

Chemical and microbiological characterization of the zootechnical additive VITAFERT, under small-scale production conditions

Caracterización química y microbiológica del aditivo zootécnico VITAFERT en condiciones de producción a pequeña escala

A. Beruvides¹, A. Elías^{†2}, Elaine C. Valiño², Grethel Milián¹, Ana J. Rondón¹, Marlen Rodríguez¹ and J. Milián¹

Agustin Beruvides: <https://orcid.org/0000-0002-8525-6595>

Elaine Valiño: <https://orcid.org/0000-0003-4178-3286>

Grethel Milián: <https://orcid.org/0000-0001-6074-7464>

Ana J Rondón: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Marlen Rodriguez: <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>

Jesus Milián: <https://orcid.org/0000-0003-3541-3094>

¹Universidad de Matanzas, Autopista Varadero km 3 ½. Matanzas, Cuba

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba

Email: agustin.beruvides81@gmail.com

The objective of this research was to chemically and microbiologically characterize the zootechnical additive VITAFERT and evaluate its stability for 90 days. To analyze the results of the chemical and microbiological characterization, descriptive statistics (mean, standard deviation and coefficient of variation) was applied. One-way analysis of variance was used to study stability. INFOSTAT package, version 2012, was also used. The performance of the chemical composition was similar similar in the five studied batches, with mean for dry matter (9.70%), ashes (10.5%), calcium (1.33%), phosphorus (0.65%), crude protein (7.12%) and pH (4.0). The additive showed high counts of lactic acid bacteria, with values between 3.24×10^{12} CFU.mL⁻¹ and 4.95×10^{12} UFC.mL⁻¹ and yeasts between 7.00×10^7 CFU.mL⁻¹ and 9.66×10^7 CFU.mL⁻¹ respectively, as well as a pH of 4.0. The stability study showed that the product maintains a pH of 4.0 up to 90 days. It is concluded that the zootechnical additive VITAFERT has chemical and microbiological characteristics for its application in animal feed.

Key words: *microbial preparation, stability, lactic acid bacteria, yeasts*

In animal production, it is essential to know the bromatological composition of food, such as the levels of protein, fiber, energy and minerals, to establish the nutritional balance in the diets intended for animals. At the same time, it is necessary to determine the microbiological quality of feed to prevent affecting animal performance, in terms of intake, digestibility and absorption of nutrients (Lezcano *et al.* 2014, Caicedo 2015, Brea 2015 and Milián *et al.* 2019).

For the above reasons, the study of microbiological and chemical characteristics of an additive constitutes a premise to introduce a new product in animal feeding (Caicedo and Valle 2017 and Rodríguez *et al.* 2020). In previous studies of Elías and Herrera (2008) and Vitaluña (2014), information is provided about the chemical and microbiological characterization of VITAFERT,

El objetivo de esta investigación fue caracterizar química y microbiológicamente el aditivo zootécnico VITAFERT y evaluar su estabilidad durante 90 días. Para analizar los resultados de la caracterización química y microbiológica, se aplicó estadística descriptiva (media, desviación estándar y coeficiente de variación). Para estudiar la estabilidad se utilizó el análisis de varianza de clasificación simple. Se usó el paquete INFOSTAT, versión 2012. La composición química se comportó de forma similar en los cinco lotes estudiados, con media para materia seca (9.70 %), cenizas (10.5 %), calcio (1.33 %), fósforo (0.65 %) proteína bruta (7.12 %) y pH (4.0). El aditivo presentó conteos elevados de bacterias ácido lácticas, con valores entre 3.24×10^{12} UFC.mL⁻¹ y 4.95×10^{12} UFC.mL⁻¹ y levaduras entre 7.00×10^7 UFC.mL⁻¹ y 9.66×10^7 UFC.mL⁻¹ respectivamente, así como pH de 4.0. El estudio de estabilidad mostró que el producto mantiene pH de 4.0 hasta los 90 días. Se concluye que el aditivo zootécnico VITAFERT presenta características químicas y microbiológicas para su aplicación en la alimentación animal.

Palabras clave: *preparado microbiano, estabilidad, bacterias ácido lácticas, levaduras*

En la producción animal es de gran importancia conocer la composición bromatológica de los alimentos, como los niveles de proteína, fibra, energía y minerales para establecer el balance alimentario en las dietas destinadas a los animales. Al mismo tiempo, es necesario determinar la calidad microbiológica del alimento para evitar que pueda afectar el comportamiento animal, en cuanto al consumo, la digestibilidad y la absorción de nutrientes (Lezcano *et al.* 2014, Caicedo 2015, Brea 2015 y Milián *et al.* 2019).

Por las razones anteriores, el estudio de las características microbiológicas y químicas de un aditivo constituye una premisa para introducir un nuevo producto en la alimentación animal (Caicedo y Valle 2017 y Rodríguez *et al.* 2020). En trabajos de Elías y Herrera (2008) y Vitaluña (2014) se informa acerca de la caracterización

produced in laboratory-scale fermenters. However, it is unknown whether this composition is maintained under small-scale production conditions. Therefore, the objective of this research was to chemically and microbiologically characterize the zootechnical additive VITAFERT, obtained under small-scale production conditions.

