

---

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**

**Trabajo de Diploma**

BIOPRODUCTO PROBIÓTICO DESARROLLADO EN RESIDUOS DE LA INDUSTRIA  
LÁCTEA PARA USO EN TERNEROS LACTANTES.

Autora: Dayana Giró Letourneaut.

Año, 2019

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**

**Trabajo de Diploma**

BIOPRODUCTO PROBIÓTICO DESARROLLADO EN RESIDUOS DE LA INDUSTRIA  
LÁCTEA PARA USO EN TERNEROS LACTANTES.

Autora: Dayana Giró Letourneaut

Tutores: Dr.C. Juan Emilio Hernández García  
MSc. Ibrahím Calero Herrera

Año, 2019

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor y cariño al ser que me enseñó que los sueños se hacen realidad. Por darme fuerzas cuando más la necesitaba y por estar a mi lado todo el tiempo, por enseñarme que en la vida hay que esforzarse para ser alguien útil y provechoso, que sin sacrificios no hay satisfacción. Esa persona especial es mi abuela Mirtha, donde quiera que estés, te dedico este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis profesores que durante 5 años estuvieron transmitiéndome conocimientos que me permitieron elevar mi desarrollo profesional.

A mis tutores Dr.C. Juan Emilio Hernández García y MSc Ibrahím Calero Herrera por su dedicación y apoyo incondicional.

A mi familia que ha sabido guiar mis pasos, fomentando los valores que me han permitido ser una mejor persona. Especialmente a mi madre y a Frank sin ellos no hubiera llegado hasta aquí .Además a mi suegra Marlen y mi compañero de vida Alexander por estar siempre en disposición de ayudarme en todo momento.

A todos Muchas Gracias.

## **RESUMEN**

El trabajo se realizó en dos etapas, una a nivel de laboratorio (Laboratorio de leche de la Empresa "Rio Zaza" y Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola) y otra de campo en la Recría de terneros de la Empresa Pecuaria Managuaco, Sancti Spíritus, Cuba; la investigación tuvo como objetivo la obtención de un bioproducto probiótico desarrollado en un medio de cultivo natural para su aplicación en terneros lactantes. Los resultados de laboratorio mostraron que el bioproducto probiótico conformado por diferentes proporciones de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya (50, 75, 90 y 100 % v/v de residual de soya), fue influenciado por la presencia de lactosa, expresado en la disminución del pH y la elevación de la acidez; siendo las proporciones más efectivas las de 50 y 75 % (v/v). El crecimiento de las cepas del bioproducto en el sustituto lechero fue abundante, poniendo de manifiesto que no existían factores inhibitorios. En el ensayo de campo se utilizaron 27 terneros Holstein con una edad promedio de 7-10 días, conformándose 3 grupos, un control y dos tratados aplicándoles dosis de 20mL y 30mL. El comportamiento de la administración del bioproducto sobre el incremento de peso y la ganancia media diaria demostró diferencias significativas entre el grupo que consumió 20mL y el grupo control, no obstante se vieron favorecidos ambos grupos tratados. A diferencia del grupo control en los grupos tratados no se presentó enfermedad, ni muerte.

## **SUMMARY**

The work was carried out in two stages, one at the laboratory level (Laboratory of Milk of the Company "Rio Zaza" and Reference Laboratory for Beekeeping Research and Health) and another field in the Rearing of Calves of the Managuaco Cattle Company, Sancti Spiritus, Cuba; The objective of the research was to obtain a probiotic bioproduct developed in a natural culture medium for application in lactating calves. Laboratory results showed that the probiotic bio-product formed by different proportions of whey and residual from the soybean softening line (50, 75, 90 and 100% v / v of residual soy), was influenced by the presence of lactose, expressed in the decrease of the pH and the elevation of the acidity; being the most effective proportions those of 50 and 75% (v / v). The growth of the strains of the bioproduct in the milk substitute was abundant, showing that there were no inhibitory factors. In the field trial, 27 Holstein calves were used with an average age of 7-10 days, with 3 groups, one control and two treated, applying doses of 20mL and 30mL. The behavior of the administration of the bioproduct on weight gain and gain Average daily showed significant differences between the group that consumed 20mL and the control group, although both treated groups were favored. Unlike the control group in the treated groups, no disease or death occurred.

## INDICE

Contenido	Pág.
INTRODUCCION	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Agroindustria y residuos agroindustriales.	5
1.2 Uso de residuales de la agroindustria	6
1.2.1 Usos de la soya.	7
1.3 Usos e importancia del Suero lácteo	12
1.4 Anatomía y fisiología digestiva del ternero	16
1.4.1 Requerimientos nutricionales del ternero	17
1.4.2 Sistemas de alimentación	18
1.4.3 Manejo y crianza de terneros	19
1.6 Probióticos	21
1.6.1 Selección de cepas probióticas	22
1.6.2 Medios de cultivo para el crecimiento de cepas probióticas	24
CAPÍTULO II MATERIALES Y METODOS	27
2.1 <i>Preparación del medio de cultivo a base de suero de queso blanco y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya</i>	27
2.2 <i>Selección de la cepa utilizada, inoculación y fermentación de sustrato</i>	28
2.3.1 Análisis del crecimiento de las cepas del bioproducto en el sustituto lechero.	29
2.4 Determinación del costo de producción del bioproducto a escala de laboratorio.	29
2.5 <i>Animales e instalaciones</i>	30
2.6 <i>Conformación de los grupos</i>	30
2.7 <i>Identificación de los animales.</i>	31

<i>2.8 Control de parámetros productivos</i>	31
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Tabla 3.1 Comportamiento del pH a los diferentes tiempos y proporciones	34
3.1 Análisis del crecimiento de las cepas del bioproducto en el sustituto lechero.	38
Tabla 3.5 Determinación del costo de producción del bioproducto a escala de laboratorio	40
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

## INTRODUCCIÓN

Las etapas de cría del ternero son de vital importancia, debido a que al garantizar buenas bases nutricionales, de salud y manejo, los animales son menos susceptibles a desórdenes gástricos y a futuro hacer más eficaz la explotación lechera (Plazas & González, 2012).

En los últimos años se ha buscado alternativas para promover el crecimiento de los animales a través de una forma más segura, no sólo para el animal, sino también para preservar la salud humana como consecuencia de la antibioresistencia que generan su uso sistemático, este fenómeno ha favorecido la investigación de distintos productos entre los cuales destacan los agentes bioterapéuticos (probióticos, prebióticos y simbióticos), catalogados como productos de origen natural, beneficiosos para la salud, con propiedades biológicas activas y con la capacidad preventiva y terapéutica (Corzo *et al.*, 2015).

El término probiótico está definido como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un papel benéfico en la salud del hospedero” (Hill, 2014). Estos microorganismos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo, resistiendo la acción de los jugos gástricos y la bilis, además deben tener capacidad de colonizar y proliferar en este medio. Desde esas perspectivas diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) son evaluadas e incorporadas en el alimento (Gerald, 2018).

En los estudios con animales se utilizan microorganismos cultivados en el laboratorio o probióticos comerciales. En este sentido, los aspectos de mayor importancia son la selección adecuada de la cepa o cepas, el medio de cultivo y las condiciones fermentativas que permitan obtener un alto nivel de viabilidad durante el proceso (FAO, 2016).

En Cuba, a escala industrial, no se producen los aditivos probióticos para animales a pesar de que varios grupos multidisciplinarios de investigación trabajan en esta temática y disponen de microorganismos con estas características los cuales son resumidos por Sosa *et al.*, (2018).

Según Anadón *et al.*, (2016), los microorganismos más utilizados como probióticos son cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* y

levaduras. En la producción animal se obtienen y evalúan gran variedad de estos microorganismos en diferentes especies y categoría animal (Bai *et al.*, 2013, Afsharmanesh & Sadaghi 2014, Ahmed *et al.*, 2014).

En la Universidad de Sancti Spiritus se ejecutaron diferentes trabajos de investigación para el desarrollo de un producto probiótico que mejora el rendimiento productivo y la salud de los animales (Rodríguez *et al.*, 2009), aunque uno de los componentes del sustrato utilizado encareció el producto.

La selección de medios de cultivo adecuados y económicos para las pequeñas producciones y a escala industrial es un aspecto importante en la obtención de probióticos. Santos *et al.*, (2016) consideran que un medio de cultivo apropiado debe tener péptidos como fuente de nitrógeno, azúcares como fuente de carbono, extracto de levadura como factor de crecimiento, magnesio y manganeso en concentraciones óptimas; no obstante este mismo autor plantea que cuando se elige un medio de cultivo alternativo, hay que considerar factores como los costos, la capacidad de producir gran número de células y el método de fermentación.

La generación de subproductos o residuos agroindustriales en las diferentes etapas de los procesos productivos, es actualmente una problemática a nivel mundial, debido a que en la mayoría de los casos no son procesados o dispuestos adecuadamente, situación que contribuye al proceso de contaminación ambiental (Vargas & Pérez, 2018)

Los subproductos agroindustriales más utilizados (melaza, suero de leche, leche soya, vinaza, almidón, salvado de trigo, yuca) son fuentes disponibles que se pueden emplear de forma eficiente como medios naturales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos con actividad probiótica (Santos *et al.*, (2016).

En la agroindustria de la provincia de Sancti Spíritus, se liberan sin ningún tratamiento el suero de queso blanco y aquellos provenientes de la industrialización de la soya, generando altas cargas contaminantes; sin embargo existen varios reportes del uso del suero lácteo como sustrato para el desarrollo de microorganismos (Wang, 2013, Da Silva Almeida, Avi, & Barbisan, 2015; Rochin-Medina *et al.*, 2018), resultando menos estudiado el aprovechamiento de los residuales de soya (Lavari *et al.*, 2015, Coghetto *et al.*, 2016, Beret, 2018).

### **Problema científico:**

¿Cómo incrementar los indicadores productivos de los terneros con la utilización de un bioproducto probiótico multiplicados en medio a base de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya?

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, el problema científico de la presente investigación es el siguiente:

La crianza del ternero constituye la etapa más crítica de la vida productiva del ganado bovino. Durante el destete en recría, los terneros son susceptibles a los trastornos entéricos y desequilibrios en la microbiota digestiva, lo que unido a las enfermedades carenciales y a los trastornos en la inmunidad trae afectación en los indicadores productivos y el retardo en la incorporación de los animales a la unidad de desarrollo. A pesar de todas las ventajas referidas anteriormente para el uso de los probióticos, en el país no se aplican biopreparados desarrollados localmente a partir de residuos de la agroindustria en esta categoría en condiciones de producción que mejoren estas afectaciones.

### **Hipótesis Científica:**

La inoculación del medio a base de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya con cepas probióticas, permitirá obtener un bioproducto para la alimentación animal que favorece los índices productivos.

Para llevar a cabo la presente investigación se planteó como **objetivo general:**

Obtener un bioproducto probiótico desarrollado en un medio de cultivo a base de residuos de la industria láctea para uso en terneros

### **Como objetivos específicos:**

- Construir el marco teórico-referencial que sustentan la utilización de un biopreparado probiótico desarrollado en un medio de cultivo natural en la alimentación de terneros lactantes.
- Diseñar el bioproducto probiótico (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77) en diferentes proporciones de medio a base de suero lácteo y residual de la

línea de ablandamiento del grano de soya para su aplicación en terneros lactantes.

- Evaluar el efecto del bioproducto probiótico crecidos en medio a base de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya en indicadores productivos en terneros lactantes.

## **CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Agroindustria y residuos agroindustriales.**

Existen diferentes definiciones de agroindustria. Sin embargo, una de las más acertadas es la expuesta por (Saval, 2012) quien la define como una actividad económica que combina el proceso productivo agrícola con el industrial para generar alimentos o materias primas semielaboradas destinadas al mercado. Para la (FAO., 2018), la agroindustria puede clasificarse en 2 clases, la primera está conformada por las industrias alimentarias y las no alimentarias, mientras que la segunda está compuesta por las industrias proveedoras de materia prima (como la molienda de trigo y arroz) y consumidoras de materia prima (como la fabricación de pan).

Como resultado adicional a las actividades principales de las empresas que conforman el sector agroindustrial, se generan subproductos o residuos agroindustriales, que representan cantidades significativas y son considerados un problema ambiental (Restrepo, Rodríguez, & Manjarrés, 2011)

Según Saval (2012) y Rosas *et al.*, (2016) los residuos agroindustriales pueden ser definidos como materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y social.

Los residuos agroindustriales presentan un alto potencial de aprovechamiento gracias a su variada composición química, y se ve reflejado en la diversidad de alternativas existentes para su reutilización (Hull *et al.*, 2014). Es posible obtener de éstos, materia prima óptima para utilizarse en diferentes procesos y diversos productos de interés ambiental, social y económico. Así mismo, participan en la recuperación de medios abióticos contaminados con efluentes textiles, metales pesados e hidrocarburos (Gonzales, 2013; Saval, 2012).

Los subproductos agroindustriales y los residuos de cosecha constituyen en los países agrícolas una fuente importante de alimento, y en la mayoría de los casos, por falta de conocimiento y voluntad técnica, no son aprovechados de manera

adecuada. En los últimos años se han aumentado los esfuerzos destinados al estudio de las características nutricionales de los subproductos de la agroindustria, ya sea para la producción de carne o leche. El propósito es tratar de disminuir la utilización de granos que podrían ser destinados a consumo humano, teniendo en cuenta que aproximadamente la tercera parte de los cereales producidos en el mundo son consumidos por animales domésticos (Garcíaarena, 2011).

Existe básicamente tres grupos de tecnologías para la recuperación de residuos agroindustriales que corresponden a, la valorización biológica y química, la obtención de combustibles (derivados de desechos) y la valorización térmica (Yepes, Montoya, & Orozco 2008). El primer grupo es el de más interés en el trabajo ya que permite a partir de residuos orgánicos obtener pectinas, enzimas, aceites esenciales, fibra dietaria (alimento para animales y humanos), hongos comestibles, flavonoides y carotenoides que pueden ser comercializables utilizando procesos biológicos; mejorando así la calidad del ambiente y evitando afectaciones para la salud humana (Valdés &Palacios, 2016). Dentro de los residuos agroindustriales más utilizados para estos fines se incluyen las pastas proteicas, lodos, suero, salvado, mostos residuales, vinaza, residuos de material verde (cáscaras, hojas, tallos, bagazo de frutas), entre otros (Hernández, *et al.*, 2016).

