows the results of the microbiological analysis carried out on the fermentation of the potato wastes inoculated with the microbial preparation. There is effect of temperature with respect to the fermentation time on the microbial concentrations of mesophilic bacteria, yeasts and lactic acid bacteria ( $P < 0.0001$ ). The presence of fecal coliforms, *Salmonella*, or *Clostridium* spores was not detected, a result that supports its quality to use it as a sanitary safe product for animal nutrition.

There is an increase in the concentration of

atribuido a los procesos de síntesis microbiana.

En relación con el porcentaje de cenizas en la fermentación de los residuales poscosecha de *S. tuberosum* con el preparado microbiano se considera que contiene valores más altos que la papa cruda (Cárdenas *et al.* 2008). Los valores encontrados en este estudio dependen de la naturaleza del suelo donde fue cultivado el tubérculo y al 0.5 % de premezcla mineral adicionado al sustrato para la fermentación (Miranda *et al.* 2018).

La composición mineral es importante para el metabolismo de la microbiota y lograr biomasa proteica, es por ello que se observa un incremento de la PB de 5.5; 5.28 y 4.73 unidades porcentuales a 20, 25 y 30°C, en 24 h de fermentación, respectivamente. Sin embargo, disminuyó notablemente después de 48 horas de fermentación en la misma proporción y llegó a estar por debajo del control para las temperaturas más elevadas. Fonseca y Borrás (2014) determinaron un valor de 7.73 % de PB en el tubérculo; valor superado en este estudio al fermentar los residuos poscosecha de *S. tuberosum* y llega a ser hasta del 21 % en el producto fermentado en 24 h a 20 °C, esta condición pudiera atribuirse al preparado microbiano con actividad ácido láctico como acelerante biológico. Okubo *et al.* (2018) añadieron un concentrado proteico de papa cruda y complementaron la proteína del contenido de los ensilajes sin inóculo y obtuvo resultados favorables.

El indicador de proteína verdadera incrementó 2.01 y 2.7 unidades porcentuales a temperatura de 20 y 25 °C, en 24 h de fermentación. La relación más alta de (PV/PB\*100) para estas temperaturas fue de 61.2 y 69.42, respectivamente, a las 48 h. de fermentación. Sin embargo, a mayor temperatura se deprime la síntesis microbiana en 24 h y se mantiene sin variación a las 48 h de acuerdo al control, por lo que el aumento en cinco grados Celsius para estas condiciones de fermentación limitan el crecimiento microbiano y por ende pudieran afectar la síntesis de proteína.

En el presente trabajo hubo incremento en la fibra con respecto al tiempo de fermentación debido probablemente al aumento del contenido de paredes celulares, en relación al almidón de los residuos de papa y a la fermentación de los azúcares por los microorganismos que se desarrollaron en el sistema, resultados similares fueron encontrados por Aranda *et al.* (2012). Sin embargo, los valores aún son muy bajos lo que implica la necesidad de combinar este alimento con otros altos en fibra, a fin de producir un mejor aprovechamiento específicamente para los rumiantes.

En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado a la fermentación de los residuos de la papa inoculada con el preparado microbiano. Se observa efecto de la temperatura con respecto al tiempo de fermentación en las concentraciones microbianas de bacterias mesófilas, levaduras y bacterias ácido lácticas ( $P < 0.0001$ ). No se detectó presencia de coliformes fecales, *Salmonella*, ni esporas de *Clostridium*, resultado que avala su calidad para utilizarlo como producto

Table 3. Effect of temperature on the composition of aerobic mesophilic bacteria, yeasts, lactic acid bacteria during the fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* with the microbial preparation