Materials and Methods

Obtaining the inoculum. The inoculum was obtained from natural yogurt, produced in the Empresa Combinado de la Industria Láctea (ECIL) of Matanzas, Cuba. This product was produced with strains from the Instituto de Investigaciones de la Industria de los Alimentos (IIIA) collection: *Streptococcus salivarius* subspecies thermophilus and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus. The culture was at a concentration of 10^7 CFU.mL⁻¹, which corresponds to normal values for the production of natural yogurt. The inoculum was stored at 4 °C until its use.

To obtain the microbial preparation, the methodology proposed by Elías and Herrera (2008), modified by Beruvides *et al.* (2018), was used as a guideline. For this research, five batches were elaborated, prepared in 20 L plastic tanks at the same time, in which all the components were weighed and mixed with the substitution of the final molasses, as carbon source, for raw sugar plus the addition of inoculum (natural yogurt). The biopreparation was kept in fermentation for 96 h, at room temperature (24 °C), and was activated every 12 h by shaking with a wooden paddle. Its formulation is presented in table 1, as well as the energy and protein contributions of the used raw materials.

química y microbiológica del VITAFERT, producido en fermentadores a escala de laboratorio. No obstante, se desconoce si esta composición se mantiene en condiciones de producción a pequeña escala. Es por ello que el objetivo de esta investigación es caracterizar química y microbiológicamente el aditivo zootécnico VITAFERT, obtenido en condiciones de producción a pequeña escala.

Materiales y Métodos

Obtención del inóculo. El inóculo se obtuvo a partir de yogurt natural, producido en la Empresa Combinado de la Industria Láctea (ECIL) de Matanzas, Cuba. Este producto se elaboró con cepas procedentes de la colección del Instituto de Investigaciones de la Industria de los Alimentos (IIIA): *Streptococcus salivarius* subespecie thermophilus y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus. El cultivo se encontraba a una concentración de 10^7 UFC.mL⁻¹, lo que se corresponde con los valores normales para la producción de yogurt natural. El inóculo se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Para la obtención del preparado microbiano se siguió la metodología propuesta por Elías y Herrera (2008), modificada por Beruvides *et al.* (2018). Para esta investigación se elaboraron cinco lotes, preparados en tanques plásticos de 20 L al mismo tiempo, en los que se pesaron y mezclaron todos los componentes con la sustitución de la miel final, como fuente de carbono, por azúcar crudo más la adición del inóculo (yogurt natural). El biopreparado se mantuvo durante 96 h en fermentación a temperatura ambiente (24 °C) y se activó cada 12 h mediante agitación con una paleta de madera. Su formulación se presenta en la tabla 1, así como los aportes energéticos y proteicos de las materias primas utilizadas.

Table 1. Formulation of the zootechnical additive VITAFERT, obtained under small-scale production conditions

Composition	Inclusion levels, kg	Contribution	
		Energy, MJ.kg ⁻¹	Protein, %
Inoculum (natural yogurt) **	1	3.014	0.3
Corn meal*	4	0.040	0.85
Soy bean meal*	4	0.039	0.83
Urea***	0.5	-	281
Ammonium sulfate*	0.25	-	21
Mineral salt *	0,5	-	-
Raw sugar *	15	0.041	-
Water	100L	-	-

Source: NRC (2012) *, IIIA **, De Blos *et al.* (2007) ***

Chemical characterization. Three samples were taken from each batch of VITAFERT to determine the content of dry matter (DM), ashes (C), calcium (Ca), phosphorus (P) and crude protein (CP), according to the methodology described by AOAC (2010).

Determination of pH and count of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. To determine pH performance and

Caracterización química. Se tomaron tres muestras de cada lote de VITAFERT para determinar el contenido de materia seca (MS), cenizas (C), calcio (Ca), fósforo (P) y proteína bruta (PB), según la metodología descrita por AOAC (2010).

Determinación de pH y conteo de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras. Para determinar el comportamiento

the presence of these microorganisms during the production of this zootechnical additive, measurements were made every four hours until 96 h in the five studied batches.

To count the LAB and yeasts, serial dilutions of samples (1:10, v/v) were made in peptone water up to 10^{-11} . Of these dilutions, in the first 12 h, 10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-9} were used for LAB, and 10^{-9} , 10^{-10} and 10^{-11} for the following hours, for the purpose of deep cultivation on plates with MRS agar (De Mann *et al.* 1960) (BIOCEN, Cuba). For yeasts, dilutions 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} were taken in the first 12 h, and later those of 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} were used. Each of them was repeated three times (1 mL) on Rose Bengal Agar (Rose Bengal 0.05 % and chloramphenicol 0.5 %) (HISPANLAB, Spain). After incubation at 37 °C (for 72 h for LAB and 48 h for yeasts), the microbial count was carried out. The number of CFU was determined by visual counting of colonies using a magnifying glass.

Count of contaminating microorganisms. It was carried out in accordance with current standards, described for studies of the microbiological quality of food for human and animal intake NC-ISO (table 2). For this, serial dilutions of samples were carried out (NC ISO 6887-1: 2002) and the techniques for determining the different groups of microorganisms were performed.

del pH y la presencia de estos microorganismos durante la elaboración de este aditivo zootécnico, se realizaron mediciones cada cuatro horas hasta las 96 h en los cinco lotes estudiados.

