

## Effect of calcium carbonate on solid fermentation of *Solanum tuberosum* post-harvest wastes, inoculated with a microbial preparation

### Efecto del carbonato de calcio en la fermentación sólida de residuos de poscosecha de *Solanum tuberosum*, inoculado con un preparado microbiano

L. M. Borrás<sup>1</sup>, Elaine C. Valiño<sup>2</sup>, A. Elías<sup>1,2</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>*Instituto de Ciencia Animal (ICA). Carretera Central km 47 y medio, San José de las Lajas, Apartado Postal 24*  
Email: [luis.borrás@uptc.edu.co](mailto:luis.borrás@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>

To evaluate the effect of including calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) in solid fermentation of post-harvest wastes of *Solanum tuberosum* (potato), inoculated with a microbial preparation, a completely randomized design was used, with three repetitions per treatment. Indicators pH, dry matter, crude protein, true protein and concentration of microorganisms were analyzed according to a 2x2x4 factorial arrangement, in which factors were fermentation time (24 and 48 h), incubation temperature (20 and 25 °C) and percentage of inclusion of CaCO<sub>3</sub> (0, 0.25, 0.50 and 0.75 %). For the concentration of organic acids and ammonia, a 2x2x3 factorial arrangement was used, which differed from the previous one in the percentage of CaCO<sub>3</sub> (0.25, 0.50 and 0.75 %). It was obtained that pH increased by adding CaCO<sub>3</sub> at 0.25 and 0.50 % and incubating at 20 or 25 °C. Meanwhile, pH decreased with fermentation and incubation at 20°C. Lactic acid production increased with both temperatures and during fermentation, and growth of mesophilic and lactic aerobic bacteria was favored with the inclusion of CaCO<sub>3</sub>. With fermentation, dry matter and crude and true protein percentages increased. The highest values of these indicators were obtained with 0.50% of CaCO<sub>3</sub> at 48 h (40.90, 19.09 and 13.8 %, respectively). However, protein synthesis was the same at 20 °C and 25 °C (72.76 %). It is concluded that CaCO<sub>3</sub> at 0.50% favors the fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* with the microbial preparation, at 20 °C and 24 h.

Keywords: *potato, silage, lactobacilli, additive*

Potato (*Solanum tuberosum*) contains nutritional components (energy, macronutrients and micronutrients), as well as non-nutritional components (water, cellulose, hemicellulose, pectin, glycoalkaloids, organic acids, enzymes, among other minority ones). After harvest, tubers contain 80 % water and 20 % dry matter on average. Of the latter, 60 % corresponds to starch (FAO 2015). Organic acids contribute to the characteristic pH of food, which ranges from 5.6-6.2. The most representative are malic and citric acids, as well as the chlorogenic one, which reacts with iron ions. This component and the significant amounts of

Para evaluar el efecto de incluir carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) en la fermentación sólida de residuos de poscosecha de *Solanum tuberosum* (papa), inoculado con un preparado microbiano, se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento. Los indicadores pH, materia seca, proteína bruta, proteína verdadera y concentración de microorganismos se analizaron según arreglo factorial 2x2x4, donde los factores fueron tiempo de fermentación (24 y 48 h), temperatura de incubación (20 y 25 °C) y porcentaje de inclusión de CaCO<sub>3</sub> (0; 0.25; 0.50 y 0.75%). Para la concentración de ácidos orgánicos y amoníaco, se utilizó un arreglo factorial 2x2x3, que difirió del anterior en el porcentaje de CaCO<sub>3</sub> (0.25; 0.50 y 0.75 %). Se obtuvo que el pH se incrementó al añadir CaCO<sub>3</sub> al 0.25 y 0.50 % e incubar a 20 ó 25 °C. Mientras, con la fermentación e incubación a 20 °C, el pH disminuyó. La producción de ácido láctico aumentó con ambas temperaturas y durante la fermentación, y se favoreció el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas y lácticas, al incluir CaCO<sub>3</sub>. Con la fermentación aumentó la materia seca y los porcentajes de proteína bruta y verdadera. Los mayores valores de estos indicadores se obtuvieron con 0.50 % de CaCO<sub>3</sub> a 48 h (40.90, 19.09 y 13.8 %, respectivamente). Sin embargo, la síntesis proteica fue igual para 20 °C y 25 °C (72.76 %). Se concluye que el CaCO<sub>3</sub> al 0.50 % favorece la fermentación de residuos poscosecha de *S. tuberosum* con el preparado microbiano, a 20 °C y 24 h.

Palabras clave: *papa, ensilado, lactobacilos, aditivo*

En la papa (*Solanum tuberosum*) se encuentran componentes nutritivos (energía, macronutrientes y micronutrientes), así como componentes no nutritivos (agua, celulosa, hemicelulosa, pectina, glucoalcaloides, ácidos orgánicos, enzimas, entre otros minoritarios). Luego de su cosecha, los tubérculos contienen 80 % de agua y 20 % de materia seca como promedio. De esta última, 60 % corresponde a almidón (FAO 2015). Los ácidos orgánicos contribuyen con el pH característico del alimento, que oscila entre 5.6-6.2. Los más representativos son el málico, el cítrico y el clorogénico, que reacciona con iones de hierro. Este componente y las cantidades

carbohydrates, mostly starch, and a small percentage of sugars (sucrose, fructose and glucose), propitiates a considerable decrease of pH during its fermentation process.

In post-harvest waste fermentations, pH performance is measured as a quality indicator. If this has a very low value, it limits bacterial growth (Muck *et al.* 2018), altering the chemical composition of the fermented product and ruminal synthesis in the animal (Elías *et al.* 1990 and Yang *et al.* 2015). The pH also depends on the starter culture, which are generally lactic acid bacteria (LAB). With the development of genetics, molecular biology, physiology and biochemistry, and with the discovery of the complete genome sequence of a large number of lactic acid bacteria, new knowledge and applications appeared for these bacteria and a variety of starter and protective cultures, which possess desirable properties (Bintsis 2018).

In the technological process for the development of products for animal feeding, fermentations are essential and must be correctly defined to achieve high productive yields (Sosa *et al.* 2018). According to Borrás (2017), the fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* with a microbial preparation with lactic acid activity affects microbial growth, due to the rapid decrease in pH and high humidity percentage. Therefore, the inclusion of the additive  $\text{CaCO}_3$  is suggested as acid neutralizer. The stabilizing, thickening and anticaking properties of this compound can cause a technological change and influence on the performance of some fermentative and chemical indicators of the final product.

The objective of this study was to evaluate the inclusion of  $\text{CaCO}_3$  in the kinetics of solid fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum*, inoculated with a microbial preparation with lactic activity.