Microorganism (log 10 UFC/mL)	Fermentation Time(h)	Temperature (°C)			SE±Sign
		20	25	30	
Aerobic mesophilic bacteria	0	5.34 <sup>a</sup> (2.1x10 <sup>5</sup> )	5.33 <sup>a</sup> (2.1x10 <sup>5</sup> )	5.33 <sup>a</sup> (2.1x10 <sup>5</sup> )	0.02
	24	8.10e (1.2x10 <sup>8</sup> )	7.74d (5.5x10 <sup>7</sup> )	7.80d (6.3x10 <sup>7</sup> )	P<0.0001
	48	7.03b (1.0x10 <sup>7</sup> )	7.18c (1.5x10 <sup>7</sup> )	8.19f (1.4x10 <sup>8</sup> )	
Yeats	0	4.40c (2.5x10 <sup>4</sup> )	5.33d (2.5x10 <sup>4</sup> )	5.33d (2.5x10 <sup>4</sup> )	0.01
	24	4.37c (2.1x10 <sup>4</sup> )	4.11b (1.3x10 <sup>4</sup> )	4.04a (1.1x10 <sup>4</sup> )	P<0.0001
	48	5.75f (5.6x10 <sup>5</sup> )	5.74f (5.3x10 <sup>5</sup> )	5.61e (4.1x10 <sup>5</sup> )	
Lactic acid bacteria	0	5.88a (7.5x10 <sup>5</sup> )	5.88a (7.5x10 <sup>5</sup> )	6.90b (8.0x10 <sup>6</sup> )	0.02
	24	7.77f (6.1x10 <sup>7</sup> )	7.77f (6.1x10 <sup>7</sup> )	7.70e (5.0x10 <sup>7</sup> )	P<0.0001
	48	6.98c (9.5x10 <sup>6</sup> )	7.09d (1.0x10 <sup>7</sup> )	8.03g (1.0x10 <sup>8</sup> )	

<sup>a, b, c, d, e, f, g</sup>Means with different letters differ to P<0.05 (Duncan 1955)

aerobic mesophilic bacteria, which increased with fermentation temperatures. This result is related to the decrease in fermentation pH and the organic acids produced at that time as shown in table 1 and probably to bacteriocins produced by lactic acid bacteria that act as antimicrobial substances (Parra 2010 and Nkosi *et al.* 2019).

Yeasts as part of the fermentation ecosystem markedly increased with the fermentation time. There are differences in its growth with respect to the control and with respect to the studied temperatures (P <0.0001) due to the wide range of growth of this genus and the microbial interactions between the selected strains, which could coexist in stimulation relations and neutralism with LAB, similar studies that are carried out on other substrates with higher acidity (Pardo and Ferrer 2019). While other yeast research suggests that it may be possible to apply a microbial strain of direct-feeding to silage, make it survive silage, and multiply during feeding (Muck *et al.* 2018).

The concentration of LAB gradually increased until 48 h with the three temperatures under study. These increases in microbial biomass are favorable for the organic acids production which maintain low pH values and eliminate pathogenic microorganisms (Muck *et al.* 2018), indicating that the humidity of the ecosystem did not influence on the deterioration of the final fermentation.

The lactic acid bacteria used in this study are heterofermentative with medium and rapid acidification, *L. delbrueckii* ssp bulgaricus and *S. thermophilus*, were chosen as starter cultures because they were considered sanitary safe and provide aerobic stability (Munk *et al.* 2018). They are widely distributed in nature and have been isolated from various environments, for their growth they require sugars such as glucose and lactose, in addition to amino acids, vitamins and other factors (Azadnia *et al.* 2011, Mesa 2016 and Miranda *et al.* 2018), nutrients that are in the fermentation mixture.

sanitariamente seguro para la nutrición animal.

Se observa aumento de concentración de las bacterias mesófilas aerobias, las que aumentaron con las temperaturas de fermentación. Este resultado está relacionado con la disminución pH de fermentación y los ácidos orgánicos producidos en ese tiempo como se mostró en la tabla 1 y probablemente a bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas que actúan como sustancias antimicrobianas (Parra 2010 y Nkosi *et al.* 2019)

Las levaduras como parte del ecosistema de fermentación aumentaron notablemente con el tiempo de fermentación. Se observan diferencias en su crecimiento con respecto al control y con respecto a las temperaturas estudiadas (P<0,0001) debido al amplio rango de crecimiento de este género y a las interacciones microbianas entre las cepas seleccionadas, que pudieran coexistir en relaciones de estimulación y neutralismo con las BAL, estudios similares que se llevan a cabo en otros sustratos con una mayor acidez (Pardo y Ferrer 2019). Mientras que otras investigaciones con levaduras sugieren que puede ser posible aplicar una cepa microbiana de alimentación directa al ensilaje, hacer que sobreviva al ensilaje y multiplicarse durante la alimentación (Muck *et al.* 2018).

La concentración de las BAL aumentó gradualmente hasta las 48 h con las tres temperaturas en estudio. Estos incrementos en biomasa microbiana son favorables para la producción de ácidos orgánicos que mantienen los valores de pH bajos y eliminan microorganismos patógenos (Muck *et al.* 2018), lo que indica que la humedad del ecosistema no influyó en el deterioro de la fermentación final.