Para efectuar el conteo de las BAL y las levaduras se realizaron diluciones seriadas de las muestras (1:10, v/v) en agua de peptona hasta 10^{-11} . De estas diluciones, en las primeras 12 h, se utilizaron para las BAL 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} , y en horas posteriores 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} , con el propósito de su siembra a profundidad en placas con agar MRS (De Mann *et al.* 1960) (BIOCEN, Cuba). Para las levaduras, se tomaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en las primeras 12 h, y posteriormente se emplearon las de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Cada una de ellas se repitió tres veces (1 mL) en agar rosa de bengala (rosa de bengala 0.05 % y cloranfenicol 0.5 %) (HISPANLAB, España). Después de incubar a 37°C (durante 72 h para BAL y 48 h para levaduras), se realizó el conteo microbiano. El número de UFC se determinó por conteo visual de colonias mediante una lupa.

Conteo de microorganismos contaminantes. Se realizó de acuerdo con las normas vigentes, descritas para los estudios de la calidad microbiológica de los alimentos para el consumo humano y animal NC-ISO (tabla 2). Para ello se realizaron diluciones seriadas de las muestras (NC ISO 6887-1: 2002) y se ejecutaron las técnicas de determinación de los diferentes grupos de microorganismos.

Table 2. Microbiological tests for the determination of contaminating microorganisms in the zootechnical additive VITAFERT

Microbiological tests	References NC- ISO
Count of total and fecal coliforms	4832: 2010
Count of <i>Bacillus cereus</i>	4833-1: 2014
Count of Salmonella in 25 mL	6579: 2008

For the study of VITAFERT stability at room temperature (24 ± 5 °C) for 90 d, an experiment with a completely randomized design was developed. It was carried out in the microbiology laboratory of the Planta de Conservas y Alimentos Libertad, in Colón municipality, Matanzas province, Cuba.

According to the methodology described above, 20 L of the zootechnical additive were prepared and distributed into plastic containers of 1 L capacity that were kept indoors. During days 1, 3, 7, 15, 30, 60 and 90, three samples were taken for analysis. The stability of this biological product was determined from the pH analysis and the counting of LAB and viable yeasts.

Statistical analysis. Dispersion statistics (mean, standard deviation and coefficient of variation) were used for the chemical and microbiological characterization of VITAFERT. The pH values, concentrations of LAB and yeasts were processed by means of a one-way analysis of variance and Duncan (1955) test for $P < 0.05$. Data

Para el estudio de la estabilidad del VITAFERT a temperatura ambiente (24 ± 5 °C) durante 90 d, se desarrolló un experimento con diseño completamente aleatorizado. Este se realizó en el laboratorio de microbiología de la Planta de Conservas y Alimentos Libertad, del municipio Colón, ubicado en la provincia Matanzas, Cuba.

Según la metodología descrita anteriormente, se prepararon 20 L del aditivo zootécnico y se distribuyeron en recipientes plásticos de 1 L de capacidad que se mantuvieron bajo techo. Durante los días 1, 3, 7, 15, 30, 60 y 90 se tomaron tres muestras para su análisis. La estabilidad de este producto biológico se determinó a partir del análisis de pH y el conteo de BAL y levaduras viables.

Análisis estadístico. Para la caracterización química y microbiológica del VITAFERT se utilizaron los estadígrafos de dispersión (media, desviación estándar y coeficiente de variación). Los valores de pH, concentraciones de BAL y levaduras se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple

was processed in INFOSTAT statistical package, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

Results and Discussion

Tables 3 and 4 show the results of the chemical and microbiological characterization of VITAFERT. Chemical composition values were in correspondence with the determinations reported by Elías and Herrera (2008), except DM, which presented figures in the order of 9.72 %. Meanwhile, the cited authors obtained values of 15.05 %. These results were related to the substitution of molasses for raw sugar.

y la d cima 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 3 y 4 se muestran los resultados de la caracterización química y microbiológica del VITAFERT. Los valores de la composición química estuvieron en correspondencia con las determinaciones informadas por Elías y Herrera (2008), a excepción de la MS, que presentó cifras en el orden de 9.72 %. En tanto, los autores citados obtuvieron valores de

Table 3. Chemical composition of the zootechnical additive VITAFERT

Statistics Indicators, %	Mean	SD	CV
Dry matter	9.72	0.05	0.46
Ashes	10.52	0.08	0.80
Calcium	1.33	0.01	0.41
Phosphorous	0.65	0.01	2.01
Crude protein	7.12	0.02	0.26
pH	3.95	0.05	1.29

Results are the average of three determinations SD- standard deviation; CV- coefficient of variation, %

Table 4. Microbiological composition of the zootechnical additive VITAFERT, after fermentation at 96 h. Microorganism count (CFU mL⁻¹)

Statistics Indicators	Mean	SD	CV
LAB	4.19x10 ¹²	0.3220	0.45
Total and fecal coliforms	Negative	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	Negative	-	-
Viable yeasts	8.39 x10 ⁷	0.8321	1.20
Salmonella in 25mL	Negative	-	-

Results of DM and Ca indicators oscillated in the ranges determined by Gutiérrez *et al.* (2012) in characterizations of the same product with final molasses as energy source. Similarly, Beruvides (2013) prepared the zootechnical additive VITAFERT under production conditions, also formulated with final molasses as energy source. This author performed the chemical characterization from 0 h up to 96 h, and obtained similar values to those reported in this study for DM, CP and pH.

It is confirmed that the methodology applied to obtain this biopreparation under small-scale production conditions does not cause considerable variations in its chemical composition, when compared to laboratory-scale fermenters. Data indicate that there is repeatability in the results. This means that when these components are used, under the same conditions, there are no changes in the studied parameters.