### Materials and Methods

Solid-state fermentation (SSF) experiment was carried out under high tropic conditions (2,860 m.a.s.l.), in the biochemistry and animal nutrition laboratory of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), located on Avenida Central del Norte, via Tunja-Paipa, in Tunja municipality, Boyacá department, Colombia. This region has a mean temperature of 15 °C and mean annual rainfall of 553 mm.

*Experimental procedure.* A yogurt was made with active strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (commercially freeze-dried, Liofast Y452B, SACCO®), which was used as inoculum (2 % v/v and concentration of  $0.99 \times 10^8$  CFU/mL) for obtaining the microbial preparation, according to the methodology of Borrás (2017). This preparation (2 %) was mixed at room temperature ( $15 \pm 2$  °C) with urea (1%), mineral premix (0.50%), sodium sulfate (0.50 %), calcium carbonate

importantes de carbohidratos, mayoritariamente de almidón; además de un pequeño porcentaje de azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa), hacen que durante su proceso fermentativo disminuya considerablemente el pH.

En las fermentaciones de residuos de cosecha, se mide el comportamiento del pH como un indicador de calidad. Si este tiene un valor muy bajo, limita el crecimiento bacteriano (Muck *et al.* 2018), alterando la composición química del producto fermentado y la síntesis ruminal en el animal (Elías *et al.* 1990 y Yang *et al.* 2015). El pH también depende del cultivo iniciador, que son generalmente bacterias ácido lácticas (BAL). Con los avances en genética, biología molecular, fisiología y bioquímica, y con el descubrimiento de la secuencia completa del genoma de un gran número de bacterias ácido lácticas, aparecieron nuevos conocimientos y aplicaciones para dichas bacterias y una variedad de cultivos iniciadores y protectores, que poseen propiedades deseables (Bintsis 2018).

En el proceso tecnológico para el desarrollo de productos destinados a la alimentación animal, las fermentaciones son fundamentales y se deben definir correctamente para lograr altos rendimientos productivos (Sosa *et al.* 2018). Según Borrás (2017), la fermentación de residuos poscosecha de *S. tuberosum* con un preparado microbiano con actividad ácido láctica, afecta el crecimiento microbiano, por el rápido descenso del pH y el alto porcentaje de humedad, por lo que se sugiere la inclusión del aditivo  $\text{CaCO}_3$  como neutralizador de ácidos. Las propiedades estabilizantes, espesantes y antiaglomerantes de este compuesto pueden ocasionar un cambio tecnológico y en el comportamiento de algunos indicadores fermentativos y químicos del producto final.

El objetivo de este artículo fue evaluar la inclusión del  $\text{CaCO}_3$  en la cinética de fermentación sólida de residuos poscosecha de *S. tuberosum*, inoculado con un preparado microbiano con actividad láctica.

### Materiales y Métodos

El experimento de fermentación en estado sólido (FES) se realizó en las condiciones del 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. Esta región tiene una temperatura promedio de 15 °C y precipitación media anual de 553 mm.

*Procedimiento experimental.* Se elaboró un yogurt con las cepas activas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (comercial liofilizado, Liofast Y452B, SACCO®), que se empleó como inóculo (2 %, v/v y concentración de  $0.99 \times 10^8$  UFC/mL) para la obtención del preparado microbiano, según la metodología de Borrás (2017). Este preparado (2 %) se mezcló a temperatura ambiente ( $15 \pm 2$  °C) con urea (1 %), premezcla mineral (0.50 %), sulfato de sodio (0.50 %), carbonato de calcio y residuos poscosecha de

and potato post-harvest wastes, previously cleaned and chopped. The inclusion percentage of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) varied according to the experimental treatments (0, 0.25, 0.50 and 0.75 %).

Table 1 shows the composition of mixtures prepared under the mentioned conditions (0h and 15 °C). They were distributed in plastic bags, with 1 kg capacity. Each bag was considered an experimental unit, with three repetitions per treatment. They were divided into two groups and incubated at 20 and 25 °C respectively, in individual Memmert® incubators for 48 h. Samples were taken at 24 and 48 h of fermentation to determine chemical and microbiological indicators.

la papa, previamente limpios y troceados. El porcentaje de inclusión del carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) varió según los tratamientos experimentales (0, 0.25, 0.50 y 0.75 %).

En la tabla 1 se presenta la composición de las mezclas elaboradas en las condiciones citadas (0 h y 15 °C). Estas se distribuyeron en bolsas plásticas, con capacidad de 1 kg. Cada bolsa se consideró una unidad experimental, con tres repeticiones por tratamiento. Se dividieron en dos grupos y se incubaron a 20 y 25 °C respectivamente, en incubadoras individuales marca Memmert® durante 48 h. Se tomaron muestras a las 24 y 48 h de fermentación para determinar indicadores químicos y microbiológicos.

Table 1. Chemical and microbiological composition of mixtures with potato post-harvest wastes, prepared at 15 °C and without fermenting (n=3)

Indicator	Mixture with inclusion of $\text{CaCO}_3$ , %			
	0	0.25	0.50	0.75
pH	6.31	7.11	7.12	7.21
Dry matter, %	21.70	21.49	21.22	20.96
Crude protein, %	15.26	15.01	15.32	15.65
True protein, %	10.70	10.58	11.15	11.24
Lactic acid, mmol/L	16.86	16.86	16.85	16.84
Propionic acid*, mmol/L	14.33	14.33	14.32	14.31
$\text{NH}_3$ , meq/mL	1.79	1.80	1.79	1.78
Mesophilic aerobic bacteria**, CFU/mL	$2.1 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
Yeast**, CFU/mL	$2.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$
Lactic acid bacteria**, CFU/mL	$7.5 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$

\*Not significant concentrations of acetic, butyric, isovaleric and isobutyric acid

\*\* Dissolved mixtures at a rate of 1/10 (w/v) in a NaCl solution (0.85%, w/v)

Contents of the bags of each treatment (three repetitions) were collected and homogenized. Then, 5 g of sample were taken and placed in a 100 mL Erlenmeyer flask. Later, 45 mL of sterile distilled water was added. The preparation was shaken for 30 min. on an Adams® electric shaker. Subsequently, the filtrate was obtained to measure pH, concentration of organic acids, ammonia, and also perform a microbiological analysis.