No obstante, no se hace por este autor una declaración del uso de residual de la línea de ablandamiento del grano de soya que en función del tratamiento elegido para su ablandamiento puede ser más o menos rico en nutrientes. (Li *et al.*, 2019)

### **1.2 Uso de residuales de la agroindustria.**

El aumento del precio de la materia prima, ya sea los cereales y otros componentes, necesarios para la elaboración de concentrados u otro tipo de alimento para animales, crea la necesidad de buscar otras alternativas más económicas y que permitan obtener un producto con un valor nutricional óptimo. Varios de los residuos agroindustriales presentan una composición química y física que permiten ser utilizados para este fin, obteniendo resultados satisfactorios. Algunos han sido utilizados en la producción de alimentos para rumiantes, cerdos, aves y otras especies (Saval, 2012)

Dentro de los residuos agroindustriales más utilizados para estos fines se incluyen las pastas proteicas, lodos, suero, salvado, mostos residuales, vinaza, residuos de material verde (cáscaras, hojas, tallos, bagazo de frutas), entre otros (Hernández *et al.*, 2016). No obstante, no se hace por este autor una declaración del uso de residual de la línea de ablandamiento del grano de soya que en función del tratamiento elegido para su ablandamiento puede ser más o menos rico en nutrientes. (Li *et al.*, 2019)

El aprovechamiento de residuos agroindustriales (Ramírez, 2012), permite la obtención de materia prima para ser utilizada en diferentes procesos y en la elaboración de productos con un valor agregado, amigables con el ambiente y similares a los productos obtenidos con materias primas comerciales. Se ha documentado el uso de residuos agroindustriales como bioenergéticos, abono orgánico o compost y alimentos para animales (Chibás, Casanovas, & Pérez, 2017) no obstante, estos pueden ser utilizados en la elaboración de otros productos, muchos de los cuales están en fase de investigación.

### **1.2.1 Usos de la soya.**

La soya (*Glycine max* (L.) Merrill) es una de las líneas estratégicas en la seguridad alimentaria de todo el mundo, por el alto valor nutritivo que tienen sus semillas y nutrientes de calidad. Al igual que muchos cultivos económicamente importantes, está sujeto a las tensiones ambientales que reducen su rendimiento (Hernández, Guerra, Tobía, & Villalobos, 2013). En Cuba, la producción de soya (*Glycine max*L.) no representa un elemento importante en el sector agrícola vinculado a esta actividad; a diferencia de otros países donde se cultiva en diferentes zonas. (Buj & Concepci, 2014).

La soya (*Glycine max* (L.) Merr.) es una leguminosa de mucha importancia en el mundo por su gran cantidad de usos, alto contenido de proteína y energía, ya que en promedio el grano seco contiene 20% de aceite y 40% de proteína (Santacruz, 2015).

En general, el incremento de la demanda de soya se enmarca en el proceso del alza de la demanda mundial de alimentos debido a factores como: el aumento del poder de compra y del cambio en los patrones de consumo de gran parte de la

población mundial, especialmente debido al crecimiento económico prolongado de varios de los grandes países en desarrollo de Asia (Li *et al.*, 2019).

Actualmente la soya es la oleaginosa que más se produce en el mundo, en general se ha reportado 120 millones de hectáreas, de las cuales el 85.4% de dicha área es cultivada en América, con una producción de 181 millones de toneladas, que son utilizadas para obtener aceite y proteína para consumo humano y alimentación animal; sus granos son considerados muy versátiles, ya que pueden ser consumidos como semillas de soya, brotes de soya, y asimismo pueden ser procesados para obtener derivados como: leche de soya, tofu, salsa de soya y harina.(FAOSTAT, 2018)

La importancia de soya deriva principalmente de su pequeña relación con el tema alimentos y de ser un buen conservador de suelo ya que aporta nitrógeno al mismo. En Cuba su importancia radica en la elaboración de alimentos balanceados y su representatividad en la balanza comercial, debido a que las importaciones de este producto son significativas. Actualmente el país cuenta con una producción muy limitada de este producto

### **1.2.2 Residuales del proceso tecnológico de la leche de soya y sus usos.**

La soya es un producto agrícola que ha sido utilizado ampliamente para cubrir necesidades de la industria y en la formulación de diferentes alimentos. En general, el uso y la utilización de la misma son limitados a las semillas, mientras los desperdicios, como cáscara de la soja y otros residuales, es todavía descartado en muchos lugares y no han sido ampliamente utilizados a pesar de su valor biológico. Hidanah, Nazar, Safitri (2018),

Según Rivera (2004), en el mundo existen diversas tecnologías para obtención de leche de soya, que en dependencia de los productos finales que se vayan a elaborar, generarán también diversos tipos de residuos.

Por ejemplo, los residuos que se generarán durante la obtención de leche (o pasta) de soya para obtener productos alimenticios asiáticos como el misu y el tofu, diferirán en cuanto a su composición con aquellos que se obtendrán al producir leche de soya para elaboración de quesos, yogurt, o incluso salsas tipo mayonesas.

No obstante, en sentido general, puede decirse que cualquiera que sea la tecnología empleada puede obtenerse dos tipos de residuos en estos procesos:

- a) Sólidos secos o de baja humedad. Consistentes en cascarillas de frijol de soya, cuando el comienzo del proceso es a partir de granos sin descascarar, que pueden ser obtenidas en forma seca o húmeda en dependencia del proceso tecnológico de descascarado seguido, su eficiencia y del proceso posterior de obtención de leche o pasta de soya.
- b) Efluentes líquidos. Consistentes en residuos líquidos generados durante el proceso de remojo o cocción de la soya, fermentación de productos y limpiezas de equipos de procesos.

Es práctica común emplear los residuos sólidos como alimento animal. No obstante, se han estudiado la generación de biogás a través de la digestión de esos residuos sólidos generados en el procesamiento de la soya.

La tecnología cubana para la obtención de leche o pasta de soya también genera residuos sólidos secos compuestos principalmente por cascarillas de frijoles, que son separados del grano de soya mediante un equipamiento tecnológico apropiado. Estos residuos son empleados desde hace tiempo para la alimentación animal. Adicionalmente, se genera una cierta de cantidad de residual sólido con apreciable grado de humedad, que es removido del proceso mediante una criba de malla filtrante para ser finalmente dispuesto también como alimento animal.

Se generan a su vez, efluentes líquidos que pueden dividirse según su composición en dos corrientes principales (Tabla 1.1):

1. Efluentes líquidos que abandonan el tornillo sinfín o aguas de remojo del grano de soya, conteniendo cantidades significativas de oligosacáridos, que representan altos valores de concentración en DQO y DBO5.
2. Efluentes líquidos generados durante los procesos de limpieza manual de los equipos, con un menor valor de concentración en DQO y DBO5.

**Tabla 1.1 Características de los efluentes líquidos de la producción de leche de soya.**

Parámetro	Unidad	Efluente 1	Efluente 2
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/ L	21 870	563
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	mg/ L	15 000	250
pH		8.5	7.7
Sólidos Totales (ST)	mg/ L	19 716	515
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/ L	2 700	77
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	mg/ L	2 300	38
Nitrógeno Total (Nt)	mg/ L	348	29
Nitrógeno Orgánico (N-Org)	mg/ L	342	19
Fósforo Total (P)	mg/ L	54	2
Grasas	mg/L	80	

Resultados promedio de 10 muestras integradas tomadas en el Complejo Lácteo de la Habana según Valdés & Rivera (1997).



**Imágenes de los residuales generados en la Empresa "Rio Zaza"**

El residual generado en la industria cubana posee un potencial contaminante superior a la media internacional, tiene su explicación en el hecho de que en la tecnología desarrollada en nuestro país se hace un uso más integral del frijol de soya, pero comprometiendo también un mayor aporte del contenido del frijol a la

corriente de residuales, sobre todo en polisacáridos, que aportan materia orgánica pero poca cantidad de nitrógeno y fósforo (Valdés & Rivera 1997).

Por lo tanto, este es un residual de elaboración de leche de soya con características muy bien determinadas para nuestras condiciones, pero que difiere considerablemente de las reportadas usualmente para este tipo de industria.

Hidanah, Nazar, Safitri (2018), estos mismos autores en análisis de la cascara de soya reportan contenidos de materia seca (CP) = 91.11, proteína bruta (PB)= 5,04, (kcal/g) = 5.04, extracto graso = 1.65, calcio = 21, fósforo = 0.06, y energía metabolizable de 3.98. En otra investigación, la composición química de cáscara de la soja arrojó 47.01% FB, 14.45% PB, 3.04% de grasa, 3.15% de cenizas y 3.060,48 kcal kg de energía metabolizable.

Hidanah, Nazar, Safitri (2018) reportan buenos resultados en la calidad del huevo de patas ponedoras al incluir en la ración un fermentado de la cáscara de la soja, usando en el inóculo bacterias celulolíticas del género *Spodoptera* (*S. litura*); igualmente Hong & Ca (2013), utilizaron cepas del género *Aspergillus* y *Lactobacillus* en la fermentación de la cascara de soya, sin embargo la reducción de la fibra bruta no fue significativa (44% a 40%).

Gómez, 2011 incorporó el residual líquido del grano de soya para el crecimiento de micro algas con buenos resultados. Coghetto, 2016 en su investigación sobre el crecimiento y actividad fermentativa de cepas de *L. plantarum* BL011 aisladas de queso Serrano, utilizó un medio de cultivo alternativo libre de proteína animal donde incluyó residuo líquido ácido de la obtención de proteína de soya. Los resultados mostraron la posibilidad de incluir ese sustrato como una alternativa para producir probióticos, sin ingredientes derivados de animales para obtener concentraciones altas de la biomasa en bioreactores con costos minimizados. Constituye este el primer reporte de su uso como ingrediente de medio de cultivo para lactobacilos.

Beret, 2018, siguiendo el mismo principio de utilizar residuos agroindustriales evaluó medios de cultivo más económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus paracasei* 90, incluyendo el residual líquido proveniente de la obtención de proteína de soya, concluyendo que este residual puede ofrecer una

buena performance como medio de cultivo base para fermentos lácticos a un costo competitivo y con gran potencial de aplicación en quesería.

En particular, el medio base permitió un buen crecimiento de la cepa autóctona L90, que fue mejorado por la adición de glucosa y extracto de levadura. No obstante, sugiere continuar optimizando la formulación y evaluar posteriormente la actividad metabólica de la cepa luego del crecimiento en estos medios formulados.

En paralelo Raya-Medina, 2018, incluyó en su investigación sobre el uso en terneros de un bioproducto desarrollados en residuos de la industria láctea, el residual líquido obtenido de la línea de ablandamiento del grano de soya, en el proceso de producción de yogurt de soya. El trabajo incluyó combinación del 50 % del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya con el suero lácteo. Los resultados fueron comparables con los obtenidos con el yogurt de leche de soya al utilizar como variable de interés la acidez.

### **1.3 Usos e importancia del Suero lácteo.**

En la industria quesera el lactosuero obtenido en el proceso de producción de queso es aproximadamente el 90 % de la masa total de la leche utilizada y el mismo retiene cerca de 55 % del total de sólidos totales de la leche (Tabla 1.2). Algunas alternativas de utilización de este residuo han sido propuestas, pero son pocas las empresas que hacen aprovechamiento del mismo y las estadísticas indican que una importante porción de este residuo pasa a ser efluente el cual crea un serio problema ambiental(Ramírez Mestas et al., 2018),(Inda A. 2000).

**Tabla 1.2. Composición del suero lácteo.**

Componentes	Suero dulce	Suero ácido
Agua (%)	93-95	94-95
Materia seca (%)	6-6.7	5-6
Lactosa (%)	4.2-5	3.8-4.3
Grasa (%)	0.1-0.5	0.1-0.5
pH	6.3-7	4.1-6.5
DQO	> 100 000 mg O <sub>2</sub> /L	

El lactosuero es una materia prima excelente para obtener diferentes productos a nivel tecnológico; varios investigadores proponen reutilizar el lactosuero en diversos productos como ácidos orgánicos, alcoholes, bebidas fermentadas, concentrados proteicos entre otros.

Actualmente, la leche descremada y el suero de mantequilla no se obtienen en Cuba en cantidades significativas, debido a la escasez de la materia prima principal, la leche. El suero proveniente de la fabricación de quesos constituye el principal subproducto o materia prima secundaria de la industria láctea en Cuba y todavía en la actualidad está muy lejos de ser aprovechado racionalmente en la producción de alimentos para humanos y animal (Suárez-Solís, 2009)

En Cuba se producen altos volúmenes de suero de queso que tienen un bajo aprovechamiento industrial (Miranda, 2014). El aprovechamiento actual del suero de queso para el consumo humano a nivel nacional alcanza menos del 10 % de las Empresas Lácteas que obtienen suero, en la mitad de ellas el aprovechamiento no llega al 1 % (Suárez-Solís, 2009).

Para el suero de queso en el país se han descrito diversas aplicaciones, dentro de las que se destacan el lactosuero líquido para bebidas, proteínas del suero lácteo en sus formas de concentrados proteicos y aislados en alimentos lácteos (helados, yogures, productos untables y de bajas calorías), productos cárnicos (carnes procesadas, embutidos), panificados (bases para pasteles, galletitas, barras nutritivas), confitería (chocolates, coberturas, caramelos), bebidas (mezclas con cacao, crema para café, bebidas para deportistas) y lactosa para alimentos dietéticos, dulces y productos farmacéuticos (Parzanese,2017). Sin embargo, su diversificación para el uso en la alimentación animal ha sido menos investigada.

La utilización de suero de quesería para alimentación animal es una de las primeras alternativas de valorización para el pequeño quesero dedicado a la crianza de cerdos y terneros (Castells *et al.*, 2015).

En pequeñas unidades de producción, las formas de suministro tradicional del lactosuero al animal no requieren de inversión para su puesta en marcha, dado que comprenden el uso directo del lactosuero fresco en forma de agua de bebida, o bien, como sustituto parcial de raciones balanceadas.

Mayores esfuerzos de inversión serán requeridos cuando se considere el mejoramiento de la calidad de un alimento con el uso de lactosuero como conservador, tal es el caso de la elaboración de ensilajes o el incremento del valor nutricional del lactosuero como sustrato para el desarrollo de biomasa microbiana como fuente de proteína unicelular.

Miranda *et al.*, (2015) utilizaron suero de queso dulce para el crecimiento de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*. Estos autores obtuvieron concentraciones microbianas en el orden de  $10^8$  ufc•MI<sup>-1</sup> y, desde el punto de vista de comportamiento animal, ganancias medias diarias de 292 g/d, además de reducción de la incidencia de diarreas hasta 1.35 % en cerdos tratados con este producto.

### **1.3.1 Combinación del suero lácteo y residual del ablandamiento del grano de soya.**

La elaboración de un bioproducto fermentada del residual del ablandamiento del grano de soya con adición de suero de quesería, además de mejorar las cualidades nutricionales, a un bajo costo relativo, permite ampliar la gama de productos de alto valor nutricional para el consumo animal (Raya-Medina, 2018), y brinda una nueva alternativa para el aprovechamiento de un subproducto de la industria láctea que constituye, en no pocas ocasiones, fuente de contaminación del medio ambiente (Perea, 2006).