In the current research, pH (3.9-4.0) remained within the ranges established for biological products of this

15.05 %. Estos resultados se relacionan con la sustitución de la miel de caña de azúcar por azúcar crudo.

Los resultados de los indicadores MS y Ca oscilaron en los rangos determinados por Gutiérrez *et al.* (2012) en caracterizaciones del mismo producto con miel final como fuente energética. De igual manera, Beruvides (2013) elaboró en condiciones de producción el aditivo zootécnico VITAFERT, formulado también con miel final como fuente energética. Realizó su caracterización química desde la hora 0 hasta las 96 h, y obtuvo valores similares a los informados en este estudio para la MS, PB y pH.

Se confirma que la metodología aplicada para la obtención de este biopreparado en condiciones de producción a pequeña escala no provoca variaciones considerables en su composición química, si se compara con fermentadores a escala de laboratorio. Los datos indican que existe repetibilidad en los resultados obtenidos. Esto significa que cuando se emplean estos componentes, en las mismas condiciones, no se producen modificaciones en los indicadores estudiados.

category (Elías and Herrera 2008 and Roján 2009). Caicedo and Valle (2017) defined that these pH values allow stability over time and conservation of biological products. Therefore, this zootechnical additive has an acceptable quality for its use in animal feeding. In addition, these acidity levels reduce the presence of pathogenic microorganisms and other contaminants (Vega *et al.* 2013, Vélez *et al.* 2015 and Milián *et al.* 2017).

Flores-Mancheno *et al.* (2015) characterized the pH of a biological product, intended for pigs in the pre-fattening and growth-fattening stages, formulated with fresh whey, urea and sugar cane molasses. These authors reported a pH of 3.87, similar to that obtained in the current study. This could be related to the presence of a considerable population of LAB, which produces organic acids (lactic, acetic, propionic and butyric) and lowers the pH (Belkacem-Hanfi *et al.* 2014). Studies carried out by Caicedo and Valle (2017) reported a similar performance to that observed in this study for pH, when they elaborated a microbial biopreparation destined for pigs, which contained natural yogurt, whey, B molasses and taro tubers.

The microbiological analysis did not show contaminating microorganisms in VITAFERT samples (table 4). These results may be caused by the presence of high concentrations of organic acids (mainly lactic and acetic) or bacteriocins provided by LAB (superior to 109 CFU.mL⁻¹), which allow the product to be kept free of contaminants, which makes it viable for the use in animals.

Elías and Herrera (2008), Gutiérrez *et al.* (2012) and Beruvides (2013) characterized, from the microbiological point of view, one of the variants of VITAFERT that contained final molasses as energy source, and obtained values in the ranges of 10⁹ and 10¹⁰ CFU.mL⁻¹ for *Lactobacillus spp.*, and between 10⁶ and 10⁷ CFU.mL⁻¹ for yeasts. In the present research, higher values were quantified for LAB, which could be related to the substitution of final molasses for raw sugar, or to the initial population that presented the inoculum (natural yogurt).

Figure 1 shows the results of LAB and yeast count over time. It was found that during fermentation process, LABs grow to values of 29 natural logarithm (NL) UFC.mL⁻¹ and yeasts, in the order of 20 NL UFC.mL⁻¹.

The pH decreased from 8.5 to 4.0 from the beginning of fermentation until 96 h. By studying the growth kinetics of LABs and yeasts in the small-scale fermentation process, it was found that as pH decreases, the growth of both microbial groups progressively increases. This confirms the statements of León (2012), who informed that these microorganisms can grow in a wide pH range (between 4-7), unlike other microbial groups such as coliforms, *Salmonella spp.* and *Bacillus spp.*, which inhibit their growth under

En esta investigación, el pH (3.9-4.0) se mantuvo en los rangos establecidos para productos biológicos de esta categoría (Elías y Herrera 2008 y Roján 2009). Caicedo y Valle (2017) definieron que estos valores de pH permiten la estabilidad en el tiempo y la conservación de los productos biológicos. Por tanto, este aditivo zootécnico se puede considerar de una calidad aceptable para su utilización en la alimentación animal. Además, estos niveles de acidez disminuyen la presencia de microorganismos patógenos y de otros contaminantes (Vega *et al.* 2013, Vélez *et al.* 2015 y Milián *et al.* 2017).

Flores-Mancheno *et al.* (2015) caracterizaron el pH de un producto biológico, destinado a cerdos en la etapa de preceba y crecimiento-ceba, formulado con suero de leche fresca, urea y melaza de caña de azúcar. Estos autores informaron un pH de 3.87, similar al obtenido en este estudio. Esto se pudiera relacionar con la presencia de una población considerable de BAL, que produce ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y butírico) y disminuye el pH (Belkacem-Hanfi *et al.* 2014). En estudios realizados por Caicedo y Valle (2017) se informa un comportamiento similar al observado en este trabajo para la expresión del pH, cuando elaboraron un biopreparado microbiano destinado a cerdos, que contenía yogurt natural, suero de leche, miel B y tubérculos de papa china.

El análisis microbiológico no mostró microorganismos contaminantes en las muestras de VITAFERT (tabla 4). Estos resultados se pueden deber a la presencia de concentraciones altas de ácidos orgánicos (fundamentalmente láctico y acético) o bacteriocinas aportados por las BAL (superiores a 109 UFC.mL⁻¹), que permiten mantener el producto libre de contaminantes, lo que hace viable su utilización en los animales.