Solids were dried in an oven at 60 °C and ground in a UDY® hammer mill, with a 1 mm sieve, for chemical quantification analysis. Dry matter (DM) and crude protein (CP) were determined according to AOAC (2005), and for true protein (TP), Berstein, cited by Meir (1986), was followed.

pH was measured in an Okaton® automatic potentiometer and ammonia ( $\text{NH}_3$ ) was determined by the Berthelot technique (Martínez *et al.* 2003). The quantification of short chain acids (SCFA) was performed by the method of Dinkci *et al.* (2007), by means of high pressure liquid chromatography (HPLC). For this, Gemini 5u C18 110A (PHENOMENEX) column was used, with a UV light detector at 214 nm, at room temperature (15 °C), with mobile phase of

El contenido de las bolsas de cada tratamiento (tres repeticiones) se recolectó y homogenizó. Luego, se tomaron 5 g de muestra y se colocaron en Erlenmeyer de 100 mL. Posteriormente, se les adicionó 45 mL de agua destilada estéril. La preparación se agitó durante 30 min. en un agitador eléctrico marca Adams®. Más tarde, se obtuvo el filtrado para medir pH, concentración de ácidos orgánicos, amoníaco, y además realizar el análisis microbiológico.

Los sólidos se secaron en estufa a 60 °C y se molieron en un molino de martillo, marca UDY®, con criba de 1 mm, para el análisis de cuantificación química. Para determinar la materia seca (MS) y proteína bruta (PB) se procedió según la AOAC (2005), y para proteína verdadera (PV), se siguió a Berstein, citado por Meir (1986).

El pH se midió en un potenciómetro automático marca Okaton® y el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se determinó por la técnica de Berthelot (Martínez *et al.* 2003). La cuantificación de ácidos de cadena corta (AGCC) se realizó por el método de Dinkci *et al.* (2007), por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para ello se utilizó la columna Gemini 5u C18 110A (PHENOMENEX), con detector de luz UV vis a 214 nm, a temperatura ambiente (15°C), con fase móvil

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub> 0.5% w/v and acetonitrile 0.4 % v/v. The pH was adjusted to 2.24 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (filtered with a 0.22 μm pore membrane, degassed by sonication and bubbling with hydrogen) and a flow of 0.5 mL/min was applied. It was quantified with Claritychrom program, version 5.0.5.98.

The microbiological composition of fermentation samples was determined in a certified microbiological control laboratory, located in Boyacá, Colombia. For this, a 1/10 (w/v) dilution was made and the concentrations were expressed in colony forming units per milliliter (CFU/mL). Mesophilic aerobic bacteria were determined according to AOAC (966.23.C: 2001). The ISO 15213: 2003 was applied for Clostridium spores and reducing sulfite, and ISO 7954: 1987 for fungi and yeasts. Salmonella in 25 g was determined by AS 5013.10: 2009 and lactic acid bacteria by NTC 5034: 2002. For the most probable number (MPN) of total and fecal coliforms, it was proceeded according to ICMSF MPN:2000.

*Experimental design and statistical analysis.* For indicators pH, dry matter, crude protein, true protein and count of microorganisms, a completely randomized design was used in a 2x2x4 factorial arrangement, in which factors were fermentation time (24 and 48 h), temperature incubation (20 and 25 °C) and percentage of calcium carbonate inclusion (0, 0.25, 0.50 and 0.75 %). In the concentration of organic acids and ammonia, the same design was used with 2x2x3 arrangement, in which factors fermentation time and incubation temperature were maintained with the same levels, while the inclusion percentage of calcium carbonate did not include that of 0%. For microbial counts, the methodology proposed by Herrera *et al.* (2015) was used and the theoretical assumptions of the analysis of variance were verified. For the normality of wastes, Shapiro-Wilk (1965) test was applied and Levene (1960) was used for the homogeneity of variance. Variables did not meet both assumptions, so logX transformation was used, which improved their fulfillment, so a classic analysis of variance was used. For the comparison of means, Duncan (1955) test was used for P<0.05. Data was processed in Infostat statistical package, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

## Results and Discussion

Tables 2, 3, 4 and 5 show the results of chemical and microbiological characteristics of solid fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum*, inoculated with a microbial preparation. For all indicators, interaction was detected between the factors under study (P<0.0001).

Table 2 demonstrates the effect of CaCO<sub>3</sub> on pH during solid fermentation. It could be seen that values increased by incrementing CaCO<sub>3</sub> percentage and incubating at 20 or 25 °C. However, after fermentation

de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub> 0.5 % P/V y acetonitrilo 0.4 %V/V. Se ajustó pH a 2.24 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (filtrada con membrana de 0.22 μm de poro, desgasificada por sonicación y burbujeo con hidrógeno) y se aplicó un flujo de 0.5 mL/min. Se cuantificó con el programa Claritychrom, versión 5.0.5.98.

La composición microbiológica de las muestras de fermentación se determinó en un laboratorio certificado de control microbiológico, ubicado en Boyacá, Colombia. Para esto se realizó una dilución 1/10 (p/v) y las concentraciones se expresaron en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). Las bacterias aerobias mesófilas se determinaron según AOAC (966.23.C: 2001). Para las esporas de Clostridium y sulfito reductor se aplicó ISO 15213:2003, y para hongos y levaduras ISO 7954:1987. La Salmonella en 25 g se determinó por AS 5013.10:2009 y las bacterias ácido lácticas por NTC 5034: 2002. Para el número más probable (NMP) de coliformes totales y fecales se procedió según ICMSF NMP: 2000.

*Diseño experimental y análisis estadístico.* Para los indicadores pH, materia seca, proteína bruta, proteína verdadera y conteo de microorganismos, se utilizó un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 2x2x4, donde los factores fueron tiempo de fermentación (24 y 48 h), temperatura de incubación (20 y 25 °C) y porcentaje de inclusión del carbonato de calcio (0; 0.25; 0.50 y 0.75 %). En la concentración de ácidos orgánicos y amoníaco se empleó el mismo diseño con arreglo (2x2x3), donde los factores tiempo de fermentación y temperatura de incubación se mantuvieron con los mismos niveles, mientras que el porcentaje de inclusión del carbonato de calcio no incluyó el de 0%. Para los conteos microbianos se utilizó la metodología propuesta por Herrera *et al.* (2015) y se verificaron los supuestos teóricos del análisis de varianza. Para la normalidad de los residuos se aplicó la dócima de Shapiro-Wilk (1965) y para la homogeneidad de varianza, Levene (1960). Las variables incumplieron ambos supuestos, por lo que se empleó la transformación logX, que mejoró su cumplimiento, por lo que se empleó un análisis de varianza clásico. Para la comparación de medias se utilizó la dócima de Duncan (1955) para P<0.05. Los datos se procesaron en el paquete estadístico Infostat, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

## Resultados y Discusión

En las tablas 2, 3, 4 y 5 se muestran los resultados de las características químicas y microbiológicas de la fermentación sólida de residuos poscosecha de *S. tuberosum*, inoculado con un preparado microbiano. Para todos los indicadores, se detectó interacción entre los factores en estudio (P<0.0001).

