

Obtaining, characterization and evaluation of two candidate preparations for probiotics developed with agroindustrial waste

Obtención, caracterización y evaluación de dos preparados candidatos a probióticos desarrollados con residuos agroindustriales

José E. Miranda-Yuquilema^{1,2*} M.Sc, Alfredo Marin-Cárdenas² Ph.D, Davinia Sánchez-Macías³ Ph.D, Yaneisy García-Hernández⁴ Ph.D.

¹Becario del Instituto de Talento Humano, SENESCYT, Ecuador. ²Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de producción animal, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Cuba. ³Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ingeniería, Departamento Producción Animal e Industrialización, Avda. Antonio José de Sucre s/n, Riobamba, Ecuador. ⁴Instituto Ciencia Animal, Carretera Central km 47 ½, Apartado No. 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. *Correspondence: efra_miranda@outlook.com

Received: June 2017; Accepted: December 2017.

ABSTRACT

Objective. Obtain, characterize and evaluate two bio-prepares developed from the sugar cane molasses - orange vinasse fermented with yeast and/or lactic acid bacteria. **Materials and methods.** A completely randomized design was used, with five repeats per treatment. The evaluated treatments were: T1, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y T2, the previous bacteria plus *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV). The previous mentioned microorganisms were inoculated in a substratum compounded by molasses - vinasse and these were incubated at 37°C for 24 hours. To the bioprepares, physiochemical, microbiological and *in vitro* tests was made to evaluate the probiotic capacity. **Results.** Both bioprepares presented a dark brown color, sweet and a pH lesser than 4. The bromatological and microbiologic development were higher ($p>0.05$) in T2. Both bioprepares the viability was higher than 92%. *in vitro* tests two bioprepares were resistant to an acid pH, bile salts, broad spectrum of microbial activity and inhibitory effect to *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. **Conclusions.** The bioprepares obtained from sugar cane molasses - orange vinasse fermented with yeast and lactic acid bacteria manifested physiochemical and microbiologic properties appropriated to probiotic products. In *in vitro* tests, their potential was demonstrated as a probiotic.

Keywords: Mixed culture, probiotic effect, molasses, *in vitro* test, vinasse (Source: MeSH).

RESUMEN

Objetivo. Obtener, caracterizar y evaluar dos biopreparados desarrollados a partir de melaza de caña de azúcar - vinaza de naranja fermentados con levaduras y/o bacterias ácido lácticas. **Materiales y métodos.** Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones por tratamiento. Los tratamientos evaluados fueron: T1, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y T2, las bacterias anteriores más *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis* (L-4

UCLV). En un sustrato compuesto por melaza- vinaza se inocularon los microorganismos anteriormente mencionados y estos fueron incubados a 37°C por 24 h. Se les determinaron a los biopreparados los parámetros fisicoquímicos, microbiológico y se realizaron las pruebas *in vitro* para evaluar la capacidad probiótica. **Resultados.** Ambos biopreparados presentaron un color marrón oscuro, dulzón y con pH inferior a 4. El comportamiento bromatológicos y microbiológicos fueron mayores ($p > 0.05$) en el T2. En ambos biopreparados la viabilidad fue superior a 92%. En pruebas *in vitro*, ambos biopreparados fueron resistentes a pH ácido, sales biliares, amplio espectro de actividad antimicrobiana y efecto inhibitorio a la *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*. **Conclusiones.** Los biopreparados obtenidos a partir de melaza de caña de azúcar-vinaza de naranja fermentados con levaduras y/o bacterias ácido lácticas demostraron propiedades físicoquímicas, microbiológicas apropiadas para productos probióticos. En las pruebas *in vitro*, se demostró su efecto potencial como probiótico.

Palabras claves: Cultivo mixto, efecto probiótico, melaza, pruebas "in vitro", vinaza (Fuente: MeSH).

INTRODUCTION

The last decades of the past century, the most employed method in order to prevent diseases and improve the alimentary efficiency, was the use of antibiotics. Nevertheless, antibiotics may have negative influences because they could provoke resistance of pathogens to some drugs, such as, the presence of residues of medicines in animal made products. Also, affects the flora presented in the organism provoking a microbiological imbalance in the host (1).

Probiotics are live microorganisms (bacteria and yeast), and they are employed with the goal of improve the health and the productive performance in the host. For this reason, today is suggested to administer microorganisms with a probiotic effect in animal production as an alternative to reduce the diarrheic disorders, improve the animal health and increase the productivity (2). Probiotics microorganisms can be developed from simple cultures or mixing bacteria with yeast; and, when applied to animals or the man, they have a positive benefit in their health (3). Also, probiotics stimulate the immune system and they take part in the correction of the microbial natural balance of the host (2). Nevertheless, the obtaining mode of probiotics is not totally clear, so, evaluation is essential in order to optimize their use (4). According to previous studies, these microorganisms could adhere and survive in the gastrointestinal tract of the animals, where they act stabilizing and protecting the inner ecosystem (5).

Probiotics microorganisms can be found in different habitats such as soil, water, human and gastrointestinal tract, and in fermented products and food (4). The most commonly used genres in the development of probiotics prepares of veterinary use are: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* and *Bacillus*, such as yeasts of the genres *Saccharomyces*, *S. boulardii* and *Kluyveromyces* (3).