Elías y Herrera (2008), Gutiérrez *et al.* (2012) y Beruvides (2013) caracterizaron desde el punto de vista microbiológico una de las variantes de VITAFERT que contenía como fuente energética miel final, y obtuvieron valores para *Lactobacillus spp.* en los rangos de 10⁹ y 10¹⁰ UFC.mL⁻¹, y para las levaduras entre 10⁶ y 10⁷ UFC.mL⁻¹. En el presente trabajo se cuantificaron valores superiores para las BAL, lo que se pudiera relacionar con la sustitución de la miel final por azúcar crudo o por la población inicial que presentaba el inóculo (yogurt natural).

En la figura 1 se presentan los resultados del conteo de BAL y levaduras en el tiempo. Se comprobó que durante el proceso de fermentación, las BAL crecen hasta valores de 29 logaritmo neperiano (LN) UFC.mL⁻¹ y las levaduras, en el orden de 20 LN UFC.mL⁻¹.

El pH disminuyó de 8.5 a 4.0 desde el inicio de la fermentación hasta los 96 h. Mediante el estudio de la cinética de crecimiento de las BAL y las levaduras en el proceso de fermentación a pequeña escala se comprobó que en la medida que disminuye el pH, aumenta progresivamente el crecimiento de ambos grupos microbianos. Esto confirma lo informado por León (2012) acerca de que estos microorganismos pueden crecer en un

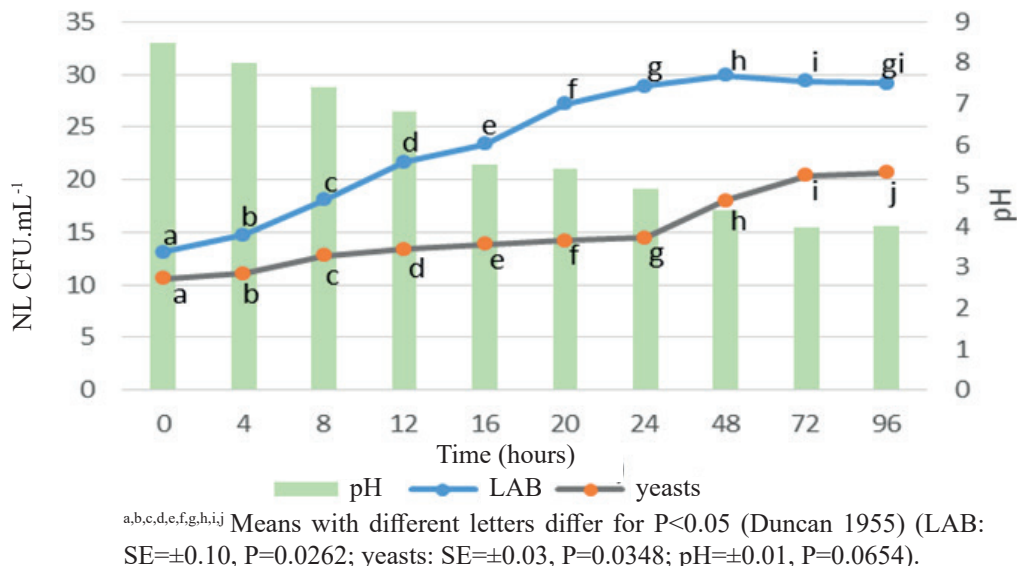


Figure 1. Growth kinetics of lactic acid bacteria and yeasts and pH performance during the fermentation process of the zootechnical additive VITAFERT

acidic conditions (Pavlović *et al.* 2016). These values of pH and microbial concentration are in the optimal ranges for the application of this product for feeding pigs. However, it is not known if this composition is maintained over time, so it is necessary to study its stability for a period of 90 d.

Figure 2 shows the pH values and LAB and yeast counts of the different batches of VITAFERT. These determinations are within the ranges established by Elías and Herrera (2008), and Beruvides (2013).

As demonstrated in figure 2, yeasts from three to

amplio rango de pH (entre 4-7), a diferencia de otros grupos microbianos como coliformes, Salmonella spp. y Bacillus spp., que en condiciones de acidez inhiben su crecimiento (Pavlović *et al.* 2016). Estos valores de pH y concentración microbiana se encuentran en los rangos óptimos para la aplicación de este producto en la alimentación de cerdos. No obstante, no se conoce si esta composición se mantiene en el tiempo, por lo que se hace necesario el estudio de su estabilidad por un período de 90 d.

En la figura 2 se presentan los valores de pH y conteos de BAL y levaduras de los diferentes lotes de VITAFERT.