En la tabla 2 se presenta el efecto del CaCO<sub>3</sub> en el pH durante la fermentación sólida. Se pudo ver que los valores se incrementaron al aumentar el porcentaje de CaCO<sub>3</sub> e incubar a 20 o 25 °C. Sin embargo, al transcurrir la fermentación e incubar a 20 °C se observó disminución



and incubation at 20 °C, a decrease in the indicator was observed, while at 25 °C and CaCO<sub>3</sub> at 0.25 and 0.50 %, there were increases. Apparently, the inclusion of calcium carbonate had a positive impact on the fermentation process of potato wastes, and prevented a rapid decline that could be a limitation in growth and performance of present microorganisms, as well as in the stability of pH with its buffer properties.

del indicador; mientras que a 25 °C y CaCO<sub>3</sub> al 0.25 y 0.50 % hubo incrementos. Al parecer, la inclusión del carbonato de calcio tuvo incidencia positiva en el proceso fermentativo de los residuos de la papa, y evitó un descenso rápido que pudiera ser una limitación en el crecimiento y comportamiento de los microorganismos presentes, así como en la estabilidad del pH con su poder amortiguador.

Table 2. Effect of inclusion of calcium carbonate on pH during solid-state fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum*, inoculated with a microbial preparation with lactic acid activity

Indicator	Time, h	Temperature, °C	CaCO <sub>3</sub> , %				SE± p-value
			0	0.25	0.50	0.75	
pH	24	20	5.48 <sup>k</sup>	5.92 <sup>h</sup>	6.56 <sup>cd</sup>	6.66 <sup>b</sup>	0.01
		25	4.93 <sup>m</sup>	5.44 <sup>l</sup>	6.22 <sup>s</sup>	6.59 <sup>c</sup>	
	48	20	4.96 <sup>m</sup>	5.72 <sup>i</sup>	6.33 <sup>f</sup>	6.48 <sup>e</sup>	
		25	4.67 <sup>n</sup>	6.53 <sup>d</sup>	6.85 <sup>a</sup>	5.67 <sup>j</sup>	

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,l,m,n</sup> Means with different letters differ at p<0.05 (Duncan 1955)

It is considered that pH, temperature, shaking speed and dissolved oxygen are the indicators that most affect microbial growth (Páez *et al.* 2013) and functional properties (Dong *et al.* 2014). The optimal values of these factors vary with the species and microbial strain, and must be correctly defined in order to obtain high yields in fermentation. One of the main reasons for the inhibition of microorganism growth is the low pH of the culture medium. Therefore, when this indicator is controlled with a base (carbonates) or an acid (organic acids), higher biomass yields can be obtained (Miranda *et al.* 2018). The chosen strains should also maintain their viability and activity during manufacturing, transport and storage processes (Anadón *et al.* 2016). In relation to temperature, most fermentations require between 30 and 37 °C to achieve optimal growth of the microorganism with lactic activity. However, LAB mixture of the microbial preparation, as a starter culture, ranged between 20 and 25 °C, according to the experimental conditions of this study.

In the treatment without CaCO<sub>3</sub> (0%), no appreciable values of SCFA and NH<sub>3</sub> were detected (data not shown), so it was necessary to adjust the factorial design to 2x2x3. With respect to SCFA concentration, not significant values were also found, except for the treatment with 0.25 % CaCO<sub>3</sub>, incubated at 25 °C for 24 h, in which 11.29 mmol/L of propionic acid was obtained. However, there was an increase of lactic acid concentration with both incubation temperatures and the course of fermentation. This effect indicates an increase of efficiency of the fermentation process, and favors quality and conservation of the final food (Zielinska *et al.* 2017). NH<sub>3</sub> values were low in all treatments, maybe due to this lactic acid production (table 3).

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 funcionales (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 es el bajo pH del medio de cultivo. Por eso, cuando se controla este indicador con una base (carbonatos) o un ácido (ácidos orgánicos) se pueden obtener mayores rendimientos de biomasa (Miranda *et al.* 2018). Las cepas elegidas deben mantener, además, su viabilidad y actividad durante los procesos de fabricación, transporte y almacenamiento (Anadón *et al.* 2016). En relación con la temperatura, la mayoría de las fermentaciones requieren entre 30 y 37 °C para lograr el crecimiento óptimo del microorganismo con actividad láctica. Sin embargo, la mezcla de BAL del preparado microbiano, como cultivo iniciador, osciló entre 20 y 25 °C, según las condiciones experimentales de este estudio.

En el tratamiento donde no se incluyó CaCO<sub>3</sub> (0 %) no se detectaron valores apreciables de AGCC y NH<sub>3</sub> (datos no mostrados), por lo que fue necesario ajustar el diseño factorial a 2x2x3. Con respecto a la concentración de AGCC, se encontraron también valores despreciables, excepto para el tratamiento con 0.25 % de CaCO<sub>3</sub>, incubado a 25 °C por 24 h, donde se obtuvo 11.29 mmol/L de ácido propiónico. Sin embargo, hubo incremento de la concentración del ácido láctico con ambas temperaturas de incubación y el transcurso de la fermentación. Este efecto indica un aumento de la eficiencia del proceso fermentativo y favorece la calidad y conservación del alimento final (Zielinska *et al.* 2017). Los valores de NH<sub>3</sub> fueron bajos en todos los tratamientos, quizás debido a esta producción de ácido láctico (tabla 3).

Table 3. Effect of inclusion of CaCO<sub>3</sub> on organic acid production and NH<sub>3</sub> during fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum*, with a microbial preparation with lactic acid activity

Indicator	Time, h	Temperature, °C	CaCO <sub>3</sub> , %			SE± p-value
			0.25	0.50	0.75	
Lactic acid, mmol/L	24	20	00.002 <sup>k</sup>	26.02 <sup>j</sup>	35.25 <sup>h</sup>	0.003 P<0.0001
		25	42.43 <sup>f</sup>	49.00 <sup>d</sup>	31.31 <sup>i</sup>	
	48	20	39.36 <sup>g</sup>	52.33 <sup>c</sup>	56.86 <sup>a</sup>	
		25	52.90 <sup>b</sup>	48.33 <sup>e</sup>	56.86 <sup>a</sup>	
NH <sub>3</sub> meq/L	24	20	3.74 <sup>k</sup>	3.76 <sup>k</sup>	4.96 <sup>e</sup>	0.02 P<0.0001
		25	4.53 <sup>g</sup>	4.80 <sup>f</sup>	6.55 <sup>a</sup>	
	48	20	5.35 <sup>c</sup>	5.24 <sup>d</sup>	3.82 <sup>j</sup>	
		25	4.37 <sup>h</sup>	6.14 <sup>b</sup>	4.17 <sup>i</sup>	

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k Means with different letters differ at p<0.05 (Duncan 1955)

Results indicate that the use of the microbial mixture, of medium and rapid lactic fermentation, in potato post-harvest wastes and CaCO<sub>3</sub> additive maintain favorable conditions for the production of organic acids, mainly lactic acid. According to Muck *et al.* (2018), *Lactobacillus buchneri* is the dominant species used in silage additives with BAL, obligate heterofermentative. It slowly converts lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol during storage in the silo, improving aerobic stability, without affecting animal productivity. However, these studies are not sufficient to determine the effects it could have on animals.