Las bacterias ácido lácticas que se emplearon en este estudio son heterofermentativas de mediana y rápida acidificación, *L. delbrueckii* ssp bulgaricus y *S. thermophilus*, se escogieron como cultivos iniciadores por ser consideradas sanitariamente seguras y proveen de estabilidad aeróbica (Munk *et al.* 2018). Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos ambientes, para su crecimiento requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores (Azadnia *et al.* 2011, Mesa 2016 y Miranda *et al.* 2018), nutrientes

The variables or indicators analyzed in this study (microbial concentration, protein, ammonia, SCFA, pH) as a result of the fermentation of potato post-harvest wastes determine a product with characteristics to be considered in the ruminant's feeding. These indicators are part of the quality control system with biological inoculations, however, the results in the fiber and DM show that other formulations must be studied for their effective process of obtaining the final product. The results show that the microbial preparation with lactic acid activity used acts as a biological accelerator of the solid fermentation process of potato post-harvest wastes under the established experimental conditions.

It is concluded that the solid -state fermentation of post-harvest wastes of *Solanum tuberosum* and a microbial preparation with lactic activity favors this process and other formulations with drying and fibrous material should be studied for an effective silage process of the final product.

que se encuentran en la mezcla de fermentación.

Las variables o indicadores analizados en el presente trabajo (concentración microbiana, proteína, amoníaco, AGCC, pH) como resultado de la fermentación de los residuos poscosecha de la papa determinan un producto con características para ser considerados en la alimentación del rumiante. Estos indicadores forman parte del sistema de control de la calidad con inoculaciones biológicas, sin embargo, los resultados en la fibra y MS demuestran que deben ser estudiadas otras formulaciones para su efectivo proceso de obtención del producto final. Los resultados demuestran que el preparado microbiano con actividad ácido láctico utilizado actúa como acelerante biológico del proceso de fermentación sólida de los residuos poscosecha de la papa bajo las condiciones establecidas de experimentación.

Se concluye que la fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *Solanum tuberosum* y un preparado microbiano con actividad láctica favorece este proceso y deben ser estudiadas otras formulaciones con material secano y fibroso para un proceso efectivo de ensilado del producto final.

## References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis 18th Ed. Ed. Association of Officiating Analytical Chemists. Washington D.C., U.S.A, ISBN: 978-093-5584-752.
- Aranda, E., Georgana, L., Ramos, J. & Salgado, S. 2012. "Elaboration of a feed based on the solid state fermentation of sugarcane and with different levels of zeolites". Cuban Journal of Agricultural Science, 46(2): 159-163, ISSN: 2079-3480.
- Azadnia, P., Zamani, M., Shah, G., Khalegh, M., Karimi, M. & Taarof, N. 2011. "Isolation and identification of thermophilic Lactobacillace from tradicional yoghurts of tribes of Kaserum". Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(6): 774-776, ISSN: 1680-5593.
- Borras, L.M. 2017. Obtención de un alimento por fermentación en estado sólido de residuos de poscosecha de *Solanum tuberosum* para la suplementación de rumiantes. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p.100.
- Cárdenas, J., Aranda, E., Hernández, D., Lagunes, L., Ramos, J. & Salgado, S. 2008. "Obtainment of a feed fermented in solid state from return bagasse pith, rice polishing and inocula. Its use in animal feeding". Cuban Journal of Agricultural Science, 42(2):173-176, ISSN: 2079-3480.
- Chohan, N.A., Aruwajoye, G.S., Sewsynker, S.Y., Gueguim-Kana, E.B. 2020. "Valorization of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: Process optimization and kinetic assessment 146: 1031-1040, ISSN: 0960-1481, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.042>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <<http://www.infostat.com.ar>>.
- Díaz, B., Elías, A. & Valiño E. 2014. "Consorcios microbianos con actividad ácido-láctica promisoria aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes". Revista Ciencia y Agricultura, 11(1): 17-25, ISSN: 0122-8420, DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.3484>.
- Dinkci, N., Akalin, A., Gonc, S. & Una, L. G. 2007. "Isocratic Reverse-Phase HPLC for Determination of Organic Acids in Kargı Tulum Cheese". Chromatographia, 66: 45-49, ISSN: 1612-1112, DOI: <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0234-6>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". Biometrics, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Elías, A. & Herrera, F.R. 2008. Producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de microorganismos beneficiosos activados (MEBA). Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 8-13.
- Fonseca, D. & Borrás, L. 2014. "Evaluación del efecto de la papa fresca incluida en un alimento para vacas Holstein, sobre la producción y calidad de leche. Revista Ciencia y Agricultura, 11(1): 55-65, ISSN: 2539-0899, DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.3488>.
- Martínez, F., Balciunas, E., Salgado, J., González, J., Converti, A. & Oliveira, R. 2003. "Lactic acid properties, applications and production: A review". Trends in Food Science & Technology, 30(1): 70-83, ISSN: 0924-2244, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>.
- Meir, H. 1986. Laborproktibuire. Tierernährung Und, futtermittel für Tiere Produzenten. 45: 3. Verlag, Berlin, Germany.
- Mesa, J.R. 2016. Efecto de un biopreparado de producción local a base de microorganismos eficientes sobre diferentes cultivos en la provincia de Cienfuegos. Memorias IV Convención Internacional Agrodesarrollo 2016, Varadero, Matanzas, Cuba.