INTRODUCCIÓN

A finales del siglo pasado, el método más empleado para prevenir enfermedades y mejorar la eficiencia alimenticia, fue el uso de antibióticos. Sin embargo, se ha comprobado que estos tienen influencias negativas porque puede provocar la resistencia de los agentes patógenos a los fármacos, así como, la presencia de residuos de los medicamentos en los productos de origen animal. Así mismo, afecta a la flora presente en el organismo provocando un desequilibrio microbiológico en el huésped (1).

Los probióticos son microorganismos vivos (bacterias y levaduras), los mismos son empleados con la finalidad de mejorar la salud y el rendimiento productivo en el hospedero. Por tal razón, actualmente se sugiere administrar microorganismos con efecto probiótico en la producción animal como una alternativa para reducir la incidencia de los trastornos diarreicos, mejorar la salud animal y para incrementar la productividad (2). Los microorganismos probióticos pueden ser desarrollados a partir de cultivos simples o mezcla entre bacterias y levaduras; y éstos, aplicados a los animales o al hombre, benefician favorablemente su salud (3). Así mismo, los probióticos son estimuladores del sistema inmune y participan en la corrección del balance microbiano natural del huésped (2). Sin embargo, el modo de obtención de los probióticos no está totalmente claro, por lo que su evaluación es esencial para optimizar su uso (4). De acuerdo a estudios previos, estos microorganismos podrían adherirse y sobrevivir en el tracto gastrointestinal de los animales, donde actúan estabilizando y protegiendo el ecosistema interno (5).

Los microorganismos probióticos pueden encontrarse en diferentes hábitats como el suelo, agua, tracto gastrointestinal de los humanos y animales, así como en alimentos y productos fermentados (4). Los géneros más comúnmente utilizados en el desarrollo de los preparados

In this days several studies prove the goodness that agro-industrial residues have with previous treatment, to develop biological products of veterinary use, being suitable as additives in animal alimentation, such as a source of microbial development because they contain low concentrations of soluble sugars and a high protean value (3,5).

An important aspect in the development of probiotic products is the selection of an appropriated and financial faceable culture medium for productions. Different probiotic strains, generally, require different culture media according to their physiological characteristics (3). These media may be very complex and expensive, like the MRS medium (6) for lactic acid bacteria. According to Miranda (7) the agro-industrial sub products (molasses, milk serum, soy milk, vinasse) are available sources that can be employed with efficiency for the growing and development of the microorganisms with probiotic activities. The objective of the present study was to obtain, characterize and evaluate two bio-prepares developed from sugar cane molasses - orange vinasse fermented with yeast and or lactic acid bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Site of study. Experimental work was performed at the Bromatology and Microbiology laboratories, Science Faculty, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Animal production and industrialization laboratories, Engineering Faculty, Universidad Nacional de Chimborazo (Riobamba, Ecuador) and Microbiology Laboratory, Agricultural Sciences Faculty, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (Cuba).

Raw material characteristics. Orange vinasse is characterized for have a 20%(v/v) Dry matter (DM), 2.5% (v/v) Ash, 19%(v/v) Crude protein (CP), 10%(v/v) True protein (TP) and a pH of 3.56. Molasse presented an 85%(m/v) DM, 1.1% (m/m) Ash, 2.7% (m/v) CP, 0.8% (m/v) TP, pH of 5.8 and 72° Brix.

Selection, activation of strains and biomass obtaining. Selected strains for the obtaining of probiotic capacity prepares was: *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV) from the Microorganisms Bank of the Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas and four strains ATCC (American Type Cultures Collection, EEUU); *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus bulgaricus* 11842, *Streptococcus thermophilus* 19258 and *Saccharomyces cerevisiae* 9763. The strains in

probióticos de uso veterinario son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* y *Bacillus*, así como levaduras del género *Saccharomyces*, *S. boulardii* y *Kluyveromyces* (3).

En la actualidad varios estudios demuestran las bondades que tienen los residuos agroindustriales con previo tratamiento, para desarrollar productos biológicos de uso veterinario, siendo aptos como aditivos en la alimentación animal, así como fuente de desarrollo microbiano por contener bajas concentraciones de azúcares solubles y un alto valor proteico (3,5).

Un aspecto importante en el desarrollo de productos probióticos es la selección de medios de cultivos adecuados y económicamente factibles para sus producciones. Diferentes cepas probióticas, generalmente, requieren distintos medios de cultivos según sus características fisiológicas (3). Estos medios pueden ser muy complejos y costosos, como es el caso del medio MRS (6) para bacterias ácido láctico. Según Miranda (7) los subproductos agroindustriales (melaza, suero de leche, leche soya, vinaza) son fuentes disponibles que se pueden emplear de forma eficiente para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos con actividad probiótica. El objetivo del presente estudio fue obtener, caracterizar y evaluar dos biopreparados desarrollados a partir de melaza de caña de azúcar - vinaza de naranja fermentados con levaduras y/o bacterias ácido lácticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Bromatológica y Microbiología, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Laboratorio de Producción Animal e Industrialización, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Chimborazo (Riobamba, Ecuador) y Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (Cuba).

Característica de la materia prima. La vinaza de naranja se caracteriza por tener un 20%(v/v) Materia seca (MS), 2.5%(v/v) Ceniza (Cz), 19%(v/v) Proteína cruda (PC), 10%(v/v) de Proteína verdadera (PV) y un pH de 3.56. La melaza presentó un 85%(m/v) MS, 1.1% (m/m) Cz, 2.7% (m/v) PC, 0.8% (m/v) PV, pH de 5.8 y 72° Brix.