Table 4 shows the results of the microbiological analysis carried out on the fermentation of potato wastes, inoculated with the microbial preparation. By including calcium carbonate in the mixture, concentration of aerobic bacteria increased with respect to control (0 %). The highest concentration was found with 0.25 % carbonate and incubation at 20 °C for 48 h. No defined performance was observed with respect to factors time, temperature and percentage of CaCO<sub>3</sub>. This result does not appear to be related to the effect of the additive or to the produced lactic acid, but rather to growth inhibition during fermentation and to the humidity of the system. Han *et al.* (2013) stated that the addition of CaCO<sub>3</sub> in fermentations with bacteria increases their growth. In addition, it increases the levels of sugar transporting proteins and of proteins involved in the synthesis, repair, recombination and replication of DNA. Tian *et al.* (2015) obtained results with the inclusion of CaCO<sub>3</sub> in the fermentation of sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* and in the degradation of this substrate. They also verified its stimulating effect on biohydrogen production.

LABs, like mesophilic bacteria, increased their concentration compared to control, and a maximum of 1.7x10<sup>8</sup> CFU/mL (8.24 log CFU/mL) was obtained with 0.50 % CaCO<sub>3</sub> in 48 h of fermentation at 25 °C. However, they maintained concentrations of 10<sup>7</sup> CFU/mL at the

Los resultados indican que el uso de la mezcla microbiana, de mediana y rápida fermentación láctica, en los desechos poscosecha de la papa y el aditivo CaCO<sub>3</sub> mantienen las condiciones favorables para la producción de ácidos orgánicos, fundamentalmente láctico. Según Muck *et al.* (2018), *Lactobacillus buchneri* es la especie dominante utilizada en aditivos de ensilaje con BAL, heterofermentativos obligados. Convierte lentamente el ácido láctico en ácido acético y 1,2-propanediol durante el almacenamiento en el silo, lo que mejora la estabilidad aeróbica, sin afectar la productividad animal. No obstante, estas investigaciones no son suficientes para determinar los efectos que pudiera tener en los animales.

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado a la fermentación de los residuos de la papa, inoculada con el preparado microbiano. Al incluir carbonato de calcio en la mezcla, aumentó la concentración de bacterias aerobias con respecto al control (0 %). La mayor concentración se encontró con 0.25 % de carbonato e incubación a 20 °C durante 48 h. No se observó un comportamiento definido con respecto a los factores tiempo, temperatura y porcentaje de CaCO<sub>3</sub>. Este resultado no parece estar relacionado con el efecto del aditivo ni con el ácido láctico producido, sino con la inhibición del crecimiento durante la fermentación y con la humedad del sistema. Han *et al.* (2013) comprobaron que la adición de CaCO<sub>3</sub> en fermentaciones con bacterias incrementa el crecimiento de estas. Además, aumenta los niveles de proteínas transportadoras de azúcar y de proteínas involucradas en la síntesis, reparación, recombinação y replicación del ADN. Tian *et al.* (2015) obtuvieron resultados con la inclusión de CaCO<sub>3</sub> en la fermentación del bagazo de caña de azúcar por *Clostridium thermocellum* y en la degradación de este sustrato. Comprobaron, además, su efecto estimulador en la producción de biohidrógeno.

Las BAL, al igual que las bacterias mesófilas, incrementaron su concentración con respecto al control, y se obtuvo un máximo de 1.7x10<sup>8</sup> UFC/mL (8.24 log UFC/mL) con 0.50 % de CaCO<sub>3</sub> en 48 h de fermentación a 25 °C. Sin embargo, mantuvieron concentraciones de 10<sup>7</sup> UFC/mL a las dos temperaturas

two evaluated temperatures, which indicated that the inoculum, added to the microbial preparation with heterofermentative lactic bacteria, produced lactic acid in the initial period of fermentation with a decrease of pH, regardless of temperature and percentage of inclusion of carbonate as an additive. This condition causes the suppression of enterobacteria, clostridia and other microorganisms, thus reducing DM losses due to proteolysis and fermentation. According to Okubo *et al.* (2018), in the active fermentation period, it is expected that pH will decrease more quickly, and to a lower value compared to an untreated or not inoculated silage, which improves protein preservation during this process.

In fermented mixtures, yeasts are in a lower proportion in relation to aerobic and lactic bacteria. At 24 h, yeast concentrations decreased with the inclusion of carbonate, without the influence of temperature. However, higher values were found for these populations at 48 h. These results may be associated with the physical-chemical components of the used sources and fermentation conditions. Yeasts appear to take longer to establish and grow in these environments, as well as in synergy with bacteria. According to Miranda *et al.* (2018), agroindustrial by-products (molasses, whey, soy milk and vinasse) are available sources that can be efficiently used for growth and development of microorganisms with functional activity of their metabolites. However, the combination of *Lactobacillus plantarum* and molasses has been demonstrated to cause a decrease of yeasts in silage as well as in ruminal fermentation (Zhao *et al.* 2019). Studies by Marrero *et al.* (2015) report that yeasts, as efficient microorganisms in the ruminal environment, tolerate a pH range between 3 and 10, but prefer a slightly acidic medium with the addition of C molasses, as a rich source of easily fermented carbohydrates. This corresponds to the values obtained in this study for mixed populations.

Table 5 shows results of the effect of  $\text{CaCO}_3$  on protein and DM content during solid-state fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum*, inoculated with a microbial preparation with lactic activity. With fermentation, crude protein percentage of mixtures increased in all treatments. The highest values were obtained with the inclusion of 0.50 % of  $\text{CaCO}_3$ , which represents a marked difference with protein contents at 25 °C, which were superior to fermentation at 20 °C, at 48 h. During this time, similar performance was found with a tendency to increase in crude protein with the addition of 0.50 % of  $\text{CaCO}_3$  at 25 °C, but lower than those expected according to the results of pH and humidity of the system. However, TP/CPx100 relationship, which expresses microbial protein synthesis, was the same for temperatures of 20 °C and 25 °C with 72.76%. Therefore, under rustic or field solid

evaluadas, lo que indica que el inóculo añadido en el preparado microbiano con bacterias lácticas heterofermentativas produce ácido láctico en el período inicial de la fermentación con disminución del pH, independientemente de la temperatura y el porcentaje de inclusión del carbonato como aditivo. Esta condición provoca la supresión de enterobacterias, clostridios y otros microorganismos, y así se reducen las pérdidas de MS por proteólisis y fermentación. Según Okubo *et al.* (2018), en el período de fermentación activa se espera que el pH baje más rápidamente, y a un valor inferior con respecto a un ensilaje no tratado ni inoculado, lo que mejora la preservación de la proteína durante este proceso.