El desarrollo de productos con suero de quesería para alimentación animal ha cobrado importancia por su efecto comprobado como prebiótico, inmunomodulador, estimulador de la microbiota benéfica y mejorador del bienestar animal.

Por otro lado, el empleo como sustituto en raciones balanceadas resulta atractivo en términos económicos por la disminución en los costos de alimentación y mejora de los parámetros productivos.

Aunque el uso directo del lactosuero es un tema de discusión por los efectos negativos documentados en la salud animal, no se observan si los volúmenes de ingesta son adecuados para la especie de interés y la edad del animal, de igual

forma su conversión en bebida fermentada minimiza su acción laxante (Raya-Medina, 2018).

Con respecto a la alimentación animal, la valorización del lactosuero depende de la sustitución de la ración en las distintas fases de cría y ceba, por lo cual hay que evaluar la rentabilidad de las distintas opciones anteriormente mencionadas. Para tomar la decisión de sustitución del lactosuero por ración, la opción elegida tendrá que tener un incremento del margen de ganancia significativo respecto al uso actual y de los volúmenes disponibles.

Cuando se utilizan sustratos para producir biomasa microbiana deben considerarse los siguientes factores (Castells *et al.*, 2015):

a) Biodegradabilidad: puede ser estimada por la relación Demanda Bioquímica de Oxígeno: Demanda Química de Oxígeno (DBO: DQO). En el caso del suero, la relación es de hasta 2:1 mientras que para el residual de la línea de ablandamiento del grano de soya puede ser hasta (DBO=750 vs DQO=1093), lo que indica también alta biodegradabilidad.

b) Alcalinidad: el suero tiene baja alcalinidad lo cual es una fuente potencial de acidificación en el proceso de biodigestión, lo que hace necesario el agregado de alcalinizantes para evitar la baja productividad del proceso. El residual de la línea de ablandamiento del grano de soya muestra un alto grado de alcalinidad (pH 8,5) por lo que mediante la combinación de suero y residual de soya es posible eliminar este agregado luego de alcanzar la estabilidad de funcionamiento del proceso fermentativo.

c) Nutrientes: desempeñan un rol importante en el proceso de degradación y la consecuente producción de ácido láctico. La literatura indica que el contenido de magnesio, potasio, calcio y fósforo es importante para el proceso de biodigestión. Resulta indispensable realizar ensayos de laboratorio preliminares de suero, residual de la línea de ablandamiento del grano de soya y de sus mezclas para determinar la adecuada proporción de cada sustrato. Dichos ensayos posibilitarán además la elección del diseño y condiciones de trabajo adecuadas a las diferentes escalas.

#### 1.4 Generalidades de la Anatomía y fisiología digestiva del ternero

El ganado vacuno tiene dos tipos de especies: *Bos taurus*, tiene como origen Europa, en esta especie es la que mayor variabilidad genética en temperamento lechero y carne. *Bos indicus*, tiene su origen en la India su principal característica es la presencia de una joroba entre sus hombros, tiene mayor presencia en África y Asia que en América (Márquez, 2012).

El cambio acelerado que sufren los animales de producción obliga al hombre a crear un proceso, el cual tiene como definición el mantener viva a la cría alejada de su madre, depende mucho del objetivo, por ejemplo en la ganadería de carne el proceso dura alrededor de los 5-6 meses de edad, en los hatos ganaderos para producción de leche la cría permanece junto a su madre máximo 3 días y mínimo 1 día (Lagger, 2010).

En la anatomía de los rumiantes se describen como estructuras anatómicas el Rumen que está compuesto de numerosas papilas variables en tamaño y forma, es donde se produce la fermentación microbiana anaeróbica; el *Retículo* que tiene como función la movilización del alimento al rumen, aquí también existe una población densa de microorganismos (bacteria, protozoos y hongos); *Omaso*, su función es la reducción del tamaño de partículas y ayuda con el paso del bolo digestivo hacia el abomaso y el *Abomaso* que es el principal estómago funcional del animal, el alimento que ingiere el ternero en los primeros días es principalmente lácteo, donde el abomaso tiene la principal función, en el interior se forma coágulos pequeños con ayuda de enzimas (renina y pepsina), permitiendo una liberación estable de nutrientes. Puede tomar de 12 a 18 horas para que la leche cuajada sea completamente digerida. (Matute & Sirias, 2007).

El Intestino Delgado inicia desde el píloro hasta la unión del ciego con el colon ascendente, se subdivide en: duodeno, yeyuno e íleon (Juaquiera & Morson, 2011). El intestino delgado además está compuesto por tejidos y microvellosidades. Las microvellosidades que tienen como función el intercambio de sustancias entre tejidos y medio extracelular. Así mismo, del pliegue interno se puede observar una estructura denominada, las criptas, que están cubiertas con

células epiteliales más jóvenes las cuales están implicadas primariamente en la secreción (Blum Jw, 2000).

En el intestino delgado se lleva a cabo la mayor parte de la absorción de nutrimentos, y la digestión principalmente proteica. Por su composición tiene la capacidad de absorber agua, minerales y productos de digestión (glucosa, grasa, etc.).

El Intestino Grueso está compuesta por tejido conectivo laxo, con una población celular similar a la del intestino delgado, es decir también tienen vellosidades intestinales, y criptas. Sus funciones son las de absorción de agua, concentración de contenido intestinal y la excreción, lleva a cabo la descomposición de sustancias no digeribles y no absorbibles, gracias a la acción de bacterias saprofitas (Blomm, 1992).

Morán (2002), citado por INIA, (2014) indica que los terneros no han desarrollado aún la capacidad de digerir pasturas por esta razón, la única cavidad que está activa es el abomaso, además tienen un intestino delgado funcional que permite la digestión alcalina de los alimentos gracias a las vellosidades intestinales.

La leche es canalizada desde el esófago vía el surco esofágico hacia el abomaso. El proceso de ingesta de la leche empieza en la boca, dirigiéndose hacia la garganta, luego la tráquea, la leche pasa por un pequeño canal en la pared ruminal el cual se abre y cierra de acuerdo a diferentes estímulos, por esta razón la leche es desviada al abomaso donde se forma un coágulo firme dentro de pocos minutos bajo la influencia de las enzimas renina y pepsina, esto permite una liberación estable de los nutrientes a través del estómago y eventualmente, hacia el torrente sanguíneo.

#### **1.4.1 Requerimientos nutricionales del ternero**

Los requerimientos nutricionales se definen como las cantidades mínimas de nutrientes que deben estar presentes en la dieta para que los animales puedan desarrollarse y producir normalmente (Guevara, 2008), este autor define las necesidades fundamentales.

Necesidades de energía: El desarrollo de los terneros durante los primeros meses de vida depende de la nutrición y se ve afectado por la incidencia de trastornos digestivos, esto puede ser un problema en las explotaciones ganaderas ya que es necesario reducir el tiempo que tardan las crías en llegar a su etapa de producción. En los requerimientos energéticos de animales hasta 40 kg de peso, no se hace distinción entre razas pequeñas ni razas grandes. El consumo insuficiente de energía expresa rendimientos bajos, poco crecimiento del animal y mayor susceptibilidad a enfermedades.

Necesidades de proteína: La proteína Cruda (PC) en nutrición animal, se define con el contenido de nitrógeno por una constante 6.25. La definición se basa en la asunción de que el contenido promedio de nitrógeno (N) en los alimentos es igual a 16 gramos por cada 100 gramos de proteína. Para animales que consumen leche o reemplazador de leche y alimento balanceado con pesos que oscilan entre los 30 y 80 kg y ganancias diarias desde los 0,10 hasta los 0,60 kg.d-1

Necesidades de Agua. Las necesidades de agua se relacionan con el tipo de alimento consumido por el animal, alimentos basados en forrajes verdes requieren de poco suministro de agua, ya que los forrajes poseen un contenido hídrico del 70 al 80% y un contenido de materia seca del 20 al 30%, mientras que si la alimentación es a base de concentrado, el suministro de agua debe ser ad libitum, además, es indispensable que el agua suministrada sea de buena calidad para evitar la proliferación de enfermedades, una restricción de agua ocasiona la disminución del consumo de los alimentos.

#### **1.4.2 Sistemas de alimentación**

Los sistemas de alimentación para la crianza de los terneros es uno de los puntos más críticos para el desarrollo y salud de estos, por lo que es importante elaborar dietas, tomando en cuenta factores como: el clima, la ubicación del predio, la infraestructura, la edad y raza del ternero. La desventaja del sistema de alimentación es la dieta mal formulada; los animales pueden sufrir estrés físico que se refleja en síntomas como: hambre, sed, lesiones, fatiga, condiciones termales extremas, o estrés psicológico: restricción de los movimientos,

prácticas de manejo, cambios imprevisto. La alimentación puede ser de forma tradicional donde se le suministra una constante cantidad de leche diaria que es equivalente al 8-10 % de su peso vivo según (Lagger, 2010) y la alimentación intensiva Van Amburgh (2014), donde se puede llegar a 6 litros por día con 20 % Proteína Bruta (PB).

#### **1.4.3 Manejo y crianza de terneros**

La crianza de terneros constituye uno de los aspectos más importantes de la producción ganadera, ya que es punto de partida tanto para la producción de leche como la de carne.

Esta crianza presenta complejidades que es preciso conocer por los diversos cambios a que está sometido el animal a causa del ambiente físico y a otras variaciones introducidas por el hombre (Calzadilla *et al.*, 2006).

Las condiciones espirituanas y cubanas en general de producción pecuaria destinada a la crianza de terneros, se caracterizan en la mayoría de los casos por una baja tasa de conversión y aprovechamiento del alimento que se traduce en una ganancia media diaria de peso deficiente.

Lo anterior atenta contra la productividad y la propia rentabilidad de los sistemas ganaderos. En este contexto el uso de aditivos biológicos como los probióticos abren nuevas perspectivas.

#### **1.5 Enfermedades comunes en terneras**

La diarrea es la causa más común de muerte en terneras jóvenes y casi siempre se puede evitar con buen manejo. Las bacterias, virus o parásitos pueden causar diarrea en los terneros, y usualmente la ternera se infecta con más de un agente. La edad de inicio de la diarrea puede usarse como guía para los agentes más probables, pero el color y la consistencia de las heces no son indicadores confiables de la causa de diarrea (Maldonado *et al.*, 2018).

Los agentes que con mayor frecuencia son responsables de la diarrea en terneros son:

### ***Escherichia coli***

La *Escherichia coli* es una bacteria GRAM negativa, aeróbica y anaeróbica facultativa, que puede producir en los 10 primeros días de vida la colibacilosis o enfermedad de la diarrea blanca de los terneros. La *E. coli* enterotoxigénica es considerada una de las mayores causantes de diarrea en becerros, la cual posee dos factores importantes de virulencia. El primero permite a la bacteria adherirse y colonizar las vellosidades intestinales y el segundo corresponde a la producción de una entero toxina, la cual conduce a un exceso de secreción de líquido hacia la luz intestinal, produciendo como consecuencia una diarrea secretoria con pérdida de bicarbonato que conlleva a una severa acidosis con rápida deshidratación y postración del animal. Los antibióticos rara vez afectan el desenlace de esta enfermedad; la administración de electrolitos es crítica para la supervivencia. La vacunación de las vacas secas y una buena administración de calostro pueden eliminar este problema (Hoet & Boscán, 2015).

### ***Salmonella spp***

Se presenta como una enteritis aguda que afecta principalmente a los terneros, la cual puede evolucionar a una enteritis crónica, septicemia, o un estado subclínico de portador. La *Salmonella* 19 entérica es una bacteria Gram negativa, anaeróbica facultativa, móvil, que no esporula. Puede sobrevivir por 9 meses o más en el ambiente, es sitios tales como granos húmedos, agua, partículas fecales, materia prima de origen animal, sobre todo en harinas de pescado o de sangre y hueso.

Existen más de 2500 serotipos de *Salmonella*, sin embargo la *S. Dublin* está adaptada a los bovinos y al manifestarse la enfermedad se hace endémica en el rebaño o la finca dado que los animales que se recuperan de la infección causada por este serotipo se vuelven portadores y por un largo tiempo diseminan constantemente el agente infeccioso al ambiente a través de las heces y la leche, convirtiéndose en importantes transmisores (Hoet & Boscán, 2015).

### ***Rotavirus***

Muchos de los virus entéricos están permanentemente en el ambiente, lo cual se evidencia por una alta seroprevalencia (50 a 100%) en los animales. El rotavirus es la causa más común de diarrea neonatal bovina, presentándose principalmente

entre los 3 y los 14 días posteriores al nacimiento. El calostro de vacas vacunadas puede proteger a los terneros por hasta 4 días. La infección puede ser de corta duración, pero la cubierta intestinal debe recuperarse del daño (Hoet & Boscán, 2015).

La diarrea es característica de un complejo de agentes etiológicos y que para su manifestación deben concurrir diversos factores epidemiológicos, incluyendo el agente etiológico (virus, bacterias y protozoos), el huésped, la transferencia de inmunidad pasiva y las condiciones ecológicas (Camargo *et al.*, 2017, (Castillo *et al.*, 2018). (Camargo *et al.*, 2017).

Estas patologías infecciosas tienen una repercusión económica en la actividad ganadera, pues implican tratamientos veterinarios y mano de obra adicional, además del retraso en el desarrollo corporal de los animales afectados y la posibilidad de contagio a otros terneros que conviven con el afectado (Tepan, 2011).

Actualmente existe gran interés en reemplazar los antibióticos por otros compuestos más naturales como los probióticos; los cuales son considerados como aditivos alimentarios de microorganismos (Rondón *et al.*, 2013).

## **1.6 Probióticos**

La FAO (2013), define los probióticos como microorganismos benéficos vivos que conservan sus actividades fisiológicas y metabólicas; mezclados con sus metabolitos y medios en los cuales crecieron, que al ser administrados en dosis adecuadas, confieren un beneficio de salud al receptor ya que se activan una vez que colonizan el intestino, por lo que los probióticos, además de nutrir a quien los consume, colonizan el intestino modificando positivamente la flora intestinal y mejorando el funcionamiento del sistema inmune.

El término probiótico está definido como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un papel benéfico en la salud del hospedero” (Hill, 2014). Estos microorganismos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo, resistiendo la acción de los jugos gástricos y la bilis, además deben tener capacidad de colonizar y proliferar en este medio.