Selección, activación de las cepas y obtención de biomasa. Las cepas seleccionadas para la obtención de los preparados con

freeze-dried format, were activated individually in an Erlenmeyer of 250 mL of capacity which contained 120 mL of triptona soy culture medium (BD Trypticase™, BDL™. 211768, EEUU) at 37°C for the case of bacteria and 30°C for yeast, in a stove with an orbital agitator (Inkubationshaube TH 15, Germany) at 60 rpm for 6 h. They were next growth in a dish with a culture medium Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe M6411-500G, HEMEDIA®, India) and Nutritive (Nutr, 213000-BD Disco™, EEUU) for *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, respectively. Agar Sabouraud was used for the yeast (Sabrd 211584-BD BBL™, EEUU). The lactobacilli were grown under anaerobic conditions using the container (GasPak Plus™).

Once the microorganisms were activated, the obtaining of two biomasses was next. T1, was composed by 0.05 mg (Radwag Analytic Scale AS 220/C/2, Switzerland) of biomass obtained from the affluent growing of which one of the bacteria strains, *L. acidophilus* (9.3×10^7 UFC/mL), *L. bulgaricus* (8.9×10^8 UFC/mL) and *S. thermophilus* (9.2×10^8 UFC/mL), cultured in selective media (MRS and Nutr). T2, contained lactic bacteria from biomass T1 plus *S. cerevisiae* (9.3×10^7 UFC/mL) and *K. fragillies* (L-4 UCLV) (9.4×10^7 UFC/mL) cultured on Agar Sabrd. The mixes of this biomasses were inoculated in an Erlenmeyer with a capacity of 500 mL that contained 250 mL of sterile cow milk at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ and was incubated at 37°C for 24 h. The mixes of these micro-organisms were inoculated in an Erlenmeyer with a capacity of 500 mL that contained 250 mL of sterile cow milk at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ and was incubated at 37°C for 24 h. Finally, an initial recount was performed on the dish to verify the viability of the strains.

Obtaining of the probiotic prepared candidates. In an Erlenmeyer of 2.0 L of capacity, 600 g of sugar cane molasses and 1.00 L of orange vinasse was added, these were homogenized at 150 rpm with a magnetic agitator (JOAN o OEM, MS001, CN; Switzerland) at 28°C for 10 minutes, at the end of this time the molasses-vinasse substrate contained 78° Brix. Continuously 250g (9.2×10^7 UFC/mL MRS, 9.3×10^7 UFC/mL Nutr.) and (9.4×10^8 UFC/mL MRS, 9.3×10^7 UFC/mL Nutr. 9.5×10^8 UFC/mL and Sabrd) of the biomasses T1 and T2 previously obtained separately were inoculated for the development of the T1 and T2 bio-prepares respectively. Five repetitions were performed for each bio-prepare. After incubation at 37°C for 24 h, in a stove (Memmert UN 30 PLUS, 1942794, Germany), in a 500 mL capacity Erlenmeyer 250 mL of the bioprepares was added (T1 and T2), in study and separately for its respective characterization.

capacidad probióticos fueron: *Kluyveromyces fragillis* (L-4 UCLV) proveniente del Banco de Microorganismos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas y cuatro cepas ATCC (American Type Cultures Collection, EEUU); *Lactobacillus acidophilus* 4356, *Lactobacillus bulgaricus* 11842, *Streptococcus thermophilus* 19258 y *Saccharomyces cerevisiae* 9763. Las cepas en formato liofilizados, fueron activadas individualmente en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad que contenían 120 mL de caldo soya triptona (BD Trypticase™, BD BBL™. 211768, EEUU) a 37°C para el caso de bacterias y 30°C para las levaduras, en una estufa con agitador orbital (Inkubationshaube TH 15, Alemania) a 60 rpm durante 6 h. Seguidamente fueron cultivadas en placa con medio de cultivo Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe M6411-500G, HEMEDIA®, India) y Nutritivo (Nutr, 213000-BD Difco™, EEUU) para *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, respectivamente. Para las levaduras se utilizó Agar Sabouraud (Sabrd 211584-BD BBL™, EEUU). Los lactobacilos fueron cultivados en condiciones anaerobias utilizando la jarra GasPak Plus™.

Una vez activados los microorganismos, se procedió a se procedió a obtener dos biomasa. T1, estaban compuesto por 0,05 mg (Balanza Analítica Radwag AS 220/C/2, Suiza) de biomasa obtenida a partir de crecimiento afluyente de cada una de las cepas de bacterias, *L. acidophilus* (9.3×10^7 UFC/mL), *L. bulgaricus* (8.9×10^8 UFC/mL) y *S. thermophilus* (9.2×10^8 UFC/mL), cultivadas en medios selectivos (MRS y Nutr). T2, contenían bacterias lácticas de la biomasa T1 más *S. cerevisiae* (9.3×10^7 UFC/mL) y *K. fragillies* (L-4 UCLV) (9.4×10^7 UFC/mL) crecidas en agar Sabrd. Las mezclas de estas biomasa fueron inoculadas en un Erlenmeyer de 500 mL de capacidad que contenía 250 mL de leche de vaca estéril a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y se incubó a 37 °C durante 24 h. La mezcla de estos microorganismos fue inoculada en un Erlenmeyer de 500 mL de capacidad que contenía 250 mL de leche estéril a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y se incubó a 37°C durante 24 h. Finalmente se realizó un recuento inicial en placa para verificar viabilidad de las cepas.