En las mezclas fermentadas, las levaduras están en menor proporción en relación con las bacterias aerobias y lácticas. A las 24 h, disminuyeron las concentraciones de levaduras con la inclusión del carbonato, sin influencia de la temperatura. Sin embargo, a las 48 h se encontraron valores superiores de estas poblaciones. Estos resultados quizás estén asociados a los componentes físico-químicos de las fuentes utilizadas y a las condiciones de la fermentación. Al parecer, las levaduras necesitan mayor tiempo para establecerse y crecer en estos ambientes, así como en sinergia con las bacterias. Según Miranda *et al.* (2018), los subproductos agroindustriales (melaza, suero de leche, leche soya, vinaza) son fuentes disponibles que se pueden emplear de forma eficiente para el crecimiento y desarrollo de microorganismos con actividad funcional de sus metabolitos. Sin embargo, se ha demostrado que la combinación de *Lactobacillus plantarum* y melaza provoca disminución de las levaduras en el ensilaje como en la fermentación ruminal (Zhao *et al.* 2019). Estudios de Marrero *et al.* (2015) refieren que las levaduras, como microorganismos eficientes en el ambiente ruminal, toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con la adición de miel C de caña de azúcar, como fuente rica en carbohidratos de fácil fermentación. Esto se corresponde con los valores obtenidos en esta investigación para poblaciones mixtas.

En la tabla 5 se presentan los resultados del efecto del  $\text{CaCO}_3$ , en el contenido de proteína y MS durante la fermentación en estado sólido de residuos poscosecha de *S. tuberosum* inoculado con un preparado microbiano con actividad láctica. Con la fermentación, el porcentaje de proteína bruta de las mezclas aumentó en todos los tratamientos. Los valores más altos se obtuvieron con la inclusión de 0.50 % de  $\text{CaCO}_3$ , lo que representa una diferencia marcada con los tenores de proteína a los 25 °C, los que estuvieron porcentualmente por encima de la fermentación a los 20 °C, a las 48 h. En este tiempo se encontraron comportamientos similares con una tendencia al incremento en la proteína bruta con la adición de 0.50 % de  $\text{CaCO}_3$  a los 25 °C, pero más bajos que los esperados según los resultados del pH y la humedad del sistema. Sin embargo, la relación de PV/PBx100, que expresa la síntesis de proteína microbiana, fue la misma para las temperaturas de

Table 4. Microbiological analysis of post-harvest wastes of *Solanum tuberosum*, fermented in solid state at different temperatures with the inclusion of CaCO<sub>3</sub>

Indicator, Log 10 CFU/mL (CFU/mL)	Time (h)	Temperature (°C)	Calcium carbonate, %				SE± P-value
			0	0.25	0.50	0.75	
Mesophilic aerobic bacteria	24	20	5.34 <sup>i</sup> (2.1x10 <sup>5</sup> )	7.27 <sup>d</sup> (1.9x10 <sup>7</sup> )	7.90 <sup>b</sup> (8.0x10 <sup>7</sup> )	7.05 <sup>f</sup> (1.1x10 <sup>7</sup> )	0.02 P<0.0001
		25		7.11 <sup>e</sup> (1.2x10 <sup>7</sup> )	6.85 <sup>h</sup> (7.0x10 <sup>6</sup> )	7.79 <sup>c</sup> (6.2x10 <sup>7</sup> )	
	48	20		8.07 <sup>a</sup> (1.1x10 <sup>8</sup> )	7.95 <sup>b</sup> (8.9x10 <sup>7</sup> )	7.05 <sup>f</sup> (8.8x10 <sup>7</sup> )	
		25		6.77 <sup>i</sup> (5.9x10 <sup>6</sup> )	6.92 <sup>g</sup> (8.3x10 <sup>6</sup> )	7.95 <sup>b</sup> (1.2x10 <sup>7</sup> )	
Yeasts	24	20	4.38 <sup>e</sup> (2.5x10 <sup>4</sup> )	3.66 <sup>d</sup> (4.6x10 <sup>3</sup> )	3.66 <sup>d</sup> (4.6x10 <sup>3</sup> )	2.99 <sup>e</sup> (9.8x10 <sup>2</sup> )	0.09 P<0.0001
		25		3.16 <sup>e</sup> (1.4x10 <sup>3</sup> )	2.69 <sup>f</sup> (4.9x10 <sup>2</sup> )	3.61 <sup>d</sup> (4.1x10 <sup>3</sup> )	
	48	20		5.32 <sup>b</sup> (2.0x10 <sup>5</sup> )	5.64 <sup>a</sup> (4.3x10 <sup>5</sup> )	5.61 <sup>a</sup> (4.1x10 <sup>5</sup> )	
		25		4.40 <sup>c</sup> (5.5x10 <sup>4</sup> )	5.65 <sup>a</sup> (5.6x10 <sup>5</sup> )	5.74 <sup>a</sup> (4.5x10 <sup>5</sup> )	
Lactic acid bacteria	24	20	5.87 <sup>j</sup> (7.5x10 <sup>5</sup> )	7.90 <sup>c</sup> (8.0x10 <sup>7</sup> )	7.50 <sup>e</sup> (3.2x10 <sup>7</sup> )	7.04 <sup>g</sup> (1.0x10 <sup>7</sup> )	0.01 P<0.0001
		25		7.00 <sup>h</sup> (1.0x10 <sup>7</sup> )	7.99 <sup>b</sup> (0.97x10 <sup>7</sup> )	7.91 <sup>c</sup> (8.1x10 <sup>7</sup> )	
	48	20		7.96 <sup>b</sup> (9.1x10 <sup>7</sup> )	7.58 <sup>d</sup> (3.8x10 <sup>7</sup> )	7.18 <sup>f</sup> (1.5x10 <sup>7</sup> )	
		25		7.01 <sup>gh</sup> (1.0x10 <sup>7</sup> )	8.24 <sup>a</sup> (1.7x10 <sup>8</sup> )	6.98 <sup>i</sup> (9.5x10 <sup>6</sup> )	

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j Means with different letters indicate differences at p<0.05 (Duncan 1955)

\*Data were transformed according to log10 (X) because they do not follow a normal distribution

() means of the colony forming units per milliliters (CFU/mL)