Desde el punto de vista bioterapéutico, estos mecanismos pueden ser clasificados como farmacocinéticos (resistencia a acidez gástrica, proteólisis y capacidad de alcanzar alta densidad de población en el tracto gastrointestinal) y farmacodinámicos (antagonismo directo, efecto antisecretor y efecto trófico) (FAO., 2013).

### **1.6.1 Selección de cepas probióticas**

La selección de la cepa o cepas microbianas es el primer paso para la concepción de un producto probiótico. Estos deben ser microorganismos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y tolerar pH bajos y altas concentraciones de sales biliares (Pintado *et al.*, 2014). Otras características deseables es la capacidad de adherencia de las cepas probióticas al epitelio intestinal para su posterior colonización, ser microorganismos estables genéticamente y poseer altas velocidades de crecimiento (Endo & Gueimonde 2016).

Además, la cepa elegida debe mantener su viabilidad y actividad probiótica durante los procesos de fabricación, transporte y almacenamiento (Dima *et al.*, 2014 & Anadón *et al.*, 2016).

Según informes de FAO/WHO (2002), los probióticos deben tener una concentración mínima de  $10^6$ - $10^7$  células mL<sup>-1</sup> o g<sup>-1</sup> de producto para garantizar su eficacia. Asimismo, se deben considerar otros aspectos, como la dosis, frecuencia y modo de aplicación, edad y estado fisiológico del hospedero.

La especificidad de la acción depende de la única o varias cepas que se empleen en los productos (Endo & Gueimonde 2016), por lo que antes de su producción, comercialización y aplicación se deben identificar correctamente, caracterizar *in vitro* y evaluar *in vivo*.

La FAO (2016) clasificó los probióticos en cuatro grandes grupos: bacterias y no bacterianas, microorganismo esporulados y no formadores de esporas, individuales y multicepas y por último aislados del huésped o extraños al huésped. Según Anadón *et al.*, (2016), los microorganismos más utilizados como probióticos son cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* y levaduras.

En la literatura científica disponible, la mayoría de los estudios solo toman en cuenta ensayos in vitro para demostrar las potencialidades probióticas de las cepas. (Miranda *et al.*, 2017, AIGburi *et al.*, 2016). Generalmente esos microorganismos crecen a bajos pH y a altas concentraciones de sales biliares, y son capaces de producir compuestos antimicrobianos e inhibir el crecimiento de especies patógenas, lo que les confiere potencialidades como probióticos

En la producción animal se obtienen y evalúan gran variedad de estos microorganismos en diferentes especies y categoría animal. En este sentido, Bai *et al.*, (2013) demostraron la estimulación del sistema inmune, sin afectar los rendimientos productivos, cuando utilizaron en la dieta de pollos de ceba un probiótico multiespecie con *Lactobacillus fermentum* JS y *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de 107 ufc•g<sup>-1</sup> y 106 ufc•g<sup>-1</sup>.

Afsharmanesh & Sadaghi (2014) informaron mejoras en los rendimientos productivos de esta especie animal, así como aumento de la relación altura de las vellosidades/profundidad de la cripta en el duodeno, al suministrar una cepa probiótica de *Bacillus subtilis*.

Ahmed *et al.*, (2014) señalaron los beneficios de incorporar en la dieta una dosis de 20 g de *Bacillus amyloliquefaciens*/kg de alimento mediante el incremento de los niveles de inmunoglobulina y la disminución de *Escherichia coli*.

A pesar de los avances alcanzados en Cuba en la obtención y evaluación de probióticos en animales, son escasas las investigaciones para llevar a nivel de producción estos aditivos.

La mayoría de los estudios se centran en la búsqueda de nuevas cepas, y queda un vacío en el desarrollo del proceso tecnológico para la obtención de probióticos a escalas superiores. Esto resultaría de gran interés en la alimentación animal desde el punto de vista económico y productivo.

### **1.6.2 Medios de cultivo para el crecimiento de cepas probióticas y fermentación.**

La selección de medios de cultivo adecuados y económicos para las producciones a escala industrial es un aspecto importante en la obtención de probióticos. Generalmente, los medios de cultivo se seleccionan según las características

fisiológicas de la cepa de interés. Aunque Santos *et al.*, (2016) consideran que un medio de cultivo apropiado debe tener péptidos como fuente de nitrógeno, azúcares como fuente de carbono, extracto de levadura como factor de crecimiento, magnesio y manganeso en concentraciones óptimas.

Uno de los medios selectivos más utilizados para el aislamiento, identificación y crecimiento de bacterias ácido lácticas es el De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, pH  $6.2\pm 0.2$ ). Según Santos *et al.*, (2016), MRS puede ser más selectivo o diferencial en función de las modificaciones que se realicen a su composición. De forma general, los medios sintéticos se usan ampliamente para el crecimiento de cepas probióticas a nivel de laboratorio. Cuando se elige un medio de cultivo industrial, los tecnólogos consideran factores como los costos, la capacidad de producir gran número de células y el método de fermentación. Se plantea que, aproximadamente, 30 % del costo total de la fermentación lo constituye el costo del medio de cultivo

Por las razones anteriores, es necesario empeñar esfuerzos en la búsqueda de fuentes de nutrientes más económicas para la producción de biomasa probiótica a escalas superiores. El uso de residuos agroindustriales, como sustratos para el crecimiento microbiano, tiene gran importancia, puesto que aborda dos problemas fundamentales.

Suministra fuentes de carbono y nitrógeno menos costosas y, por ende, disminuye los costos de producción, y permite la utilización de desechos que deberían ser tratados antes de su eliminación, lo que le agrega valor a estos últimos.

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

A su vez, Rondón (2009) & Milián (2009) también diseñaron medios con miel final y un hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* para el cultivo de *L.*

salivariusC65 y *B. subtilis*E44, respectivamente, este mismo medio a base de miel final y levadura con modificaciones ajustadas a los microorganismos evaluados fue utilizado por Miranda JE, (2018).

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

La fermentación es la etapa más compleja en la producción de los probióticos o cualquier aditivo microbiano. Esta etapa consiste en la utilización de los componentes del medio de cultivo para producir células microbianas en gran concentración, productos extracelulares (por ejemplo, ácido láctico), enzimas, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos farmacéuticos (FAO 2016). Además, se puede realizar en presencia o ausencia de oxígeno, denominada fermentación aerobia o anaerobia, respectivamente. (Alfonso *et al.*, 2011).

Existen diferentes métodos de fermentación para la producción de probióticos a nivel industrial. Entre ellos se incluyen las fermentaciones discontinuas, continuas y la alimentación incrementada (Alfonso *et al.*, 2011).

Los procesos discontinuos son los más utilizados, por ser los menos costosos y fue el utilizado en el presente trabajo. Las fermentaciones discontinuas consisten en mezclar el sustrato y el inóculo en un biorreactor cuando es a escala industrial y no añadir o eliminar ningún componente durante el crecimiento. Cuando se alcanza la concentración celular deseada o el producto de interés, se detiene la fermentación y se repite el proceso (Santos *et al.*, 2016).

### **1.6.3 Mecanismos de acción de los probióticos**

Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal y competencia por nutrientes, esto se refiere a la capacidad de los organismos Probióticos de competir con bacterias patógenas por un lugar en la pared intestinal y por nutrientes para pegarse al epitelio (Kleerebezem *et al.*, 2019). La segunda es la producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, entre otros que reducen el número de células patógenas, perturbando la producción de toxinas, la tercera es la alteración de los niveles de pH y oxígeno volviendo el medio mortal para los patógenos.

No todos los microorganismos probióticos utilizados en la alimentación animal inducen el mismo tipo de efectos ni con la misma intensidad sobre la respuesta inmune o sobre los microorganismos presentes en el intestino por lo que se debe analizar cuáles son los microorganismos probióticos idóneos para cada especie animal o para una situación determinada (Ma & Suzuki, 2018)

A nivel del intestino se refieren cuatro efectos de los probióticos y estos son: Primero, interfieren en su metabolismo o en la producción de toxinas; la producción de ácidos grasos volátiles, principalmente los ácidos lácticos por parte de las bacterias ácido lácticos reducen la colonización del intestino por parte de las bacterias patógenas. Segundo, competencia por receptores de adhesión: algunos probióticos se adhieren a la pared intestinal y por lo tanto compiten por los sitios de adhesión. Tercero, competencia por nutrientes: aunque el intestino es muy rico en nutrientes y es poco probable que se compita por nutrientes, la disminución de solo un nutriente puede influir en la composición de la microbiota. Cuarto, estimulación de la inmunidad: se ha encontrado que los lactobacillus estimulan la actividad de los macrófagos contra diferentes especies de bacterias ya sea por absorción de antígenos específicos o translocación del lactobacilo al torrente sanguíneo (Hoet & Boscán, 2015).

## **CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS**

*Área de estudio.* El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de leche de la Unidad Empresarial de Base (UEB) Pasteurizadora, de la Empresa "Rio Zaza". Sancti Spíritus, Cuba y en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA).

### **Materia prima.**

#### ***Suero de queso Blanco.***

El suero lácteo fue obtenido en el área productiva de Queso Blanco, en la etapa de desuere de la masa, el mismo se recolectó (500mL) en frascos de cristal estériles de 1000 mL y refrigerado hasta su utilización. Al suero obtenido se le realizó los análisis establecidos por la Norma Cubana de queso Blanco (NC 78-17, 2003), valorándose la acidez.

#### ***Residual de la línea de ablandamiento del grano de soya.***

La infusión de soya se recolectó del proceso de hidratación y ablandamiento del grano de soya empleado en la fabricación de Soyur; el mismo se recolectó en frascos de cristal estériles (500 mL) y se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración hasta su utilización. A la infusión de soya se le determinó la acidez, tomando como referencia la Norma Cubana de leche Pasteurizada (NC-71: 2000).

### **2.1 Preparación del medio de cultivo a base de suero de queso blanco y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya (MSQB+RAGS).**

Se utilizó como sustrato una mezcla de residual de la línea de ablandamiento del grano de soya y suero de Queso Blanco tomando como proporción de partida 50 % (v/v) (Raya-Medina, 2018). A partir de esta proporción se hicieron las diferentes combinaciones (Tabla 2.1).

Las combinaciones se trabajaron en 5 réplicas, agitando durante 5 minutos y sometida a un proceso de esterilización a una temperatura de 120°C durante 15 min y 1 atmósfera. (Sakura, Rusia); una vez esterilizada la mezcla fue enfriada a una temperatura de 43°C hasta su inoculación.

**Tabla 2.1. Proporciones de cada residual utilizado en la investigación (MSQB+RAGS).**

	Proporciones	Suero de queso blanco (SQB)	Residual de la línea de ablandamiento del grano de soya (RAGS)
I	50 % (v/v)	500 mL	500 mL
II	75 % (v/v)	250 mL	750 mL
III	90 % (v/v)	100 mL	900 mL
IV	100 %	-	1000 mL

## **2.2 Selección de la cepa utilizada, inoculación y fermentación del sustrato.**

Se emplearon las cepas fermentativas *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77 pertenecientes al Banco de Microorganismos del Departamento de Veterinaria de la Universidad de Sancti Spiritus (UNISS) y el Laboratorio Lácteo Sancti Spíritus.

Posterior a la esterilización de las diferentes proporciones del medio natural (MSQB+RAGS) se dejó enfriar, atemperado a 43°C, una vez que alcanzó la temperatura óptima de crecimiento se procedió a realizar la inoculación con la simbiosis de gérmenes (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77) al 2,5 % v/v tomando como referencia la Norma Ramal de la Industria Alimentaria (NRIAL 045: 08) y se incubó a temperatura de 37 °C (Tiempo 0) por 64 h.

A partir del tiempo cero (T<sub>0</sub>) y a las 14 h, 24 h y 64 h se realizó el estudio de crecimiento bacteriano en el tiempo para determinar si las cepas de ensayo (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77), se desarrollaron favorablemente en las diferentes proporciones del medio de cultivo natural (MSQB+RAGS).

## **2.3 Análisis físico químico del bioproducto.**

A las muestras de cada uno de las réplicas se le determinó en los diferentes tiempos (T<sub>0</sub>, T<sub>14</sub>, T<sub>24</sub>, T<sub>64</sub>) los siguientes indicadores: acidez titulable (%) (NC-71: 2000) y pH Metrohm; los cuales son indicadores indirectos del crecimiento de la biomasa microbiana. Para valorar indirectamente el incremento de crecimiento se

consideró los diferenciales de acidez y de pH; donde  $\text{Diferencial pH/Acidez} = \text{pH/Acidez del tiempo de Incubación (Tn)} - \text{Tiempo inicial (To)}$ .

### **2.3.1 Análisis del crecimiento de las cepas del bioproducto en el sustituto lechero.**

Para corroborar la supervivencia de las cepas del bioproducto (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77) en el sustituto lechero que constituyó el vehículo para administrarle el aditivo a los terneros en el ensayo de campo; se preparó por triplicado Erlenmeyer de cristal con 12 g de sustituto lechero y 100 mL de agua destilada, posteriormente fueron esterilizados en autoclave (Sakura) a 121 °C y una atmósfera por 15 min; se dejó enfriar y una vez que alcanzó la temperatura óptima de crecimiento se procedió a realizar bajo flujo laminar la inoculación con la simbiosis de gérmenes del bioproducto al 2,5 % v/v (To), tomando como referencia la Norma Ramal de la Industria Alimentaria (NRIAL 045: 08) y se incubó a temperatura de 37 °C por 48 h (T48).

A las muestras de cada uno de las réplicas se le determinó en los diferentes tiempos (To y T 24) los siguientes indicadores: acidez titulable (%) (NC-71: 2000) y pH Metrohm; los cuales son indicadores indirectos del crecimiento de la biomasa microbiana. Para valorar indirectamente el incremento de crecimiento se consideró los diferenciales de acidez y de pH; donde  $\text{Diferencial pH/Acidez} = \text{pH/Acidez del tiempo de Incubación (Tn)} - \text{Tiempo inicial (To)}$ .

### **2.4 Determinación del costo de producción del bioproducto a escala de laboratorio.**

Para determinar el costo de producción del biopreparado a escala de laboratorio se procedió a la búsqueda de la información económica necesaria para cada uno de los elementos o componentes que intervienen en el proceso.

### **ENSAYOS DE CAMPO.**

#### **2.5 Animales e instalaciones.**

El trabajo se realizó en la recría de terneros de la UEB “Dos Ríos”, Empresa Pecuaria Managuaco, Sancti Spíritus, Cuba.

Se utilizaron 27 terneros Holstein (*Bos taurus*) con una edad promedio de 7-10 días de vida. La crianza artificial fue sobre cunas individuales alojadas en naves techadas de piso de cemento.

### **Composición de los alimentos.**

Los alimentos utilizados en la crianza de los animales no fueron suplementados con antibióticos.