- Martínez, H.J., Espinal, C.F., Salazar, M. & Barrios, C.A. 2005. La Cadena de la Papa en Colombia: Una Mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No.54. Ed. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-MINAGRICULTURA. Observatorio Agrocadenas Colombia, Bogotá, Colombia.
- Miranda, J.E., Marin, A.C., Sánchez, D.M., García, Y.H. 2018. "Obtaining, characterization and evaluation of two candidate preparations for probiotics developed with agroindustrial waste". Revista MVZ Córdoba, 23(1): 6487-6499, ISSN: 0122-0268, DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1243>.
- Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., McAllister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C. & Kung, L. 2018. "Silage review: Recent advances and future uses of silage additives". Journal of Dairy Science, 101(5): 3980–4000, ISSN: 0022-0302, DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>.
- Nkosi, B.D., Meeske, R., Muya, M.C., Langa, T., Thomas, R.S., Malebana, I.M.M., Motiang, M.D., Van Niekerk, J.A. 2019. "Microbial additives affect silage quality and ruminal dry matter degradability of avocado (*Persia americana*) pulp silage". South African Journal of Animal Science, 49(6): 997-1007, ISSN: 2221-4062, DOI: <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i6.3>.
- Nout, M.J.R. 2014. Food Technologies: Fermentation. In: Encyclopedia of Food Safety, Volume 3: Foods, Materials, Technologies and Risks. Holt, S. & Phadnis, R. (eds). Ed. Academic Press, pp.168–177, ISBN: 9780123786128, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00270-5>.
- Okubo, M., Sato, K., Matsuda, S., Masuko, T. & Souma, K. 2018. "Data on chemical compositions and fermentation quality of silages made from low-market value vegetables supplemented with potato protein concentrate a byproduct of starch production". Data in Brief, 21: 11829–1832, ISSN: 2352-3409, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.11.043>.
- Pardo, I. & Ferrer, S. 2019. Chapter 7 - Yeast-Bacteria Coinoculation. In: Red Wine Technology. Morata, A, (ed.). 1st Ed. Ed. Academic Press. Madrid, Spain, p. 99-114, ISBN: 978-0-12-814399-5, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00007-4>.
- Parra R.A. 2010. "Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos". Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 8(1): 93-105, ISSN: 1909-9959.
- Prada, R. 2012. "Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: el caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa Bogotá, 180-192". Revista EAN, (72): 182-192, ISSN: 0120-8160 .
- Romero, T. & Vargas, D. 2017. "Uso de microorganismos eficientes para tratar aguas contaminadas". Ingeniería Hidráulica y Ambiental, 38(3): 88-100, ISSN: 1680-0338.
- Tamasi, G., Cambi, M., Gaggelli, N., Autino, A., Cresti, M. & Cini, R. 2015. "The content of selected minerals and vitamin C for potatoes (*Solanum tuberosum* L.) from the high Tiber Valley area, southeast Tuscany.. Journal of Food Composition and Analysis, 41: 157–164, ISSN: 0889-1575, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.028>.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". Journal of Dairy Science, 74(10): 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Waglaya, A., Achourib, A., Karbounnea, S., Reza-Zareifardb, M., Hocineb, L. 2019. "Pilot plant extraction of potato proteins and their structural and functional properties". LWT, 113: 108275, ISSN: 0023-6438, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108275>.
- Zhao, L., Cheng, L., Deng, Y., Zhaofeng, L., Hong, Y., Li, C., Ban, X. & Gu, Z. 2019. "Study on rapid drying and spoilage prevention of potato pulp using solid-state fermentation with *Aspergillus aculeatus*". Bioresource Technology, 296: 122323, ISSN: 0960-8524, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122323>

Received: February 12, 2020

Accepted: September 8, 2020