Table 5. Effect of CaCO<sub>3</sub> on protein content and DM during solid state fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum*, inoculated with a microbial preparation with lactic acid activity

Indicator, %	Time, h	Temperature, °C	Calcium carbonate inclusion, %				SE ± p-value
			0	0.25	0.50	0.75	
Crude protein	24	20	18.48 <sup>c</sup>	18.84 <sup>b</sup>	19.02 <sup>a</sup>	17.72 <sup>e</sup>	0.050
		25	17.31 <sup>i</sup>	16.41 <sup>j</sup>	17.48 <sup>gh</sup>	17.35 <sup>hi</sup>	
	48	20	17.54 <sup>fg</sup>	18.72 <sup>b</sup>	18.50 <sup>c</sup>	17.66 <sup>ef</sup>	P<0.0001
		25	17.58 <sup>efg</sup>	18.20 <sup>d</sup>	19.09 <sup>a</sup>	17.74 <sup>e</sup>	
True protein	24	20	12.94 <sup>d</sup>	13.28 <sup>c</sup>	13.83 <sup>a</sup>	12.72 <sup>e</sup>	0.050
		25	12.12 <sup>h</sup>	11.57 <sup>i</sup>	12.72 <sup>e</sup>	12.45 <sup>f</sup>	
	48	20	12.21 <sup>gh</sup>	13.20 <sup>c</sup>	13.46 <sup>b</sup>	12.68 <sup>e</sup>	P<0.0001
		25	12.31 <sup>g</sup>	12.83 <sup>de</sup>	13.89 <sup>a</sup>	12.73 <sup>e</sup>	
DM	24	20	17.49 <sup>o</sup>	17.24 <sup>p</sup>	18.49 <sup>m</sup>	20.72 <sup>l</sup>	0.010
		25	23.51 <sup>g</sup>	21.00 <sup>j</sup>	22.49 <sup>i</sup>	22.73 <sup>h</sup>	
	48	20	39.90 <sup>c</sup>	40.57 <sup>b</sup>	37.51 <sup>e</sup>	39.66 <sup>d</sup>	P<0.0001
		25	20.85 <sup>k</sup>	35.18 <sup>f</sup>	40.90 <sup>a</sup>	17.84 <sup>n</sup>	

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p Means with different letters differ at p<0.05 (Duncan 1955)

fermentation conditions, it is more advisable to use temperatures of 20 °C.

With respect to DM, at 20 °C, increases were observed in the different inclusion levels of calcium

20 °C y 25°C con 72.76 %. Por tanto, en condiciones de fermentación sólida rústica o de campo, es más recomendable utilizar temperaturas de 20 °C.

Con respecto a la MS, a la temperatura de 20 °C se



carbonate during fermentation. Although the highest value was 40.57 % in 48 h, it is considered very humid to obtain a final product with the quality indicators for ruminant animals (Borras 2017). However, at 25 °C, the performance was opposite and there was no definite tendency in dry matter values with the different levels of calcium carbonate, finding high and low values, indistinctly. This result is due to the large amount of water still contained in potato post-harvest wastes, which makes their ensiling and preservation difficult (FAO 2015). Thus, a suitable medium is provided for the development of microorganisms, which alter the material and can be pathogenic for animals. However, in the current study, concentration of lactic acid and the maintenance of low pH allowed the removal of undesirable microorganisms.

The performance of chemical indicators of food indicated that when the potato is cut, it quickly begins a leaching process, which leads to significantly wetting food and altering its organoleptic characteristics and conservation. Urea hydrolysis by bacteria within fermentation in its metabolic process of cellular synthesis produces water and ammonia. This could be volatilized depending on final pH of the process and, possibly, on the deamination of peptides and amino acids, on a smaller scale. Part of the water produced during the oxidation of molecules could be evaporated by the metabolic heat generated during the SSF process (Pandey *et al.* 2001 and Mitchell *et al.* 2002). However, in the previously mentioned studies, these processes did not significantly influence final dry matter, so the fermentation mixture still maintains high values for the fermentation process to be effective.

True protein demonstrated an increase of 4.98 percentage units with respect to the microbial preparation (8.85 %) as a biological accelerator in fermentation, according to Borras (2017) for the temperature of 20 °C during 24 h of fermentation. These values are maintained with differences with respect to calcium carbonate levels at 48 h, so this compound favored the microbial synthesis of concentration of the initial CFU/mL. Siebald *et al.* (2002) highlighted that around 50 % of crude protein belongs to non-protein nitrogenous compounds. One of them is solanidine, an alkaloid that can be present, free or combined in the form of glycoalkaloids, called chaconine and solanine, both toxic to animals. These compounds are eliminated by solid-state fermentation, since most of the protein of this study has microbial origin, and does not come directly from food.

Results of chemical and microbiological indicators evidenced that other raw materials with a high DM proportion should be evaluated, so that they allow to create a mixture for ensiling, with a percentage close to that recommended for animal feed.

It is concluded that the inclusion of 0.50 % of CaCO<sub>3</sub>,

observaron incrementos en los distintos niveles de inclusión del carbonato de calcio durante la fermentación. Aunque el mayor valor fue de 40.57 % en 48 h, se considera muy húmedo para obtener un producto final con los indicadores de calidad para animales rumiantes (Borras 2017). Sin embargo, a temperatura de 25 °C, el comportamiento fue opuesto y se observó que no hubo tendencia definida en los valores de materia seca con los diferentes niveles de carbonato de calcio, encontrándose valores altos y bajos indistintamente. Este resultado se debe a la gran cantidad de agua que aún contienen los residuos de poscosecha de la papa, lo que dificulta su ensilado y preservación (FAO 2015). Se provee así de un medio adecuado para el desarrollo de microorganismos, que alteran el material y que pueden ser patógenos para los animales. Sin embargo, en este estudio, la concentración de ácido láctico y el mantenimiento del pH bajo posibilitaron la eliminación de microorganismos indeseables.

El comportamiento de los indicadores químicos del alimento indicó que la papa al ser cortada inicia rápidamente un proceso de lixiviación, lo que lleva a humedecer sensiblemente el alimento y a alterar sus características organolépticas y conservación. La hidrólisis de la urea por bacterias presentes en la fermentación en su proceso metabólico de síntesis celular produce agua y amoníaco. Este se pudiera volatilizar en dependencia del pH final del proceso y, posiblemente, de la desaminación de péptidos y aminoácidos, en menor escala. Parte del agua producida durante la oxidación de las moléculas se pudiera evaporar por el calor metabólico generado durante el proceso de FES (Pandey *et al.* 2001 y Mitchell *et al.* 2002). Sin embargo, en los estudios citados estos procesos no influyeron significativamente en la materia seca final, por lo que la mezcla de fermentación mantiene valores todavía altos para que el proceso fermentativo sea efectivo.