Todos los animales se alimentaron a lo largo del experimento con sustituto lechero y el pienso racionados directamente en el comedero 2 veces al día; el agua *ad libitum* y el manejo en correspondencia con el flujo zootécnico, (Anexos 1-4).

### **2.6 Conformación de los grupos.**

Se conformaron tres grupos de animales (tabla 2.2), con las características siguientes:

I- Grupo control. Estuvo sometido al sistema vigente de explotación, no recibió ningún producto. Su composición fue de 9 animales.

II- Grupo Bioproducto probiótico. Se le administró a los terneros mezclados con el sustituto lechero, la primera dosis se aplicó el primer día del experimento ( $T_0$ ) y las siguientes con intervalo de 3 días, en proporción de 20 mL por animal, durante 45 días ( $T_F$ ) que duró el experimento. La concentración de las cepas fue de  $8 \times 10^8$  ufc/mL de cada cultivo. Su composición fue de 9 animales.

III- Grupo Bioproducto probiótico. Se le administró a los terneros mezclados con el sustituto lechero, la primera dosis se aplicó el primer día del experimento ( $T_0$ ) y las siguientes con intervalo de 3 días, en proporción de 30 mL por animal, durante 45 días ( $T_F$ ) que duró el experimento. La concentración de las cepas fue de  $8 \times 10^8$  ufc/mL de cada cultivo. Su composición fue de 9 animales.

### **2.7 Identificación de los animales.**

Antes del comienzo del experimento a cada ternero se le asignó un número y se marcó adecuadamente con una tirilla para facilitar su alimentación y el monitoreo durante la fase experimental.

**Tabla 2.2 Volúmenes de bioproducto utilizados en el experimento**

Grupos	Dosis (mL)	No animales	Bioproducto (BP) utilizado en 1 día	BP utilizado en la Semana	BP utilizado Período
I	0	9	0	0	0
II	20	9	180	540	3240
III	30	9	270	810	4860
Total		27	450	1350	8100

### **2.8 Control de parámetros productivos.**

A los terneros de los grupos problema y testigo se le realizó controles de peso vivo y ganancia de peso. El peso vivo se comprobó midiendo el perímetro torácico del animal con la cinta métrica, auxiliándose de la tabla de conversión elaborada por Corzo et al. (1999) y citado por del Valle-Pérez ,( 2017); la ganancia media diaria se determinó a partir de las diferencia entre los pesos iniciales ( $T_0$ ) y finales ( $T_f$ ) y se expresó en gramos por animales por días según describe (Soto *et al.*, 2014). El pesaje se realizó a los 45 d al 100 % de los animales. El peso se estimó durante el horario de la mañana, con los animales en ayuna.

### **Control del estado de salud.**

Se determinó diariamente el consumo de agua y la frecuencia de cualquier síntoma de enfermedad.

### **Análisis de datos.**

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza de clasificación simple para las variables acidez y pH del MSQB+RAGS, incremento en peso, peso final, ganancia media diaria. Para la comparación del estado de salud (presencia de enfermedad) se aplicó un test de proporciones; utilizando en todos los caso el paquete estadístico SPSS 11.5 (SPSS, 2006). Por existir diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los pesos iniciales promedios de los tres grupos en estudio, y ser conocida la relación entre este y el peso final de los animales, se hizo necesario

ajustar este último teniendo en cuenta el efecto del peso inicial como covariable, realizándose para ello un análisis de varianza Univariante del Modelo Lineal General (Ríos, Reyes, Rodríguez, 1998). El incremento de peso y la ganancia media diaria se calcularon a partir del peso final ajustado.

### **CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la tabla 3.1 se presentan los resultados de crecimiento de las cepas de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77 en cada una de las proporciones de suero de queso blanco y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya (MSQB+RAGS); teniendo como referencia los valores de acidez y pH (expresado en % de ácido láctico y valor de pH). Se reconoce que la acidez y el pH son métodos indirecto que se pueden utilizar para la determinación del crecimiento bacteriano, cuando se pretende optimizar el medio de cultivo se debe tener en cuenta que la actividad microbiana no solo se afecta por los componentes del biopreparado y sus concentraciones, sino también por las interacciones entre estos (Sosa *et al.*, 2018).

Del procesamiento estadístico de los datos de las diferentes combinaciones utilizadas resultó que la acidez y el pH reflejan los valores máximos en la concentración del 75 % (v/v) y estos disminuyeron hacia la concentraciones del 90 % (v/v) y 100% (v/v) del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya al compararlas con el patrón (50% (v/v) ( $p \neq 0.5$ ). La acidez difiere estadísticamente en todos los grupos y en todos los tiempos, mientras que en el pH no se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones de 50 % (v/v) y 75 % (v/v) a tiempo cero y las 14 h. A partir de las diferentes concentraciones se puede apreciar, que el factor de mayor influencia en la variable respuesta fue la concentración de suero lácteo, lo cual indica que los niveles de lactosa que se utilizaron afectan el nivel de actividad microbiana.

Los valores de los diferenciales de acidez y del pH en todos los casos (Fig.3.1y 3.2) muestran una tendencia ascendente que se hace más notable a partir de las 24 h. El análisis estadístico evidenció que en la acidez no se encontraron diferencias significativas a las 14 h entre las concentraciones de 50 % (v/v) y 75 % (v/v), comportamiento que se mantuvo en el valor de pH; no obstante a esos tiempo el valor de pH de la concentración del 90 % (v/v) solo difiere del 100%.

**Tabla 3.1. Comportamiento del pH a los diferentes tiempos y proporciones del MSQB.**

Prop	To	T14	T24	T64	Et T0	Et T14	Et T24	Et T64
50 %	4,546 <sup>a</sup>	3,850 <sup>a</sup>	3,666 <sup>c</sup>	3,404 <sup>a</sup>	0,05793	0,00447	0,00510	0,01568
75 %	4,626 <sup>ab</sup>	3,832 <sup>a</sup>	3,778 <sup>b</sup>	3,538 <sup>b</sup>	0,03682	0,00735	0,03367	0,00374
90 %	4,724 <sup>c</sup>	3,986 <sup>c</sup>	3,920 <sup>c</sup>	3,712 <sup>c</sup>	0,01077	0,01249	0,00548	0,00374
100 %	4,724 <sup>b</sup>	4,170 <sup>d</sup>	4,190 <sup>d</sup>	4,142 <sup>d</sup>	0,01077	0,00316	0,01517	0,00374

*LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .*

Et: Error típico.

**Tabla 3.2 Comportamiento de la Acidez a los diferentes tiempos y proporciones.**

	To	T14	T24	T64	Et. T14	EtT24	EtT64	Et
50 %	59,6 <sup>d</sup>	105,2 <sup>c</sup>	134,8 <sup>c</sup>	211 <sup>d</sup>	0,90	4,259	0,447	0,400
75 %	43,2 <sup>c</sup>	91 <sup>c</sup>	118,4 <sup>c</sup>	183,8 <sup>c</sup>	1,789	0,927	0,583	0,735
90 %	34,4 <sup>b</sup>	73,8 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>	131,4 <sup>b</sup>	1,158	3,209	0,510	0,245
100 %	28,8 <sup>a</sup>	57,6 <sup>a</sup>	67 <sup>a</sup>	73,8 <sup>a</sup>	1,208	0,894	0,583	0,490

*LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .*

Et: Error típico.

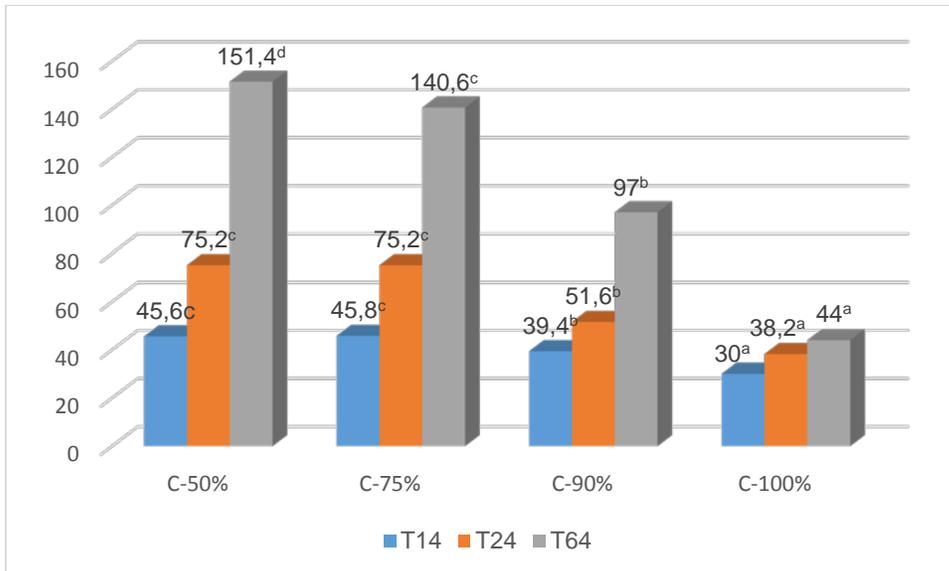


Fig. 3.1 Comportamiento de los diferenciales de acidez de las diferentes proporciones del líquido residual del ablandamiento del grano de soya.

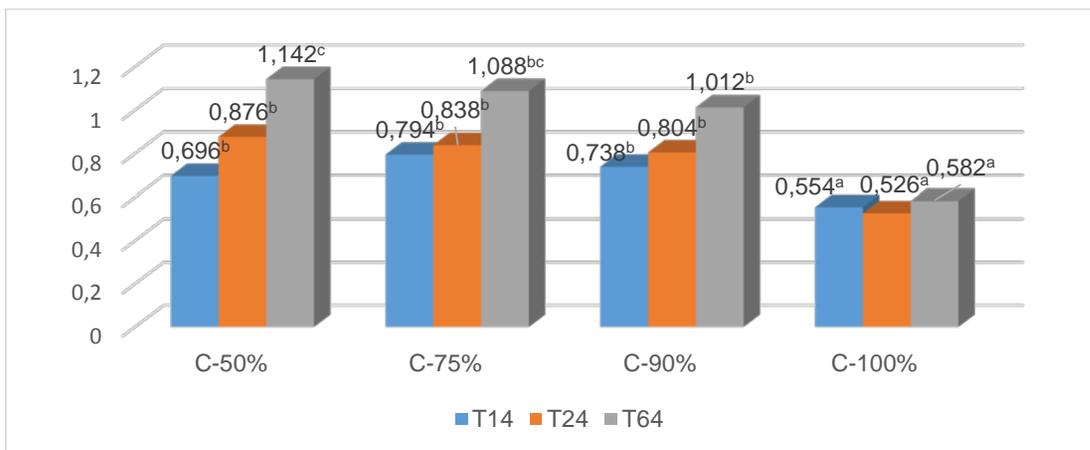


Fig. 3.2 Comportamiento de los diferenciales de pH de las diferentes proporciones del líquido residual del ablandamiento del grano de soya.

Los lactobacilos requieren medios complejos con diversos aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y carbohidratos fermentables que estimulan su crecimiento (Nawel & Ahmed 2016). La formulación del nuevo biopreparado se condujo principalmente para la utilización del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya que posee alta concentración de nutrientes con la inclusión de fuentes de carbohidratos por el suero lácteo.

Este aporte se realiza para el incremento de los microorganismos probióticos (*Lactobacillus*), quienes necesitan estos nutrientes para su rápido crecimiento.

Se conoce que el suero lácteo posee en su composición lactosa (3.8-4.3 %); estos carbohidratos aportan altas concentraciones de azúcares, los cuales pueden utilizarse por los microorganismos como fuente de energía. Otros autores como Miranda *et al.*, (2015) utilizaron suero de queso dulce para el crecimiento de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*.

Hernández, 2018 propuso un bioproducto utilizando las cepas de *S. thermophilus* SS77 y *L. acidophilus* SS80 y las mismas mostraron capacidad de crecimiento en los medios a base de leche de soya, aunque se hizo más abundante el crecimiento cuando se enriqueció con extracto de levadura.

Gómez, 2011 estableció una metodología para la incorporación del residual líquido del grano de soya para el crecimiento de micro algas con buenos resultados. Coghetto, 2016 en su investigación sobre el crecimiento y actividad fermentativa de cepas de *L. plantarum* BL011 aisladas de queso Serrano, utilizó un medio de cultivo alternativo libre de proteína animal donde incluyó residuo líquido ácido de la obtención de proteína de soya.

Los resultados mostraron la posibilidad de incluir ese sustrato como una alternativa para producir probióticos, sin ingredientes derivados de animales, logrando obtener concentraciones altas de la biomasa en birreactores con costos minimizados.

Beret, 2018, siguiendo el mismo principio de utilizar residuos agroindustriales evaluó medios de cultivo más económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus paracasei* 90, incluyendo el residual líquido proveniente de la obtención de proteína de soya, concluyendo que este residual puede ofrecer un comportamiento como medio de cultivo base para fermentos lácticos a un costo competitivo y con gran potencial de aplicación en quesería.

El residual de la línea de ablandamiento del grano de soya presenta en su composición entre 16 y 20 % de Nitrógeno Total (Santacruz, 2015), por lo que constituye una alternativa para la incorporación de fuentes nitrogenadas en los biopreparados.

En paralelo Raya-Medina, 2018 incluyó en su investigación sobre el uso en terneros de un bioproducto desarrollados en residuos de la industria láctea, el residual líquido obtenido de la línea de ablandamiento del grano de soya, en el proceso de producción de yogurt de soya. El trabajo incluyó combinación del 50 % (v/v) del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya con el suero lácteo. Los resultados fueron comparables con los obtenidos con el yogurt de leche de soya al utilizar como variable de interés la acidez; sugiriéndose la valoración de otras combinaciones de los residuales; aspecto logrado en el trabajo.

Los valores de pH de las diferentes proporciones del medio de cultivo (*MSQB+RAGS*) disminuyó a valores por debajo de 4.5 en 14 h, lo que se corresponde con otros estudios donde las cepas de lactobacilos redujeron el pH a valores  $\leq 5,5$  en 24h(Jurado-Gómez H, 2014).La tolerancia a bajo pH son propiedades esenciales requeridas por los LAB para sobrevivir en el tracto digestivo y expresar sus propiedades benéficas. Con estas características de calidad las cepas incluidas en el bioproducto tendrán mayores efectos ya que se conoce que la mayoría de los enteropatógenos inhiben su crecimiento en valores cercanos a un pH de 5,5 (Muñoz-Atienza E, 2013)

### **3.1 Análisis del crecimiento de las cepas del bioproducto en el sustituto lechero.**

Los resultados del crecimiento de las cepas ensayadas sobre el sustituto lechero mostraron abundante crecimiento, expresado en los diferenciales de acidez y pH alcanzado a las 24 h de incubación, los que difieren significativamente entre sí (Fig.3.3 y Fig.3.4), poniendo de manifiesto que no hay factores inhibitorios en el alimento que limiten el desarrollo de los lactobacilos.