Obtención de los preparados candidatos a probióticos. En un Erlenmeyer de 2.0 L de capacidad, se añadió 600 g de melaza de caña de azúcar y 1,00 L de vinaza de naranja, estos fueron homogenizados a 150 rpm con un agitador magnético (JOAN o OEM, MS001, CN; Suiza) a 28°C durante 10 minutos, al finalizar este tiempo el sustrato melaza-vinaza contenía 78 °Brix. Seguidamente se inocularon 250 g (9.2×10^7 UFC/mL MRS, 9.3×10^7 UFC/mL Nutr.) y (9.4×10^8 UFC/mL MRS, 9.3×10^7 UFC/mL Nutr.)

Chemical composition, pH and instrumental color. CP and TP determination were performed following the methodology described by Dadvar et al (8); the DM, Ash and the ethereal extract (EE) was determined by AOAC methods (9). Simultaneously, in a parallel sample the evolution of pH since the biomass blending with the agroindustrial wastes was analyzed every hour until 24 hours of incubation at 37°C. In a pHmetro (HANNA® *H 110, USA) was used. The instrumental color was measured with a colorimeter (CR-400, Konika Minolta, Japan) in the CIELab* system with a wave length of 440 nm, 10 nm of resolution and through color comparison with HTML Code.

Microbiological analysis. From each bioprepares 5.0 mL were taken and both was homogenized with a physiological saline solution with a ratio of 1/10 (v/v). Serial dilutions were performed of (1/10, (v/v)) until 0.5 scale of the MacFarland scheme. The samples were planted in Petri dishes with Agar MRS, Nutr. y Sabrd. media. Then, were incubated for 24 h at 37°C and 30°C for bacteria and yeast, respectively. The number of colony former units (CFU/mL) was quantified by visual counting of the colonies.

Bile salts tolerance. In order to evaluate the bile salts tolerance, a culture medium was prepared, with nutritive culture medium supplemented with bile salts (Bile Ovgall Difco®, USA) in a concentration of 0.35% (w/v). The bioprepares were inoculated (T1 and T2) by separately in a concentration of 9.5×10^9 UFC/mL and were incubated for 24 h at 37°C. Subsequently, recounts were made in Petri dishes using the techniques described by Ortiz et al (10).

Gastric secretions resistance. Determine the resistance to the gastric secretions, this one was artificially prepared using the technique described by Ortiz et al (10). The control was adjusted to a pH of 6.5-7.0 with NaOH 5 N. The sterilization was made using membrane filtration of 22 µm. In the artificial gastric secretion and the control were inoculated with the probiotics with a concentration of 9.8×10^9 UFC/mL. Continuously was proceed to incubate at 37°C, and samples were toled 24 h after inoculation. Lastly, recounts were made through the technique used by Rodríguez-González (11).

Catalase activity. Measure of the catalase test was performed according Rodríguez-González (11), using hydrogen peroxide at 30% (v/v) over the grown colonies in the different culture media.

Hemolysis test. Measure of the catalase test was performed according Rodríguez-González

9.5×10^8 UFC/mL y Sabrd) de las biomazas T1 y T2 previamente obtenidas por separado para el desarrollo de los biopreparados T1 y T2 respectivamente. Se realizaron cinco repeticiones para cada biopreparado. Tras la incubación a 37°C durante 24 h, en una estufa (Memmert UN 30 PLUS, 1942794, Alemania), en un Erlenmeyer de 500 mL de capacidad se añadieron 250 mL de biopreparados (T1 y T2) en estudio y por separado para su respectiva caracterización.

Composición química, pH y color instrumental. La determinación de PC y PV se realizó siguiendo la metodología descrita por Dadvar et al (8); la MS, Cz y extracto etéreo (EE) se determinó mediante métodos de AOAC (9). Al mismo tiempo en una muestra paralela se analizó la evolución de pH desde el momento de la mezcla de las biomazas con los residuos agroindustriales cada hora hasta las 24 h de incubación a 37°C. Se utilizó un pHmetro (HANNA® *H 110, USA). El color instrumental se midió con un colorímetro (CR-400, Konika Minolta, Japón) en el sistema CIELab* con 440 nm de longitud de onda, resolución de 10 nm y mediante comparación de color con el Código HTML.

Análisis microbiológico. Se tomaron 5.0 mL de cada biopreparado y se homogenizaron con solución salina fisiológica a razón de 1/10 (v/v). Se realizaron diluciones seriadas de (1/10, (v/v)) hasta la escala 0,5 del esquema MacFarland. Las muestras se sembraron en las placas Petri con los medios agar MRS, Nutr y Sabrd. A continuación, se incubaron por 24 h a 37°C y 30°C para bacterias y levaduras, respectivamente. El número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se cuantificó por conteo visual de las colonias.

Tolerancia a sales biliares. Para evaluar la tolerancia a las sales biliares, se preparó un medio de cultivo caldo nutritivo suplementado con sales biliares (Bile Ovgall Difco®, USA) en concentración de 0.35% (p/v). Se inocularon los biopreparados (T1 y T2) por separado en una concentración de 9.5×10^9 UFC/mL y se incubaron por 24 h a 37°C. Posteriormente se hicieron recuentos en placa Petri mediante las técnicas descritas por Ortiz et al (10).