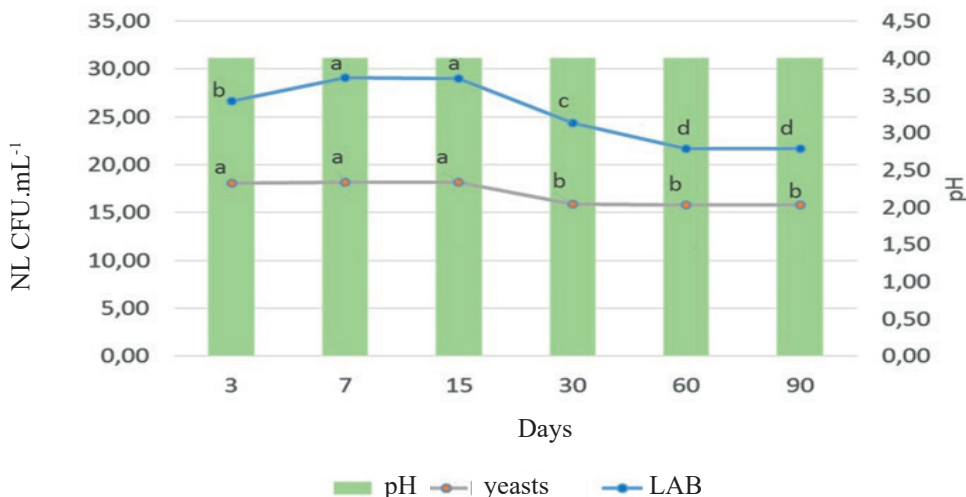


Figure 2. Stability performance of the microbiological and chemical indicators in the zootechnical additive VITAFERT under small-scale production conditions for 90 d

15 d maintained values of 10⁷ CFU.mL⁻¹. Subsequently, there was a decrease of viable cells (10⁶ CFU.mL⁻¹) from 30 d, remaining in this order until the end of the study. LABs gradually increased during the first 15 d to 10¹² CFU.mL⁻¹. Then, there was a decrease to 10⁹ CFU.mL⁻¹ at 90 d. The pH showed a value of 4.0

Estas determinaciones se encuentran en los rangos establecidos por Elías y Herrera (2008) y Beruvides (2013).

Como muestra la figura 2, las levaduras a partir de los tres y hasta los 15 d mantuvieron valores de 10⁷ UFC.mL⁻¹. Posteriormente, se produjo la disminución de las células viables (10⁶ UFC.mL⁻¹) desde los 30 d, manteniéndose

after 72 h, and maintained its stability until 90 d. This result could be associated with the production of organic acids (lactic, acetic, propionic and butyric) by LABs (Vázquez *et al.* 2009).

The results agree with those obtained by Brizuela (2003), who evaluated some stability parameters of a biopreparation for probiotic purposes, intended for pigs and made with *Lactobacillus rhamnosus* strains. Similar studies were carried out by Rondón (2009), in which the stability of two biopreparations of *Lactobacillus salivarius* subspecies *salivarius* C-7 and C-65 was determined. This author found that, after 30 days, LABs viability is affected, because, under these conditions, cells continue their metabolism and the essential nutrients for their development are consumed.

Ramírez *et al.* (2011) and Powthong and Suntornthiticharoen (2015) report that the presence of LAB in biological products guarantees safety and stability for their use in animal feed. These microorganisms have several applications, and one of the most important is food fermentation (milk, meat and vegetables) to obtain products such as yogurt, cheese, pickles, sausages and silage. In this way, it contributes to the biopreservation and quality of food sensorial characteristics.

When carbohydrates ferment, LAB microorganisms produce a mixture of compounds with antimicrobial action, such as lactic acid, acetic acid, butyric acid, hydrogen peroxide, diacetyl and low molecular weight peptides, called bacteriocins, which inhibit the proliferation of other microbial groups that do not tolerate the presence of these compounds (Rodríguez *et al.* 2013).

Caicedo and Valle (2017) reported that pH is a very important indicator for fermentation processes. Its decrease is one of the most substantial changes that occur during the production of a biopreparation. Adedeji *et al.* (2011) defined that pH is directly related to the degradative processes that occur during conservation. In this sense, when a biological product reaches pH values between 3.8 and 4.2, its stability is achieved. This condition causes a restriction of the activity of proteolytic enzymes and the suppression of enterobacteria and *Clostridium* (López *et al.* 2013). The results of the current research are in the range of pH values recommended for this type of additive.

According to Rendón *et al.* (2015), the action mechanisms of biological products with pH values equal or inferior to 4, imply the inhibition of growth of pathogenic bacteria, the production of lactic acid and the decrease of intestinal permeability when diarrhea occurs, as well as the increase of lactase activity and immunity stimulation. In this way, pH decrease in the obtained product is an indicator of the presence of lactic acid bacteria, as resulted in this research.

It is concluded that the methodology used for the preparation of the zootechnical additive VITAFERT,

en este orden hasta el final del estudio. Las BAL aumentaron gradualmente durante los primeros 15 d hasta 10^{12} UF C.mL⁻¹. Luego, hubo un decrecimiento hasta 10^9 UFC.mL⁻¹ a los 90 d. El pH mostró valor de 4.0 a partir de las 72 h, y mantuvo su estabilidad hasta los 90 d. Este resultado se pudiera asociar a la producción de ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y butírico) por las BAL (Vázquez *et al.* 2009).

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Brizuela (2003), quien evaluó algunos indicadores de estabilidad de un biopreparado con fines probióticos, destinado a cerdos y elaborado con cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Estudios similares realizó Rondón (2009) cuando determinó la estabilidad de dos biopreparados de *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius* C-7 y C-65. Esta autora comprobó que a partir de los 30 d se afecta la viabilidad de las BAL, debido a que en estas condiciones las células continúan su metabolismo y se agotan los nutrientes esenciales para su desarrollo.