Un elemento importante en el uso de los probióticos, lo constituye la forma de hacer llegar los mismos a los animales, como alternativas se ha ensayado diferentes métodos con cepas de *Lactobacillus sp.* pero estos deben prever la no inhibición de la alta densidad microbiana vehiculizada (Astesana *et al.*, 2018).

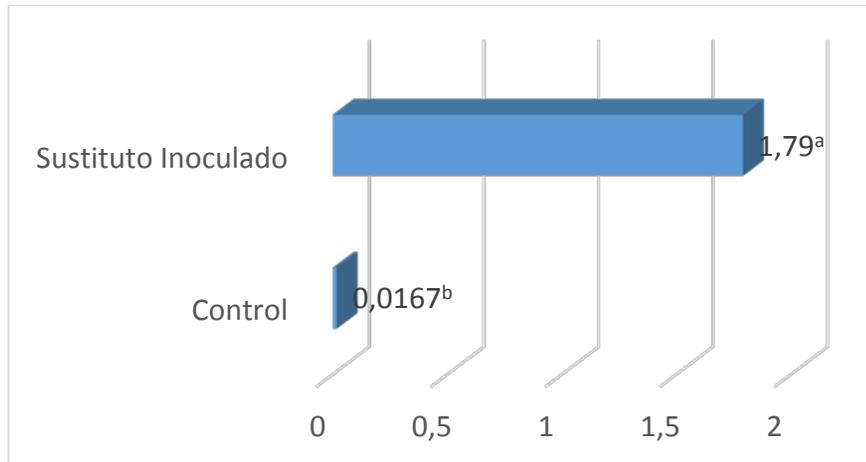


Fig. 3.3 Comportamiento de los diferenciales de pH en el Sustituto lechero

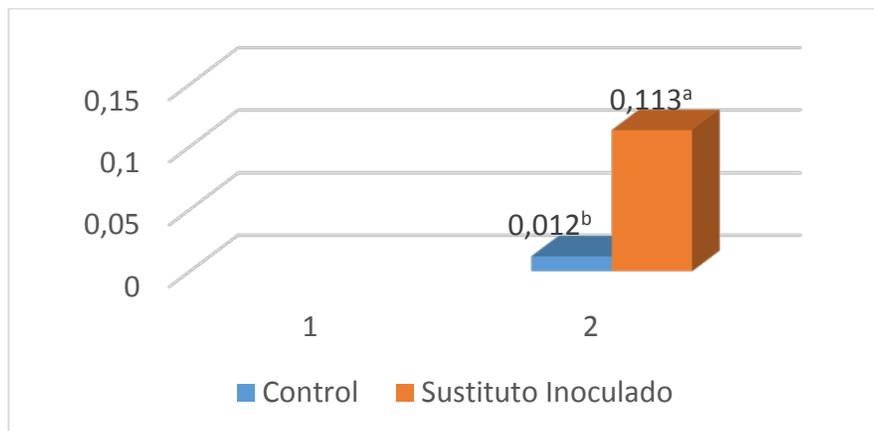


Fig. 3.4 Comportamiento de los diferenciales de acidez en el Sustituto lechero

### 3.2 Establecimiento de la metodología para la obtención del biopreparado simbiótico.

En la tabla 3.4 se presenta la composición final del biopreparado simbiótico empleada en el presente trabajo y en la figura 3.5 se muestra la metodología para la producción del mismo.

**Tabla 3.4 Composición del medio de cultivo**

	Proporciones	Suero de queso <i>blanco</i>	Residual de la línea de ablandamiento del grano de soya
I	50 % (v/v)	500 mL	500 mL
II	75 % (v/v)	250 mL	750 mL
III	90 % (v/v)	100 mL	900 mL

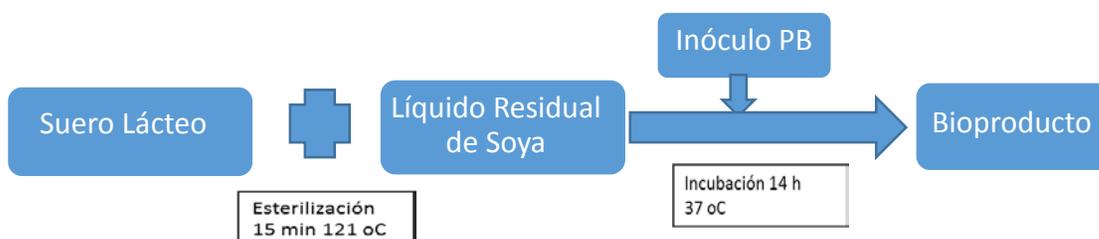


Figura 3. 5 Metodología para la producción del bioproducto probiótico

Como se puede apreciar el biopreparado probiótico contiene el residual de la línea de ablandamiento del grano de soya enriquecido con suero lácteo como fuente de carbono para el crecimiento de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77, es decir, comprende una mezcla de compuestos prebióticos y microorganismos probióticos que establecen una relación sinérgica, donde cada uno depende de la acción del otro.

**Tabla 3.5 Determinación del costo de producción del bioproducto a escala de laboratorio**

	UM	PRECIO CUP	PRECIO USD	CANTIDAD	UM	PRECIO CUP	PRECIO USD
Componentes							
Suero lácteo	L						
Residual Líquido de Soya	L						
Inóculo	1 L	0,99		0,25	L	0,0248	
<b>Total</b>		0,99		0,25		0,0248	
Componentes de proceso							
Energía						0,83	
Salario						9,53	
Depreciación							0,33
Seguridad Social						1,02	
<b>Total</b>						<b>11,405</b>	

13,500xcosto. = 1700,00 CUP

### 3.3 Efecto del probiótico en terneros.

El comportamiento de la administración del probiótico sobre el incremento de peso y la ganancia media diaria se refleja en la tabla 3.6 mostrándose que existieron diferencias significativas del grupo que consumió 20 mililitros con el grupo control, no obstante se ven favorecidos ambos grupos tratados; cuando se hace un análisis de la frecuencia de animales que está por encima de la media de la GMD en los grupos tratados, refleja valores superiores al 66 % (Fig. 3.6).

La diferencia en el incremento de peso de los grupos tratados duplica en valor absoluto a los del control y en la GMD es superior en 0.175 g en el grupo que se le administró 20 mL del bioproducto y en 0.117 g en el grupo de 30 mL (Fig3.7).

El estado de salud de los animales de forma general fue favorable (Tabla3.7), aunque en los grupos tratados, a diferencia del control, no apareció ni enfermedad ni muertes.

**Tabla 3.6 Efecto del bioproducto probiótico sobre el incremento en peso en los terneros.**

Grupos	n	PI	PF <sup>1</sup>	IP	GMD	Dif. IP
Control	7	42,286 ± 2,625 <sup>a</sup>	45,155 ± 1,888 <sup>a</sup>	2,870 ± 2,503 <sup>b</sup>	0,064 ± 0,056 <sup>b</sup>	
Bioproducto 20 mL	8	35.333 ± 1,509 <sup>b</sup>	46.094 ± 0,921 <sup>a</sup>	10,76 ± 1,899 <sup>a</sup>	0,239 ± 0,042 <sup>a</sup>	+7,89
Bioproducto 30 mL	9	41,125 ± 1,043 <sup>a</sup>	49,259 ± 2,289 <sup>a</sup>	8,133 ± 2,036 <sup>b</sup>	0,181 ± 0,147 <sup>b</sup>	+5,26
p			0,248	0,05	0,05	

LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .

1- Valores corregidos teniendo en cuenta el efecto del peso inicial como covariable, el IP y la GMD se calcularon a partir del valor corregido.

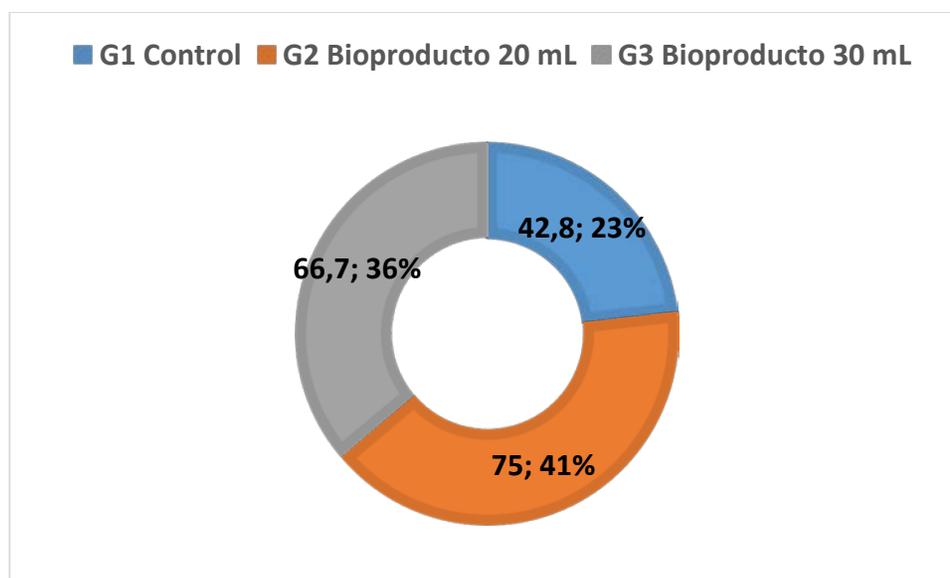


Fig. 3.6 Por ciento de animales por encima de las media totales en la GMD por grupos.

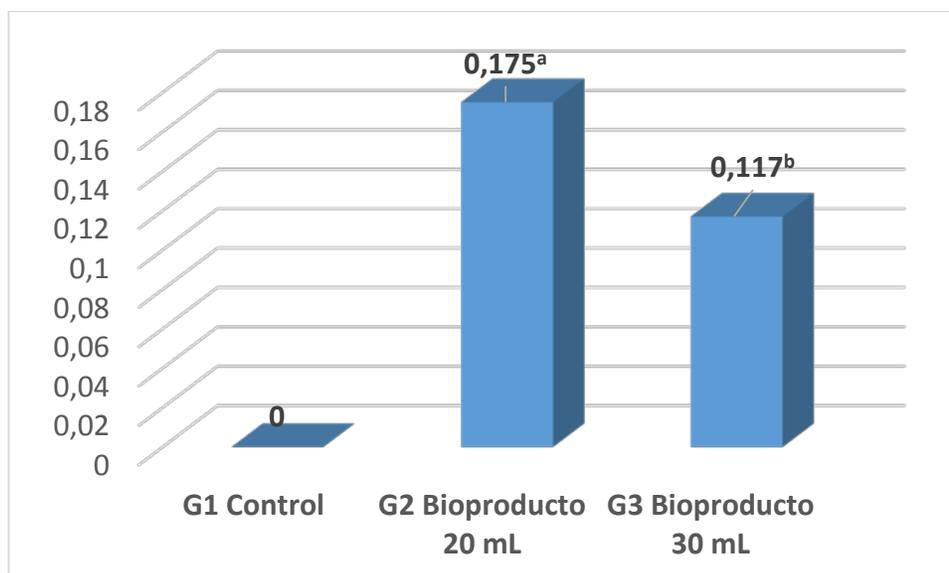


Fig. 3.7. Diferencias de GMD del grupo Control con relación a los tratados (Kg)

**Tabla 3.7 Estado de salud en los animales en estudio.**

Grupos	n	Incidencia de enfermedad		Muertes	
		Cabezas	%	Cabezas	%
Control	7	1	14,3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	14,3
Bioproducto 20 mL	8	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0
Bioproducto 30 mL	9	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0

*LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .*

Fernández *et al.*, 2018, sostienen que los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en la cantidad adecuada, le generan un efecto benéfico al huésped, disminuyen los problemas de salud y pueden aumentar la productividad, gracias a que con ellos se pueden afectar las proporciones de las diferentes especies de bacterias en la microbiota del tracto gastrointestinal.

No obstante, en cuanto a su efecto como promotores de crecimiento los resultados son contradictorios, en gran medida por la diversidad de cepas, especies de microorganismos, dosis, la forma de administración; así como también la diferente composición de las dietas utilizadas en los bioensayos.

El comportamiento de los animales en el ensayo no coincide totalmente con el reportado por Melissa C. Cantor, (2018) que investigó el efecto de un aditivo zootécnico de origen natural en la dieta de terneras Holstein en pre y post destete y encontró diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) para la ganancia de peso corporal, sin embargo, los niveles de proteínas plasmáticas totales y de cuadro hemático no mostraron diferencias significativas entre los valores obtenidos; concluyendo que el uso de aditivos de origen natural en la dieta de terneras permiten incrementar la ganancia diaria de peso, sin modificaciones significativas en el cuadro hemático y proteínas totales.

Delgado, Barreto & Rodríguez (2019) evaluó el efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* adicionada como probiótico a la dieta basal de terneros sobre la condición corporal (CC), alzada, ganancia media diaria (GMD), parámetros hematológicos y metabólicos. Los resultados de GMD y alzada no mostraron diferencias estadísticas y al analizar los parámetros hematológicos se encontró diferencia estadística solo en glucosa.

Calero (2002) reportó el efecto probiótico de un preparado de bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*) sobre la salud y ganancia de peso en terneros en vaquerías y centros de desarrollo de la Empresa Pecuaria Managuaco de la Provincia Sancti Spíritus, Cuba. Los resultados mostraron una mejora en la GMD (g), en los tres grupos de animales tratados (157.00, 223.00, 287.71) con respecto a los controles (153.71).

En su ensayo sobre el uso de aditivo en la misma zona en otra categoría de terneros (+ 45 d), Hernández-Torres, (2017) encontró GMD de los animales tratados con bioproducto a base de leche de soya de 540g y Raya-Medina, 2018 reportó GMD de 230g en esa misma categoría, no reportando diferencias significativas con el control en ninguno de los casos.

Estas GMD están en el rango de las encontradas en este trabajo, evidenciando que los animales están sometidos a dietas que no satisfacen las necesidades nutricionales de la especie.

Los resultados de GMD están por debajo de las reportadas por Lager (2010), quien plantea que al suministrar leche entre el 8 al 10% del peso vivo (PV), se obtiene ganancias de peso de 450 g/día. Los pesos obtenidos por Cuenca-González, (2018) al evaluar el efecto del suministro de diferentes niveles de leche y probióticos en terneros de cruce Holstein-Montbeliarde superan al promedio de GMD encontrado en el presente trabajo, ya que reportan un promedio de 687 g/día en la etapa de lactancia (Cuenca González, 2018).