Resistencia a jugos gástricos. Para determinar la resistencia a los jugos gástricos, éste se preparó artificialmente mediante la técnica descrita por Ortiz et al (10). El control se ajustó a pH de 6,5-7,0 con NaOH 5 N. La esterilización se llevó a cabo por filtración con membrana de 0,22 µm. En el jugo gástrico artificial y el control se inocularon con los probióticos con una concentración de 9.8×10^9 UFC/mL. Seguidamente se procedió a incubar a 37°C, y se tomaron

(11), using hydrogen peroxide at 30% (v/v) over the grown colonies in the different culture media.

Origin, maintenance and activation of the pathogen microorganism's indicators.

As indicator pathogen microorganisms was used *Escherichia coli* spp. *Salmonella* spp. *Streptococcus aureus*. Obtained from the bank of strains of the Microbiology Laboratory, Natural and Exact Sciences Faculty, Pontifical Catholic University of Ecuador, Quito, Ecuador. The isolated were conserved at -80°C in a BHI culture medium with glycerol (Brain Heart Infusion Difco®, EEUU).

Antagonism determination of the bioprepared candidates to probiotics.

Treatment T1 and T2, previously activated separately in a nutritive culture medium (234000-BD Difco™, EEUU), were inoculated in Petri dishes with Agar MRS, Nutr. and Sabrd, according the technique described by Ortiz et al (10). Subsequently, the dishes were incubated at 37°C for 48 h. After the formation of visible colonies, 10 mL of BBL culture medium (212207 - BD BBL™ Enterococcosel™, EEUU) were poured on the dishes, which contained 0.01 mL of the indicator pathogen strain with a concentration of 9.2×10^7 UFC/mL and then were incubated at 37°C for 48 h. The antagonist activity was verified for the formation of transparent zones around the colonies greater than 1.0 mm. In order to verify the nature of the inhibition the described technique of Rizzello et al (13) was performed.

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos.

The modified method of diffusion in an impregnated disk (Bioanalyse®, USA) was used. The used antimicrobial was: Ampicillin (AMC) 10 µg, Gentamicin (CN) 10 µg, Streptomycin (S) 300 µg, Erythromycin (E) 15 µg and Penicillin G (P) 10 µg. An *Escherichia coli* spp. strain was used as control

A proportion of 0.1-0.2 mL of each bioprepares, corresponding to a cellular concentration of 9.8×10^9 UFC/mL, was distributed into the Petri dishes that contained Agar MRS, Nutr. and Sabrd for the bio-prepares T1 and T2. Meanwhile, for the control strain, the Agar BBL (211221-BD BBL™, EEUU) were used. With that purpose the technique of superficial spreading of the inoculate was employed and then the antibiotic dishes were placed. Were incubated for 48 h under anaerobic conditions for MRS and aerobic for the rest. After incubation, the inhibition halos were measured through the techniques described by Sourav and Arijit (14) and Rodríguez-González (11).

muestras a las 24 h después de inocular. Finalmente, se realizó recuentos mediante la técnica utilizada por Rodríguez-González (11).

Actividad de catalasa. La medición de la prueba de catalasa se realizó según Rodríguez-González (11), utilizando peróxido de hidrógeno al 30% (v/v) sobre las colonias crecidas en los diferentes medios de cultivo.

Prueba de hemólisis. Se prepararon medios de cultivos que contenían agar MRS, Nutr y Sabouraud, luego de esterilizado la base se añadieron 5% (v/v) de sangre de cordero. Posterior a la dilución de biopreparados en suero fisiológico estéril hasta 0.5 de la escala MacFarland. Estos fueron sembrados en la superficie de las placas Petri con medios anteriormente descritas y se incubaron a 37°C y 30°C para las placas que contenían agar Sabrd, todos por 24 h. finalmente se realizaron la lectura mediante la metodología utilizada por Rodríguez-González (11).

Origen, mantenimiento y activación de los microorganismos patógenos indicadores.

Como microorganismos patógenos indicadores se utilizaron *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Streptococcus aureus*. Obtenidos en el banco de cepas del Laboratorio Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. Los aislados se conservaron a -80°C en caldo BHI con glicerol (Brain Heart Infusion Difco®, EEUU).

Determinación de antagonismo de los preparados candidatos a probióticos.

Los biopreparados T1 y T2, previamente activados por separado en caldo nutritivo (234000-BD Difco™, EEUU), se inocularon en placas de Petri con agar MRS, Nutr y Sabrd, según la técnica descrita por Ortiz et al (10). Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C por 48 h. Después de la formación de colonias visibles, se vertieron sobre las placas 10 mL de caldo BBL (212207 - BD BBL™ Enterococcosel™, EEUU), que contenían 0,01 mL de la cepa patogénica indicadora con una concentración de 9.2×10^7 UFC/mL y luego se incubaron a 37°C por 48 h. La actividad antagonista se verificó por la formación de zonas transparentes alrededor de las colonias mayores de 1.0 mm. Para verificar la naturaleza de la inhibición se realizó la técnica descrita por Rizzello et al (13).

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos.

Se utilizó el método modificado de difusión en disco impregnado (Bioanalyse®, USA). Los antimicrobianos utilizados fueron: Ampicilina (AMC) 10 µg, Gentamicina (CN) 10 µg,

Statistical analysis. The statistical Software STATGRAPHICS Centurion 15.1 was employed for the statistical treatment of data through a variance analysis ANOVA according to a completely randomized design (15).