La proteína verdadera mostró incremento de 4.98 unidades porcentuales con respecto al preparado microbiano (8.85 %) como acelerador biológico en la fermentación, según refiere Borras (2017) para la temperatura de 20 °C durante 24 h de fermentación. Estos valores se mantienen con diferencias con respecto a los niveles de carbonato de calcio a las 48 h, por lo que este compuesto favoreció la síntesis microbiana de la concentración en UFC/mL inicial. Siebald *et al.* (2002) resaltan que, aproximadamente, 50 % de la proteína bruta corresponde a compuestos nitrogenados no proteicos. Uno de ellos es la solanidina, alcaloide que puede estar presente libre o combinado en forma de glicoalcaloides, denominados chaconina y solanina, ambos tóxicos para los animales. Estos compuestos se eliminan por la fermentación en estado sólido, pues en este estudio la mayoría de la proteína es de origen microbiano, y no proviene directamente del alimento.

Los resultados de los indicadores químicos y microbiológicos indicaron que se deben valorar otras materias primas con alta proporción de MS, de modo que permitan crear una mezcla para ensilar, con un porcentaje cercano al recomendado para alimento animal.

at 20 °C during 24 h of fermentation of post-harvest wastes of *S. tuberosum* with the microbial preparation, maintains favorable conditions for the production of organic acids and the aerobic stability of fermentation. Other plant materials are recommended to increase DM content of the final product.

Se concluye que la inclusión de 0.50 % de CaCO<sub>3</sub>, a temperatura de 20 °C durante 24 h de fermentación de los residuales poscosecha de *S. tuberosum* con el preparado microbiano, mantiene las condiciones favorables para la producción de ácidos orgánicos y la estabilidad aeróbica de la fermentación. Se recomiendan otros materiales vegetales para aumentar el contenido de la MS del producto final.

## References

- Anadón, A., Martínez, M.R., Arés, I., Martínez, A. & M. 2016. Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits. In: Watson, R.R. & Preedy, V.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion. 1st Ed. Ed. Academic Press. London, UK, p. 938, ISBN: 9780128023716.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis 18th Ed. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., U.S.A, ISBN: 978-093-5584-752.
- Bintsis, T. 2018. "Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics". AIMS Microbiology, 4(4): 665–684, ISSN: 2471-1888, DOI: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>.
- Borras, L.M. 2017. Obtención de un alimento por fermentación en estado sólido de residuos de poscosecha de *Solanum tuberosum* para la suplementación de rumiante. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p.100.
- 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>.
- Dinkci, N., Akalın, 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>.
- 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(2): 230-236, ISSN: 0958-6946, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.015>.
- 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., Lezcano, O., Lezcano P., Cordero J. & Quintana L. 1990. "Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido Saccharina". Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 24(1): 1-12, ISSN: 0034-7485.
- FAO-FEPALE (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Federación Panamericana de Lechería) 2012. Situación de la lechería en América Latina y el Caribe en el 2011. Informe producido en el ámbito del Observatorio de la Cadena láctea de América Latina y el Caribe. Observatorio de la Cadena Lechera, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, División de Producción y Sanidad Animal.
- Han, B., Ujo, V., Lai, B., Gopalan, V. & Ezeji, C. 2013. "Use of proteomic analysis to elucidate the role of calcium in acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052". Applied and Environmental Microbiology, 79(1): 282-293, ISSN: 1098-5336, DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02969-12>.
- Herrera, M., Guerra, C.W., Torres, V. 2015. Metodología para el análisis estadístico de diferentes de tipos de variables que se miden en las investigaciones que utilizan diseños experimentales relacionados con los modelos de análisis de varianza paramétrico y no paramétrico. Ed. EDICA. Departamento de Biomatemática, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, ISBN: 978-959-7171-57-7.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. Contributions to Probability and Statistics. 1st Ed. Ed. Stanford University Press, Palo Alto, California, USA, p. 278-292.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Ruiz, O., Burrola, E. & Claudio, A. 2015. "Feeding of Yeast (*Candida spp.*). Improves *in vitro* ruminal fermentation of fibrous substrates". Journal of Integrative Agriculture, 14(3): 514-519, ISSN: 2095-3119, DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60830-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60830-3).
- 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.
- Miranda, J.E., Marín, 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>.
- Mitchell, A., Berovic, M. & Krieger, N. 2002. "Overview of solid state bioprocessing". Biotechnology Annual Review, 8: 183-225, ISSN: 1387-2656, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(02\)08009-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(02)08009-2).
- 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>.
- 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>.
- 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(2): 155-161, ISSN: 1471-0307, DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12038>.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodríguez-León, J.A. & Nee-Nigam, P.S. 2001. *Solid-state fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications*. Reference Book. Ed. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, India, p. 221, ISBN: 81-87680-06-7.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples) ". *Biometrika*, 52(2): 591-611, ISSN: 1464-3510, DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/2333709>.
- Siebold, E., Goic, L. & Matzner, M. 2002. Alimentación de rumiantes con papa de desecho. In: Boletín Técnico N° 88, Instituto de Investigaciones Agropecuarias-Centro Regional de Investigaciones Remehue. Available: <[http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/suplementacion/99-papa.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/99-papa.pdf)>, [Consulted: January 27th, 2014].
- Sosa, D., García, Y. & Dustet, J.C. 2018. "Development of probiotics for animal production. Experiences in Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4): 357-374, ISSN: 2079-3480.
- Tian, Q., Liang, L. & Dunca, M.J. 2015. "Enhanced biohydrogen production from sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* supplemented with CaCO<sub>3</sub>". *Bioresource Technology*, 197: 422-428, ISSN: 0960-8524, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.111>.
- Yang, P., Tian, Y., Wang, Q., Conga, A. & Wei, I., 2015. "Effect of different types of calcium carbonate on the lactic acid fermentation performance of *Lactobacillus lactis*". *Biochemical Engineering Journal*, 98: 38-46, ISSN: 1369-703X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.023>.
- Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Chen, L., Bai, Y., Jia, Y. & Shao, T. 2019. "Evaluation of Lactobacillus plantarum MTD1 and waste molasses as fermentation modifier to increase silage quality and reduce ruminal greenhouse gas emissions of rice straw". *Science of the Total Environment*, 20: 143-152, ISSN: 0048-9697, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.236>.
- Zielinska, K., Fabiszewska, A., Swiatek, M. & Szymanowska-Powalowska, D. 2017. "Evaluation of the ability to metabolize 1, 2-propanediol by heterofermentative bacteria of the genus Lactobacillus". *Electronic Journal of Biotechnology*, 26: 60-83, ISSN: 0717-3458, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.002>.

**Received: February 18,2020**  
**Accepted: September 10, 2020**