Sotoa *et al.*, (2015) plantean que al evaluar un inóculo probiótico compuesto por *Lactobacillus casei* DSPV318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV006T sobre el peso, la microbiota intestinal, la morbilidad y la mortalidad de terneros jóvenes desafiados con *Salmonella dublin* DSPV 595T; encontraron menos severidad de la diarrea en el grupo probiótico.

No se encontraron diferencias en el resto de los signos clínicos, el peso vivo y la mortalidad entre los dos grupos analizados, resultados que se corresponden con los del presente estudio.

Delgado & Rodríguez (2019), emplearon como aditivo probiótico, *Saccharomyces cerevisiae* para incrementar la ganancia de peso de terneros; el grupo experimental en las dos mediciones realizadas durante el periodo de escasez de pastos naturales logró una ganancia media diaria de 533 y 586 g/animal/día, respectivamente, cifras que ascendieron a 713 y 701g/animal/día en las determinaciones correspondientes al período de lluvias.

En otro estudio el incremento en la GMD del grupo probiótico fue superior que el grupo control ( $0.84 \pm 0.10$  kg/d vs.  $0.74 \pm 0.10$  kg/d, respectivamente), solo en la primera etapa de vida de los terneros (Cantor *et al.*, 2019).

En ganado menor, un ensayo para comprobar el efecto de la suplementación de un probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre enteropatógenos ambientales en cabritos con crianza artificial se logra GMD (Kg) de  $0.145 \pm 0.03$   $0.155 \pm 0.01$ , para los grupos control y probiótico respectivamente, sin lograr diferencias significativas entre ellos, resultados comparables a los del estudio.

La administración de probiótico en sistemas de producción intensiva requiere de altas dosis de microorganismos vivos para que puedan colonizar y alcanzar el lugar del ecosistema a lo largo de todo el tracto intestinal y finalmente exhibir el efecto probiótico (Bayatkouhsar *et al.*, 2013), en este ensayo es un factor que no influyó de forma significativa entre las dosis de 20 y 30 mL ( $1 \times 10^8$  ufc/mL), a pesar de verse favorecido el de 20 mL.

Los diferentes resultados en el uso de probióticos pueden atribuirse a las diferencias en las condiciones de crianza y características del ternero; (Kelsey *et al.*, 2017), al evaluar el efecto de la adición de probióticos sobre el comportamiento de terneros ante situaciones estresantes, no mostró resultados positivos.

Otro de los desafíos para el uso de los probióticos, lo constituye la forma de hacer llegar los mismos a los animales, como alternativas se ha ensayado macrocápsulas con cepas de *Lactobacillus spp.* en alta densidad como suplemento nutricional de terneros jóvenes con resultados favorables (Astesana *et al.*, 2018); en la presente investigación se aspira a producciones locales que minimicen procesos tecnológicos y le sean de fácil acceso al productor y el uso del sustituto lechero no inhibió el crecimiento bacteriano.

Muchas de las plantas producen metabolitos como protección biológica, los cuales se conocen como aditivos fitoquímicos o fitobióticos; estos compuestos constituyen una alternativa para los antibióticos y promotores de crecimiento por sus acciones de digestibilidad, antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante e inmunoestimulante (Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2017), no descartándose la posible influencia de alguno de estos elementos vehiculizados en el residual del ablandamiento del grano de soya utilizado como sustrato del bioproducto.

En la cría intensiva de animales como la utilizada en el presente ensayo de campo se involucra el uso de la dieta, las instalaciones o prácticas de manejo o zootécnicas que imponen factores estresantes de carácter fisiológicos y psicológicos en los animales, afectando negativamente el balance intestinal y creando una disfunción de la barrera intestinal.

En este contexto, la microbiota intestinal puede proveer al animal de muchas funciones beneficiosas, incluyendo producción de ácidos grasos volátiles, reciclando de sales de la bilis, producción de vitaminas, la fermentación de fibra, y el desarrollo del sistema inmunológico (Heo *et al.*, 2013; Kim e Isaacson, 2015).

## **CONCLUSIONES**

- Se obtiene un bioproducto probiótico conformado por diferentes proporciones de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya y la presencia de lactosa incrementa la población de Lactobacillus, expresado en la disminución del pH y la elevación de la acidez; siendo las proporciones más efectivas las de 50 y 75 % (v/v).
- La inclusión del biopreparado simbiótico en el alimento de terneros lactantes mostró efecto positivo en el incremento de peso y la ganancia media diaria en el grupo que recibió 20 mL.
- La secuencia y los resultados de este trabajo dan lugar a una metodología experimental a escala de laboratorio, para la obtención de un bioproducto probiótico conformado por suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya en diferentes proporciones para su aplicación en terneros lactantes a bajo costo.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar un estudio de optimización del bioproducto probiótico de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya a partir de las proporciones de mayor eficiencia utilizando el método de superficie respuesta.
- Aplicar el bioproducto probiótico en la alimentación de mayor número de animales de la misma categoría y en otras para comprobar su efecto en los indicadores productivos y de salud.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afsharmanesh, M. S., B. (2014). Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*. 23(3): 717-724.
- Ahmed, S. T., Islam, M. M., Mun, H.-S., Sim, H.-J., Kim, Y.-J., & Yang, C.-J. (2014). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. *Poultry Science*, 93(8), 1963-1971.
- Alfonso, P., Marcela, D., Villanueva, B., & Carvajal, F. O. (2011). Producción de biomasa y escalamiento de microorganismos ruminales con potencial probiótico.
- AlGhuri, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E. M., Chistyakov, V. A., Mazanko, M. S. Chikindas, M. L. (2016). Safety Properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, 6(06), 432.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Arés, I. & Aránzazu Martínez, M. (2016). Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits. In: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion. . Vol 1. Watson, R.R. & Preedy, V.R. King's College London, London, UK, p. 3. ISBN: 978-0-12-802189-7.
- Astesana, D., Zimmermann, J., Frizzo, L., Zbrun, M., Blajman, J., Berisvil, A., . . . Soto, L. (2018). Desarrollo de macrocápsulas con cepas de *Lactobacillus* spp. en alta densidad como suplemento nutricional de terneros jóvenes y análisis de su viabilidad durante el almacenamiento. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 398-407.
- Bahrim, G. E. I., G.(2014). Sources, production and microencapsulation of probiotics. In: Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health. Ötleş, S. Taylor & Francis Group, LLC, Turkey, p. 25. ISBN: 978-1-4665-8624-6 (eBook - PDF). .

- Bai, S., Wu, A., Ding, X., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K., & Chio, J. (2013). Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science*, 92(3), 663-670.
- Bayatkouhsar J, T. A., Naserian AA, Mokarram RR, Valizadeh R.(2013). Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Anim Feed Sci Technol.* ;186:1---11. .
- Beret, M. V.(2018). Medio de cultivo económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus Paracasei* 90.
- Brizuela, M. A. (2003.). Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. PhD Thesis. La Habana. Cuba.
- Buj, A., & Concepci, S. (2014). La soja es el principal cultivo en Argentina debido a su adaptación a los suelos, la incorporación de tecnología con el empleo de la siembra directa y el precio del mercado internacional, (October 2015), 221-230.
- Calero I, H. (2002). Evaluación de la aplicación oral de un preparado biológico mixto de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* a rumiantes jóvenes. Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Medicina Preventiva. Directores: Dr. C. Juan E. Hernández García. MSc. Juan Carlos Rodríguez Fernández. Universidad Central de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Villa Clara. .
- Calzadilla, D. S. E. H. M. G., María Teresa; García, & P., L. C. E. S. M. C. A. A. (2006). Capítulo IV. Crianza de terneros. Generalidades. En: *Ganadería Tropical*. Editorial Félix Varela, La Habana. 91-110.
- Camargo, M., Párraga, C., Mejía, E., Escobar, A., & Colmenárez, M. (2017). Subsistemas de crianza de becerros y su relación con el desarrollo de fincas doble propósito en el estado portuguesa. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 29, 39-46.

- Cantor, M. C., Stanton, A. L., Combs, D. K., & Costa, J. H. (2019). Effect of milk feeding strategy and lactic acid probiotics on growth and behavior of dairy calves fed using an automated feeding system. *Journal of animal science*, 97(3), 1052-1065. .
- Castells, M., González, M., Mattos, C., Juliano, P., Silva, C., Sepulve, J., . . . López, T. Alternativas de valorización de sueros de quesería. *Embrapa Clima Temperado-Capítulo em livro científico (ALICE)*.
- Castillo Arroyo, P. L., Betancur Hurtado, C. A., & Pardo Pérez, E. (2018). Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2), 438-448.
- Coghetto, C. C., Vasconcelos, C. B., Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2016). Lactobacillus plantarum BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *brazilian journal of microbiology*, 47(4), 941-948.
- Corzo, N. A., J. L.; Azpiroz, F.; Calvo, M. A.; Cirici, M.; Leis, R.; Lombó, F.; Mateos-Aparicio, I.; Plou, F. J.; Ruas-Madiedo, P.; Rúperez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Sanz, M. L.; Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1): 99-118.
- Costales, D., Nápoles, M. C., Falcón, A. B., González Anta, G., Ferreira, A., & Rossi, A. (2017). Influencia de quitosanas en la nodulación y el crecimiento vegetativo de soya (*Glycine max* L. Merrill). *Cultivos Tropicales*, 38(1), 138-146.
- Cuenca González, J. K. (2018). *Efecto del suministro de diferentes niveles de leche y probióticos en terneros de cruce Holstein-Montbeliarde*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Maestría en Producción y Nutrición ....
- Chibás, G. O., Casanovas, C. E., & Pérez, P. A.(2017). Comparación de la eficiencia de los biodigestores de Cúpula Fija y de Geomembrana en los Sistemas de Producción Porcina en la Provincia Cienfuegos. *Revista Científica Agroecosistemas (Cuba)*, 5(1), 79-83.

Del Valle-Pérez, A. (2017). Obtención de un biopreparado simbiótico, a partir de la mezcla de pulpa de *Agave fourcroydes* Lem. y PROBIOLACTIL®, para su aplicación en terneros. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Tutores: Dra. C. Ana Julia Rondón Castillo MSc. Marta Laurencio Silva. *UNIVERSIDAD DE MATANZAS FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS*.

Delgado, R., Barreto, G. & Rodríguez, H. (2019). Empleo de *Saccharomyces cerevisiae* como tecnología para incrementar la ganancia de peso de terneros. *Avances*, 21(1), 117-128. Recuperado de <http://www.ciget.pinar.cu/ojs/index.php/publicaciones/article/view/421/1413>.

Dima, S., Bahrim, G.E. & Iordăchescu, G. (2014). Sources, production and microencapsulation of probiotics. In: *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health*. Ötleş, S. Taylor & Francis Group, LLC, Turkey, p. 25. ISBN: 978-1-4665-8624-6 (eBook - PDF).

Endo, A. G., M. (2016). Isolation, Identification and characterization of potential new probiotics. In: *Advances in Probiotic Technology*. Foerst, P. & Santivarangkna, C. Taylor & Francis Group, LLC, p. 45. ISBN: 978-1-4987-3458-

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
FAO. Parte III. La agroindustria y el desarrollo económico. doi: [www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s12.htm](http://www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s12.htm). (2018).

FAO. Beneficios de la levadura de cerveza. Departamento de la Agricultura de la FAO. (2013).

FAO. (2018)-Estadísticas FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. Consultada en los meses de Junio y Julio de 2018

Fernández, S., Fraga, M., Silveyra, E., Trombert, A., Rabaza, A., Pla, M., & Zunino, P. (2018). Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves. *Beneficial microbes*, 9(4), 613-624.

Garcíaarena, A. D. (2011). Subproductos en la alimentación de rumiantes. *Artículos técnicos de Ganadería*. .

- Geraldi MV, T. F., Souza VM, et al. (2018). Development of Yoghurt with Juçara Pulp (*Euterpe edulis* M.) and the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* La5. . *Probiotics & Antimicro Prot* ;10(1):71-6.
- Gómez, F., Trejo, L., Velasco, J., & Lara, L.(2016). Herramientas moleculares para estudios ambientales de actividades agroindustriales. *Agroproductividad*, 9 (8), 3-9. .
- Gómez Luna, L., Álvarez, I., & Rivero, R. (2011). Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2).
- Gonzales, D. (2013). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal. Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia. .
- Heo, J. M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J., Nyachoti, C.M.(2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J.Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 207–237.
- Hernández, A., Real, N., Delgado, M., Bautista, L., & Velasco, J.(2016). Residuos agroindustriales con potencial de compostaje. *Agroproductividad*, 9 (8), 10-17. .
- Hernández, Y. G., Cossio, D. S., García, Y. L., Sosa, P. J. C., Fernández, L. G., & Sánchez, Y. M. (2018). Evaluación de un medio de cultivo para *Lactobacillus pentosus* LB-31, promotor del crecimiento animal. *Anuario Ciencia en la UNAH*, 15(1).
- Hidanah, S., Nazar, D. S., & Safitri, E. (2018). The improvement of eggs quality of Mojosari duck (*Anas javanica*) with soybean husk fermentation using cellulolytic bacteria of *Spodoptera litura*. *Veterinary world*, 11(5), 720.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., . . . Salminen, S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on

- the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.
- Hoet, E., & Boscán, L. (2015). Complejo diarreico bovino. . Facultad de ciencias Veterinarias. Universidad del Zul., online/maunualganaderia/seccion5/articulo11.pdf.
- Hong, T. T. T. a. C., L. T. (2013). The protein content of cassava residue, soybean waste and rice bran is increased through fermentation with *Aspergillus oryzae*. *Livestock Res. Rural Dev.* 25: 1-7.
- Hull, C. M., Loveridge, E. J., Donnison, I. S., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2014). Co-production of bioethanol and probiotic yeast biomass from agricultural feedstock: application of the rural biorefinery concept. *AMB Express*, 4(1), 64.
- Inda Cunningham, A. (2000). *Optimizacion de rendimiento y aseguramiento de inocuidad en la industria de quesería: una guía para la pequeña y mediana empresa*. Retrieved from
- INIA (2014). "Optimización de la crianza de hembras de Reemplazo de lechería. Instituto de Investigación Agropecuaria." N 297.
- Kelsey, A. J., Colpoys, J. D., & Walter, K. W. (2017). 395 Effects of dietary probiotics on cattle stress behavior. *Journal of animal science*, 95(suppl\_2), 191-191. doi:10.2527/asasmw.2017.395
- Kim, H. B., Isaacson, R.E., . (2015). The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet. Microbiol.* 177, 242–251.
- Kleerebezem, M., Binda, S., Bron, P. A., Gross, G., Hill, C., van Hylckama Vlieg, J. E., . . . Ouwehand, A. C.(2019). Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. *Current opinion in biotechnology*, 56, 55-60. .
- Li, X., Liu, X., Hua, Y., Chen, Y., Kong, X., & Zhang, C. (2019). Effects of water absorption of soybean seed on the quality of soymilk and the release of flavor compounds. *RSC Advances*, 9(6), 2906-2918.