RESULTS

Physicochemical characteristics of the prepares candidates to probiotics. The half values of color, organoleptic and pH of the prepares candidates to probiotics are resumed on table 1. These presented a low luminosity color with a medium rate of yellow and red, with a chrome that was in the first quadrant, which results in a dark brown color. Both probiotics presented a bittersweet smell and taste, of liquid consistence and acid pH. There were no significant differences ($p < 0.05$) between these bioprepares.

Table 1. Organoleptic characteristics and pH of the bio-prepares T1 and T2.

| Indicator | Treatments | | | |
|------------------------|-------------|----------|-------------|----------|
| | T1 | | T2 | |
| | L 31.85 | a* 11.48 | L 31.93 | a* 11.42 |
| Color (CIELab* System) | C* 27.08 | b* 24.52 | C* 26.41 | b* 23.81 |
| | H 64.91 | | H 65.31 | |
| Color (código HTML) | #603883B | | #613873B | |
| Flavour | Bittersweet | | Bittersweet | |
| Smell | Bitter | | Bitter | |
| Texture | Liquid | | Liquid | |
| pH | 3.88 ± 0.12 | | 3.85 ± 0.02 | |

Different letters in the same line differ ($p < 0.05$); **T1**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. **T2**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* y *K. fragilis* (L-4 UCLV). **L**: Luminosity, **a***: Red index, **b***: Yellow index, **C***: chrome **H**: Hue angle; **HTML**: color comparison.

Table 2 are shown the half values of the bromatological composition of the bio-prepares (T1 and T2). The DM and CP were greater ($p < 0.05$) in T2. Meanwhile the As, EE and TP, did not alter ($p > 0.05$) between treatments.

Figure 1, the kinetic of pH over the first 24 h of fermentation can be appreciated. The initial values of pH in both treatments were higher than 4, these were reduced below 4, independently ($p > 0.05$) to treatment, in the first 24 h post incubation.

Estreptomicina (S) 300 µg, Eritromicina (E) 15 µg, Ampicilina (AM) 10 µg y Penicilina G (P) 10 µg. Como control se utilizó una cepa de *Escherichia coli* spp.

Una alícuota de 0,1- 0,2 mL de cada biopreparado, correspondiente a una concentración celular de 9.8×10^9 UFC/mL, se distribuyó en placas de Petri que contenían agar MRS, Nutri y Sabrd para los bioprepares T1 y T2. Mientras tanto, para la cepa control, se utilizó Agar BBL (211221-BD BBL™, EEUU). Para ello se empleó la técnica de esparcimiento superficial del inóculo y después se colocaron los discos de los antibióticos. Se incubaron por 48 h bajo condiciones de anaerobiosis para MRS y aerobiosis para el resto. Tras la incubación se midieron los halos de inhibición mediante las técnicas descritas por Sourav y Arijit (14) y Rodríguez-González (11).

Análisis Estadístico. Se empleó el Software estadístico STATGRAPHICS Centurion 15.1, para el tratamiento estadístico de los datos mediante un análisis de varianza ANOVA según diseño completamente aleatorizado (15).

RESULTADOS

Características fisicoquímicas de los preparados candidatos a probióticos. Los valores medios de color, organoléptico y pH de los preparados candidatos a probiótico se resumen en la tabla 1. Éstos presentaron un color con baja luminosidad con índice medio de amarillo y rojo, con un croma que se situó en el primer cuadrante, lo que resulta en un color marrón oscuro. Ambos probióticos presentaron un sabor y olor agridulce, de consistencia líquida y pH ácido. No existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos bioprepares.

Table 2. Bromatological characteristics of the treatment T1 and T2.

| Indicator | Treatments | | EE ± P |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------|
| | T1 | T2 | |
| Dry Matter (% HB) | 18.12 ^b | 19.12 ^a | 0.12 |
| Organic Matter (%DM) | 3.14 | 3.15 | 0.01 |
| Ethereal extract (%DM) | 3.22 | 3.25 | 0.25 |
| Crude Protein (%DM) | 17.23 ^b | 18.51 ^a | 0.34 |
| True Protein (%DM) | 10.80 | 12.20 | 0.31 |

Different letters in the same line differ ($p < 0.05$). **T1**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. **T2**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* y *K. fragilis* (L-4 UCLV). **DM**: Dry Matter. **HB**: Humidity base

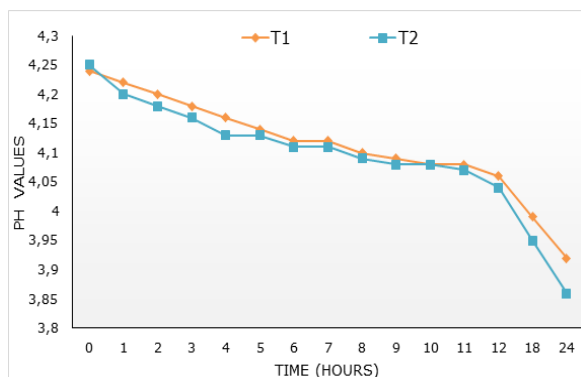


Figure 1. pH kinetic during 24 hours of both bio-prepares. **T1**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus*. **T2**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* + *K. fragilis* (L-4 UCLV).