Ramírez *et al.* (2011) y Powthong y Suntornthiticharoen (2015) refieren que la presencia de las BAL en los productos biológicos garantiza la seguridad y estabilidad para su uso en la alimentación animal. Estos microorganismos tienen diversas aplicaciones, y una de las más importantes lo constituye la fermentación de alimentos (leche, carnes y vegetales) para obtener productos como el yogurt, el queso, los encurtidos, embutidos y ensilajes. De esta forma se contribuye a la biopreservación y a la calidad de las características sensoriales de los alimentos.

Cuando fermentan carbohidratos, los microorganismos BAL producen una mezcla de compuestos con acción antimicrobiana, como es el caso del ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular, llamados bacteriocinas, que inhiben la proliferación de otros grupos microbianos que no toleran la presencia de estos compuestos (Rodríguez *et al.* 2013).

Caicedo y Valle (2017) refirieron que el pH es un indicador de gran importancia en los procesos fermentativos. Su disminución es uno de los cambios más sustanciales que se producen durante la elaboración del biopreparado. Adedeji *et al.* (2011) definieron que el pH se relaciona directamente con los procesos degradativos que ocurren durante la conservación. En este sentido, cuando un producto biológico alcanza valores de pH entre 3.8 y 4.2, se logra su estabilidad. Esta condición hace que ocurra una restricción de la actividad de las enzimas proteolíticas y la supresión de enterobacterias y *Clostridium* (López *et al.* 2013). Los resultados de esta investigación se encuentran en los índices de pH recomendados para este tipo de aditivo.

Según Rendón *et al.* (2015), los mecanismos de acción de los productos biológicos con valores de pH iguales o inferiores a 4, implican la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, la producción de ácido láctico y la disminución de la permeabilidad intestinal cuando se producen diarreas, así como el aumento de la actividad de la lactasa y la estimulación de la inmunidad. De esta

under small-scale production conditions, allowed to obtain a good quality biological product, composed of high levels of LAB and yeasts. These levels of microorganisms within the microbial preparation show stability in their viability up to 15 d, while the pH remains with a value of 4 for 90 d.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

Author's contribution

A. Beruvides: Design and conducting the experiment, data analysis, manuscript writing

Elías, A†

Elaine C. Valiño: Manuscript writing and revision

Grethel Milián: Manuscript writing and revision

Ana J. Rondón: Manuscript writing and revision

Marlen Rodríguez: Manuscript writing and revision

J. Milián: Manuscript writing and revisión

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 5, Number 1, 2021.

manera, la disminución del pH en el producto obtenido es indicador de la presencia de bacterias lácticas, como resultó en esta investigación.

Se concluye que la metodología empleada para la elaboración del aditivo zootécnico VITAFERT, en condiciones de producción a pequeña escala, permitió obtener un producto biológico de calidad, constituido por altos niveles de BAL y levaduras. Estos niveles de microorganismos presentes en el preparado microbiano muestran estabilidad en su viabilidad hasta los 15 d, mientras que el pH permanece con valor de 4 por 90 d.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflict de intereses

Contribucion de los autores

A. Beruvides: Diseño y conducción del experimento, análisis de los datos y escritura del manuscrito

Elías, A†

Elaine C. Valiño: Escritura del manuscrito y revisión

Grethel Milián: Escritura del manuscrito y revisión

Ana J. Rondón: Escritura del manuscrito y revisión

Marlen Rodríguez: Escritura del manuscrito y revisión

J. Milián: Escritura del manuscrito y revisión

References

- Adedeji, L.O., Olapade-Ogunwole, F., Farayola, C.O. & Adejumo, I.O. 2011. "Productivity effects of occupational hazards among poultry farmers and farm workers in Osogbo Local Government area of Osumnn State". International Journal of Poultry Science, 10(11): 876-870, ISSN: 1682-8356.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2010. Official Methods of Analysis. 18th Ed. Horwitz, W. & Latimer, G. (eds). Ed. AOAC International. Washington D.C., U.S.A, pp. 935-955.
- Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H., Boudabous, A. & Roussos, S. 2014. "Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxina isolated from stored wheat". Biological Control, 76: 52-59, ISSN: 1049-9644, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.001>.
- Beruvides, A. 2013. Efecto de la inclusión de diferentes niveles de VITAFERT sobre el comportamiento productivo y de salud en la ceiba porcina. PhD Thesis. Departamento de Fisiología, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p.86.
- Beruvides, A., Elías, A., Valiño, E.C., Milián, G., Rodríguez, M. & González, R. 2018. "Comportamiento productivo y de salud en lechones lactantes suplementadas con azúcar fermentado con yogurt". Livestock Research for Rural Development, 30, Article #72, Available: < <http://www.lrrd.org/lrrd30/4/agust30072.html>>.
- Brea, O. 2015. Obtención de un alimento energético-proteico a partir de la fermentación en estado sólido de la harina del fruto del árbol del pan (*Artocarpus altilis*) y su empleo en dietas para conejos y cerdos. PhD Thesis. Departamento de Fisiología, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p.72.
- Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, p.59.
- Caicedo, W. 2015. Valoración nutritiva del ensilado de tubérculos de papa china (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) y su uso en la alimentación de cerdos en crecimiento ceiba. PhD Thesis. Universidad de Granma, Bayamo, Cuba, p.43.
- Caicedo, W. & Valle, S. 2017. Cap. 8: Fermentación de tubérculos de taro (*Colocasia esculenta* (L) Scott). Un alimento funcional para porcinos en la región Amazónica. In: Alimento Funcional. Ed. Académica Española, Madrid, España, pp. 184-200, ISBN: 978-3-639-53478-8.
- De Blos, C., González, G. & García, P. 2007. Urea - Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. Madrid, España, Available: <<https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/urea-tablas-fedna-composicion-t27207.htm>> [Consulted: February 25th, 2019].
- De Mann, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. 1960. "A medium for the cultivation of lactobacilli". Journal of Applied Bacteriology, 23(1): 130-135, ISSN: 1365-2672, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.
- 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>.
- 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.