- Ma, T., & Suzuki, Y.(2018). Dissect the mode of action of probiotics in affecting host-microbial interactions and immunity in food producing animals. *Veterinary immunology and immunopathology*, 205, 35-48.
- Maldonado, N., Chiaraviglio, J., Bru, E., De Chazal, L., Santos, V., & Nader-Macías, M. .(2018). Effect of milk fermented with lactic acid bacteria on diarrheal incidence, growth performance and microbiological and blood profiles of newborn dairy calves. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 668-676.
- Milián, G. (2009). .Obtención de cultivos de *Bacillus spp.*y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis. Matanzas, Cuba.
- Miranda JE, M. A., Sánchez D, Hernandez Y. (2018). Elaboration of a bioprepared with probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts. *Bionatura* 2: 245-247. doi:10.21931/RB/2017.02.01.6.
- Miranda, J., Marin, A., & Baño, D. (2017). Elaboration of a bioprepared with probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts. *Bionatura*, 2(1), 245-247.
- Miranda Miranda, O., Fonseca, P. L., Ponce, I., Cedeño, C., Rivero, L. S., & Vázquez, L. M. (2014). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de leche que incorpora *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Cubana de alimentación y nutrición*, 24(1), 7-16.
- Miranda, O., Fonseca, P., Ponce, I., Borges, M., Cutiño, M., Díaz, R. M., . . . Ramírez, R. (2015). Evaluación de bacterias probióticas en suero de queso fermentado para la alimentación de cerdos en crecimiento. *Revista Computadorizada de Producción Porcina Volumen*, 22(2).
- Moran, J. (2002). "Calf rearing. A practical guide." 2a.ed.Collingwood:Landlinks Press: 226.
- Nápoles, G., González-Anta, G., Ferreira, A., Rossi, A., Hernández, F., & Costales, M. (2014). Effect of different inoculants on soybean nodulation grown in stress condition. *Cultivos Tropicales*, 35(4), 45-51.

NPB, Antibiotics on the farm: what you need to know about new regulations. Des Moines. ( 2015).

NRIAL 173.Productos de soya métodos de ensayo. (2001).

NRIAL 174. Yogur de soya aromatizado requisitos de calidad. . (2008).

Parzanese. (2017.). Tecnologías para la Industria Alimentaria. Procesamiento de lactosuero. Ficha N° 13. Alimentos Argentinos-MinAgri. Disponible en <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/>

*Ficha\_13\_Lactosuero.pdf. Acceso 13/julio/*

Perea J, P. M. (2006). Reología, aceptabilidad y durabilidad de un yogur de soya con adición de suero de quesería. *Cienc Tecnol Alim* ; 16(1):14-8.

Pérez, P. A., Casanovas, C. E., Arias, V. Á., & Chibás, G. O.(2017). Efecto del digestato líquido fermentado sobre el comportamiento productivo de cerdos en ceba. *REDVET Rev. Electrón.vet*, 18(9). doi: [www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090917.htm](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090917.htm) - [www.veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)

Pérez, R. M., Armenteros, A. M., & Vega, E. C.(2014). Evaluación de la colonización del tracto digestivo de cerdos por cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, componentes de un producto probiótico. *Rev. Salud Anim*, 36 (3 sep-dic), 141-146.

Pintado, M. M., Gomes, A. M., & Freitasb, A. C. (2014). Probiotic Bacteria: From Science to Consumers' Benefit. *Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects*, 1.

Ramírez, S.(2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanun tuberosun*) para la producción de *Trichoderma* spp. (Trabajo de grado). Universidad técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. .

- Raya-Medina, R.(2018). Evaluación probiótica en terneros de un bioproducto desarrollados en residuos de la industria láctea. Trabajo de diploma para optar por el grado de Ingeniera agrónoma. Departamento de Agronomía. Facultad de Ciencias Agropecuaria.
- Restrepo, A., Rodríguez, E., & Manjarrés, K.(2011). Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Producción + limpia*, 6 (2), 47-57. .
- Ríos, J. L., Reyes, J. y Rodríguez, J.C. (1998). El análisis de covarianza en los experimentos pecuarios. *Revista INFOCIENCIA*, 7(1):10–21. Versión electrónica disponible en: <http://www.infociencia.idict.cu/index.php/infociencia/article/view/047.pdf>.
- Rochin-Medina, J. J., Ramirez-Medina, H. K., Rangel-Peraza, J. G., Pineda-Hidalgo, K. V., & Iribe-Arellano, P. (2018). Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Science and Technology International*, 24(1), 35-42.
- Rodríguez-Hernández, M. G., Hernández-Ochandía, D., Miranda-Cabrera, I., Delgado-Oramas, B. P., Castro-Lizazo, I., Moreno-León, E., & Ortiz-Pérez, R. (2018). Resistencia del genotipo INCASoy-36 (*Glycine max* (L.) Merrill.) A población cubana de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Cultivos Tropicales*, 39(4), 60-65.
- Rodríguez, J. C., Carmenate, M.C., Hernández, J.E., Guerra, A., Calero, I., Álvarez, J.M., Martín, E. & Suárez, M. ( 2009). Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* en cerdos en crecimiento. . *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 16(1): 54-58.

- Rodríguez, M. (2017) Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Rosas, D., Ortiz, H., Herrera, J., & Leyva, O. (2016). Revalorización de algunos residuos agroindustriales y su potencial de aplicación a suelos agrícolas. *Agroproductividad*, 9 (8), 18-23. .
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.
- Sosa, D., García, Y., & Dustet, J. (2018). Development of probiotics for animal production. Experiences in Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4).
- Sotoa, L. P., Frizzo, L. S., Signorini, M. L., Zbrun, M. V., Lavari, L., Bertozzi, E., . . . Rosmini, M. R. (2015). Faecal culturable microbiota, growth and clinical parameters of calves supplemented with lactic acid bacteria and lactose prior and during experimental infection with *Salmonella dublin* DSPV 595T. *Arch Med Vet* 47, 121-128
- Suárez-Solis. (2009). Tecnologías de procesamiento del suero de queso. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; .
- Tepan, R. (2011). Diarrea neonatal de los terneros. Tesis de pregrado. Cuenca, Ecuador: Univ. de Cuenca. 95 p.
- Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D., & González-Ríos, H. (2017). Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *Journal of animal science and technology*, 59(1), 8.
- Van Amburgh, M. E. S., F.; Lopez, D.J.; Karszes, J. y . Everett, R.W. ( 2014.). Early Life Nutrition and Management Impacts Long-Term Productivity of Calves. Proceedings 50th Florida Dairy Production Conference, Gainesville.
- Vargas, C., Y.A. , & Pérez, P., L.I.(2018).Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente *Rev. Fac. Cienc. Básicas*, 14(1), 1-14.

Wang J., W. R., Zhang W., Sun Z., Zhao W., Zhang H. (2013). Proteomic comparison of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang cultivated in milk and soy milk. . *Journal of Dairy Science*, 96, 5603-5624.

Watson, R., & Preedy, V. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: UK.

Yadav S. Bajagai, A. V. K., Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. (2016.) FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Probiotics in animal nutrition-Production, impact and regulation byFAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Composición del pienso completo de lactancia/ lacto remplazante (Raltec®).

Suero de leche en polvo, manteca de cerdo, suero de leche parcialmente delactosado en polvo, concentrado de proteína de soja (producido a partir de habas de soja modificada genéticamente), lactoalbúmina en polvo, gluten de trigo, almidón de trigo pre gelatinizado. (Contiene organismos genéticamente modificados). En las tablas A y B se presenta el análisis de los componentes del pienso completo de lactancia y los aditivos presentes.

Tabla A Análisis de los componentes del pienso completo de lactancia/lacto remplazante (Raltec®).

Componentes	%
Proteína bruta	21,30
Fibra bruta	0,7
Aceites y grasas brutos	17
Ceniza bruta	7
Calcio	0,65
Sodio	0,40
Fósforo	0,55
Humedad	5

B. Aditivos presentes en el pienso completo de lactancia/lacto remplazante (Raltec®).

Oligoelementos		
E4 Cobre (Sulfato cúprico pentahidratado)	10	mg.kg <sup>-1</sup>
E2 Yodo (Yoduro de potasio)	0,25	mg.kg <sup>-1</sup>
E1 Hierro (Sulfato ferroso monohidratado)	80	mg.kg <sup>-1</sup>
E5 Manganeso (Óxido manganoso)	40,00	mg.kg <sup>-1</sup>
E6 Zinc (Óxido de zinc)	50,00	mg.kg <sup>-1</sup>
E8 Selenio (Selenito de sodio)	0,15	mg.kg <sup>-1</sup>
Vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas, de efecto análogo		
E672 Vitamina A	30 000,00	U.I.kg <sup>-1</sup>
E671 Vitamina D3	11 000,00	U.I.kg <sup>-1</sup>
Vitamina E	50,00	mg.kg <sup>-1</sup>
Antioxidante		
E321 Butilhidroxitolueno (B.H.T)	50,00	mg.kg <sup>-1</sup>
Digestivos		
1700 Bacillus licheniformis (DSM 5749), Bacillus subtilis (DSM 5750)	1,28x10 <sup>9</sup>	UFC.kg <sup>-1</sup>

**Anexo 2.** Composición del pienso complementario de lactancia (Raltec®).

Maíz (contiene organismos genéticamente modificados), cebada, harina de extracción de soja tostada y decorticada (producido a partir de habas de soja modificada genéticamente), trigo, aceite vegetal de coco, aceite vegetal de palma, suero de leche, Fosfato bicálcico, Carbonato de calcio, Cloruro de sodio, harinillas de trigo. En las tablas C y D se describe el análisis de los componentes del pienso complementario y los aditivos presentes en el pienso.

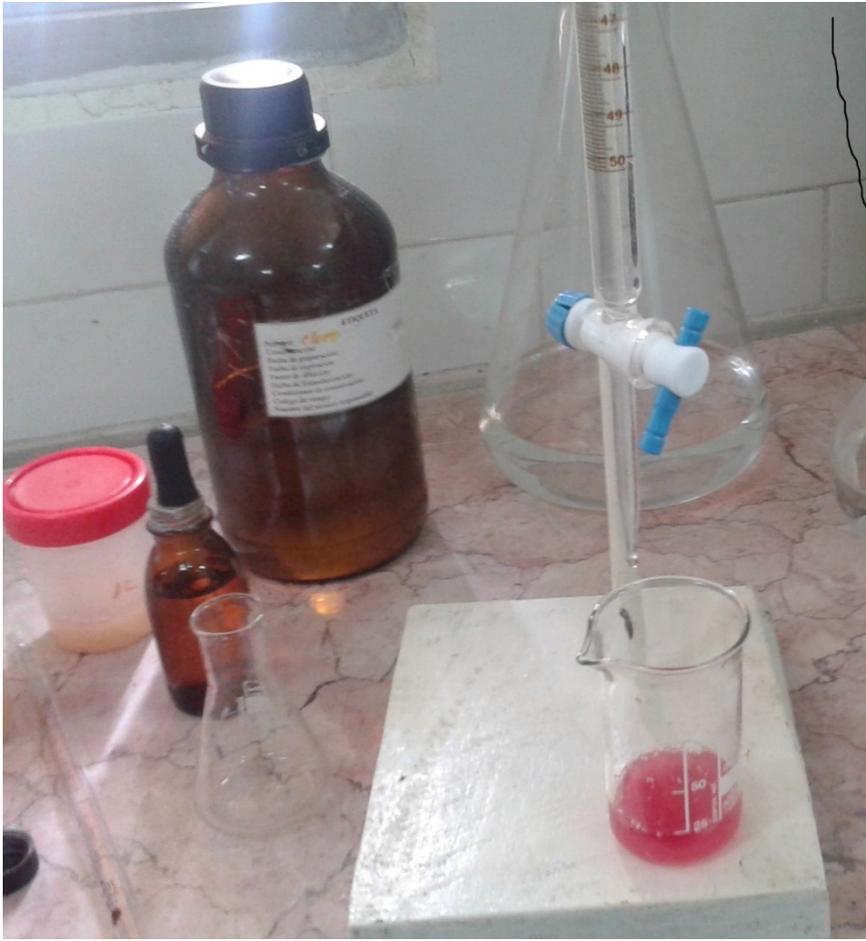
Tabla C. Componentes analíticos del pienso complementario de lactancia (Raltec®).

Componentes	%
Proteína bruta	16
Fibra bruta	4,5
Aceites y grasas brutos	4,30
Ceniza bruta	7,96
Calcio	0,9
Sodio	0,31
Fósforo	0,67
Humedad	10,8

Tabla D. Aditivos presentes en el pienso complementario de lactancia (Raltec®).

Vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo		
Vitamina A (Retinol) E-672	10 200,0	U.I.kg <sup>-1</sup>
Vitamina D3 (Colecalciferol) E-671	1 140,0	U.I.kg <sup>-1</sup>
Vitamina E (acetato de todo-rac-a-Tocoferilo)3a700	45,0	mg.kg <sup>-1</sup>
Antioxidante		
E321 Butilhidroxitolueno (BHT)	100,0	mg.kg <sup>-1</sup>
Conservantes		
E330 Ácido cítrico	60,0	mg.kg <sup>-1</sup>
Antiaglomerantes		
E551b Sílice Coloidal	1 000,0	mg.kg <sup>-1</sup>
1m558i Bentonita	500,0	mg.kg <sup>-1</sup>
E562 Sepiolita	10 000,0	mg.kg <sup>-1</sup>
Oligoelementos		
Hierro (Sulfato ferroso monohidratado) E1	60,00	mg.kg <sup>-1</sup>
Yodo (Yoduro de potasio) E2	3,00	mg.kg <sup>-1</sup>
Cobre (Sulfato cúprico pentahidratado) E-4	15,00	mg.kg <sup>-1</sup>
Manganeso (Óxido manganeso) E5	34,40	mg.kg <sup>-1</sup>
Zinc (Óxido de zinc) E6	58,60	mg.kg <sup>-1</sup>
Selenio (Selenito de sodio) E8	0,40	mg.kg <sup>-1</sup>
Digestivos		
E1704 Saccharomyces cerevisiae CBS	493,94 2x10 <sup>9</sup>	UFC.kg <sup>-1</sup>

### Anexo 3



Pruebas de acidez realizada al bioproducto