Table 3, a microbial concentration is shown, the viability, and *in vitro* tests of the two biopreparet (T1 and T2), cultured in selective media (MRS, Nutr. and Sabrd) for their growing. At the moment of obtaining, the bioprepares presented a microbial concentration and a viability of 9.3×10^8 UFC/mL and 93% respectively, in T1. In the *in vitro* tests, the microorganisms used to obtain two biopreparations showed resistance to gastric juice conditions at 0.35% and bile salts at 0.30%. In addition, they presented negative catalase and hemolytic ganma.

The lactic acid levels differ ($p < 0.05$) between variants. Which explains the higher diminution of pH in the prepares candidate to probiotics.

Table 3. Microbial concentration, viability, and *in vitro* tests of bio-prepares T1 and T2, in selective culture media.

| Indicators | Treatments | | | | |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | T1 | | T2 | | |
| | Culture media | | Culture media | | |
| | MRS | Nutr | MRS | Nutr | Sabrd |
| Microbial concentration (log ² /mL) | $9.3 \times 10^8 \pm 0.02^b$ | $9.2 \times 10^8 \pm 0.21^b$ | $9.6 \times 10^9 \pm 0.06^a$ | $9.6 \times 10^9 \pm 0.03^a$ | $9.5 \times 10^9 \pm 0.31^a$ |
| Viability (%) | 92 $\pm 0.12^c$ | 92 $\pm 0.02^c$ | 94 $\pm 0.21^a$ | 93 $\pm 0.11^b$ | 94 $\pm 0.01^a$ |
| Lactic-Acid (mmol/mL) | 64 $\pm 0.01^b$ | 63 $\pm 0.04^b$ | 72 $\pm 0.03^a$ | 71 $\pm 0.12^a$ | 72 $\pm 0.06^a$ |
| Gastric Secretions 0.35% v/v | + | + | + | + | + |
| Bile Salts 0.30% | + | + | + | + | + |
| Catalase | - | - | - | - | - |
| Hemolysis | γ | γ | γ | γ | γ |

^{a,b} Different letters in the same line differ ($p < 0.05$); **T1**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus*. **T2**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* + *K. fragilis* (L-4 UCLV); **MRS**, agar milke sharpe. **Nutr**, Nutritive Agar. **Sabrd**, Sabouraud Agar; **(+)** and **(-)** positive and/or resistant and negative. γ, gamma hemolytic

En la tabla 2 se presentan los valores medios de la composición bromatológica de biopreparados (T1 y T2). La MS y PC fue mayor ($p < 0.05$) en el T2. En tanto la Cz, EE y PV, no variaron ($p > 0.05$) entre tratamientos.

En la Figura 1, se puede apreciar la cinética de pH en las primeras 24 horas de fermentación. Los valores iniciales de pH en ambos tratamientos estuvieron superiores a 4, estos fueron reducidos por debajo de 4, independientemente ($p > 0,05$) al tratamiento, en las primeras 24 horas posteriores a la incubación.

En la tabla 3, se presenta la concentración microbiana, la viabilidad, y las pruebas *in vitro* de los dos biopreparados (T1 y T2), cultivados en medios selectivos (MRS, Nutr y Sabrd) para su crecimiento. Al momento de la obtención, los biopreparados presentaron con una concentración microbiana y una viabilidad de 9.3×10^8 UFC/mL y 93 %, respectivamente, en el T1. En las pruebas "*in vitro*", los microorganismos empleados en la obtención de dos biopreparados demostraron resistencia a las condiciones de jugos gástricos a 0.35 % y a las sales biliares a 0.30 %. Además, presentaron catalasa negativa y ganma hemolítica. Los niveles de ácido láctico difirieron ($p < 0.05$) entre variantes. Lo cual explica la mayor disminución de pH en los preparados candidatos a probióticos.

Actividad antagonista y susceptibilidad antimicrobiana. En la tabla 4 se resume La actividad antagonista de los dos tratamientos frente a la *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. áureos*, no difirieron ($p < 0.05$) entre ellos T1 y T2.

Los microorganismos de los biopreparados T1 y T2 empleados en la obtención de los biopreparados en el estudio fueron sensibles a los antibióticos utilizados. Lo cual demuestra que los biopreparados hasta el momento no son capaces de generar antibio resistencia a estas drogas antimicrobianas, como se puede apreciar en la tabla 5.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto a las características físicas de ambos tratamientos en el presente estudio (Tabla 1) se debe fundamentalmente al empleo de los residuos de la agroindustria, el color marrón, en sus diferentes tonalidades se debe a la melaza de caña de azúcar, así mismo el sabor dulce y aroma ácido dulzón se debe al sustrato utilizado y a la formación de ácido graso débil de cadena corto en las primeras 24 horas.

Antagonist activity and antimicrobial susceptibility. table 4 the antagonist activity of the two treatments against *E. coli* spp., *Salmonella* spp. and *S. aureus*, is presented, there were no difference ($p < 0.05$) between T1 and T2.

Bioprepared (T1 and T2) employed in this study resulted sensitive to the used antibiotics. This shows that the bioprepares are no capable of generate antibiotic resistance to those drugs, as can be appreciated on table 5.