- Flores-Manchano, L.G., García-Hernández, Y., Proaño-Ortiz, F.B. & Caicedo-Quinche, W.O. 2015. "Evaluación de tres dosis de un preparado microbiano, obtenido en Ecuador, en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en posdestete". *Ciencia y Agricultura*, 12(2): 59-70, ISSN: 2539-0899, DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.4392>.
- Gutiérrez, D., Elías, A., García, R., Herrera, F., Jordán, H. & Sarduy, L. 2012. "Influence of a microbial additive on the voluntary intake of dry matter, neutral detergent fiber and indicators of the ruminal fermentation of goats fed *Brachiaria brizantha* hay". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(2): 211-216, ISSN: 2079-3480.
- León, M.F. 2012. Evaluación *in vitro* de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Diploma Thesis. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Lezcano, P.P., Berto, D.A., Bicudo, S.J., Curcelli, F., Figueiredo, P. & Valdivie, N.M. 2014. "Yuca ensilada como fuente de energía para cerdos en crecimiento". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18(3): 41-47, ISSN: 0188-7890.
- López, M.P.C., Zolim, J.F.A., Alberton, L.R., Otutumi, L.K., Silveira, A.P. & Mesa, S.K.L. 2013. "Caracterização nutricional da silagem de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L) adicionada ou não de soro de queijo e/ou grão de milho". *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 16(1): 41-46, ISSN: 1982-1131.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Arteaga, F., Bocourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A. & Laurencio, M. 2017. "Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus spp.* strains for the preparation of animal additives". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2): 197-207, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M.L., Martínez, Y., Boucourt, R., Rodríguez, M., Beruvides, A. & Portilla, Y. 2019. "Stability of the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 under different temperature conditions". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(3): 241-248, ISSN: 2079-3480.
- NC-ISO 6887-1. 2002. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal. Preparación de la muestra de ensayo, la suspensión inicial y las diluciones seriadas decimales. Parte 1. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC-ISO 6579. 2008. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC-ISO 4832. 2010. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la enumeración de coliformes. Método de Referencia. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC-ISO 4833-1. 2014. Microbiología de la cadena alimentaria- Método horizontal para la enumeración de microorganismos- Parte 1: Conteo de colonias a 30°C por la Técnica de placa vertida. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NRC (National Research Council). 2012. Nutrients Requirements of Pigs, 10th Rev. Ed. Ed. National Academy Press, Washington D.C., U.S.A., p. 212, DOI: <https://doi.org/10.17226/6016>.
- Pavlović, M., Marković, R., Stamen-Radulović, V., Teodorović, A.N., Jakić-Dimić, D., & Šefer, D. 2016. The use of organic acids in animal nutrition. In: Second International Symposium of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia, p. 233.
- Powthong, P. & Suntornthiticharoen, P. 2015. "Isolation, identification and analysis of probiotic properties of lactic acid bacteria from selective various traditional thai fermented food and kefir". *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(2): 67-74, ISSN: 1994-7984, DOI: <https://doi.org/10.3923/pjn.2015.67.74>.
- Ramírez, J.C., Rosas, P., Velázquez, M.Y., Ulloa, J.A. & Arce, F. 2011. "Bacterias lácticas: Importancia y su efecto en la salud". *Revista Fuente*, 2(7): 1-16, ISSN: 2007-0713.
- Rendón, L., Añez, M., Salvatierra, A., Meneses, R., Heredia, M. & Rodríguez, M. 2015. "Probióticos: Generalidades". *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 74(8): 123-128, ISSN: 0004-0649.
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A., Bocourt, R., Sarduy, L. & Beruvides, A. 2020. "Chemical and microbiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* creams, obtained from different Cuban distilleries". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(3): 323-330, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, R., Lores, J., Gutiérrez, D., Ramírez, A., Gómez, S., Elías, A., Aldana, A.I., Moreira, O., Sarduy, L. & Jay, O. 2013. "Inclusion of the microbial additive Vitafert in the *in vitro* ruminal fermentation of a goat diet". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(2): 171-178, ISSN: 2079-3480.
- Roján, L.E. 2009. Empleo de un producto biológicamente activo VITAFERT en precebas porcinas. Master Thesis. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, p.53.
- Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. PhD Thesis. Departamento de Fisiología, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba, p. 131.
- Vázquez, S.M., Suárez, H. & Zapata, S. 2009. "Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne". *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1): 64-71, ISSN: 0717-7518, DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>.
- Vega, C., Pichiuha, B., Peña, C. & Zavaleta, A. 2013. "Efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*". *Ciencia e Investigación*, 16(2): 77-82, ISSN: 1609-9044.
- Vélez, J., Gutiérrez, L. & Montoya, O. 2015. "Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*". *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 68(1): 7481-7486, ISSN: 0304-2847.
- Vitaluña, O.V.M. 2014. Evaluación de diferentes niveles de VITAFERT en crecimiento-engorde de cerdos. Diploma Thesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, p. 48.