Table 5. Half values of halo diameter of anti-microbial susceptibility of the probiotic bioprepared (n=5).

| Antibióticos | T1 (HI mm) | T2 (HI mm) |
|--------------|--------------------------|--------------------------|
| Ampicilina | 10.2 ± 0.02 ^b | 0.7 ± 0.02 ^a |
| Gentamicina | 11.4 ± 0.03 ^b | 10.5 ± 0.01 ^a |
| Eritromicina | 12.2 ± 0.11 ^b | 11.1 ± 0.12 ^a |
| amoxicilina | 10.1 ± 0.23 | 0.9 ± 0.08 |
| Penicilina G | 0.8 ± 0.05 ^a | 10.5 ± 0.03 ^b |
| Estreptomina | 11.5 ± 0.01 | 11.3 ± 0.12 |

^{a,b} Different letters in the same line differ ($p < 0.05$). **T1**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. **T2**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* and *K. fragilis* (L-4 UCLV); **IH**: inhibition halos. **mm**, milimeter

DISCUSION

Results obtained according to physical characteristics in both treatments in the present study (Table 1) are owed fundamentally to the employ of the agroindustrial waste, the brown color, in the different tonalities is owed to the sugar cane molasses, also the sweet flavor and the bitter scent are owed to the used substrate and to the formation of weak acids of small chain in the first 24 hours. Making a product accepted by animals (7,12). Similar bioprepares (BIOPRANAL) was reported by Marin (16). The inclusion of these bioprepares to the animal diet will improve the animal health, by stimulate the immune system and inhibiting the growing of pathogen agents (3,17). Some bacterial species and ideal yeasts for the development of probiotics were mentioned by Sánchez et al (18), which help to control the fermentation in agroindustrial waste (7,16,17).

The results of the chemical composition of the treatments (T1 and T2) obtained in the present study (Table 2), were owed to the substrates employed in the fermentation, the DM is due of the quantity of the employed micro-organisms dead cells (bacteria and yeasts), joined to water

Table 4. Antagonist activity (IH: inhibition halo, mm, IZD: inhibition zone diameter) of the bio-prepares T1 and T2, against strains of indicator pathogens.

| Indicator Strains | Treatments | | | |
|-----------------------|--------------------------|-----|---------------------------|-----|
| | T1 | IZD | T2 | IZD |
| <i>E coli</i> spp | 23.6 ± 0.22 ^b | ++ | 25.7 ± 0.12 ^a | +++ |
| <i>Salmonella</i> spp | 20.2 ± 0.18 ^b | ++ | 21.45 ± 0.08 ^a | ++ |
| <i>S aureus</i> spp | 26.2 ± 0.12 | +++ | 26.5 ± 0.03 | +++ |

^{a,b} Different letters in the same line differ ($p < 0.05$); **T1**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. **T2**, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* y *K. fragilis* (L-4 UCLV); **IH**, inhibition halos; **++**, 20-25 mm; **+++**, 25-30 mm of **IZD**.

Haciéndose un producto aceptado por los animales (7,12). Similares biopreparados (BIOPRANAL) fue reportado por Marin et al (16). La inclusión de estos biopreparados en la dieta animal favorecería a la salud animal, al estimular el sistema inmune e inhibir el crecimiento de agentes patógenos (3, 17). Por su parte Sánchez et al (18) mencionan algunas especies bacterianas y levaduras ideales para desarrollar probióticos, los cuales ayudan a controlar la fermentación en subproductos de la agroindustria (7,16,17)

Los resultados de la composición química de los tratamientos (T1 y T2) obtenidos en el presente estudio (Tabla 2), fueron posiblemente debido a los sustratos empleados para su fermentación, el de la MS es por la cantidad de células muertas de los microorganismos empleados (bacterias y levaduras), unido a la evaporación del agua, al culminar su ciclo de desarrollo, de igual manera el aumento la PC y PV, se relaciona con la MS y a los microorganismos sedimentados al cumplir su etapa de vida, mientras que los valores de E.E es debido a las formaciones de éteres durante la fermentación. Sin embargo, los niveles obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los rangos admitidos por la FAO (5) para los aditivos microbianos con actividad probiótica. De modo similar, Sánchez et al (18) reportaron probióticos con contenidos de PC y Cz equivalentes a los obtenidos en el presente estudio. Mientras que, Miranda (7) indicaron la relación que existe entre el sustrato y los microorganismos empleados en el contenido nutritivo de los preparados microbianos, de manera que, al mejorar el sustrato aumenta la concentración de la materia orgánica fragmentada. Por su parte, Iyer et al (19) y Dadvar et al (8) reportaron que los microorganismos probióticos son capaces de

evaporation, at the end of the development cycle, in the same way the rising of CP and TP, is related with DM and the sedimented micro-organisms when finish the life time, meantime the values of EE are for the formation of weak acids of small chain and the ether formation during fermentation, nevertheless, the obtained levels in the present study are within the FAO permitted levels (5) for the microbial additives with probiotic activity. In a similar way, Sanchez et al (18) reported probiotics with CP and Ash contents equivalent to the obtained in the present study. Meanwhile, Miranda (7) indicated the existent relation between the substrate and the microorganisms employed in the nutritive content of the microbial prepares, in a way that, with the improvement of the substrate, the concentration of the fermented organic matter increases. By his part, Iyer et al (19) and Dadvar et al (8) reported that probiotic microorganisms are capable of form amino acids and peptides with biological activity, independently to the used raw material. While, Miranda (7) in previous studies, reported the effect of the physical factors and environments over the nutritive content of the microbial prepares.

One of the aspects acting on the reduction of pH in probiotics fermentations is the microbial specie, the employed substrates and the environment, in the obtention process (11, 21). Meanwhile, Nazef et al (21) reported a pH inferior to 3.90 in microbial cultures, employing skim milk, Marin (16), obtained similar values using substrates derivate from sugar cane molasses, milk serum and torula yeast, agroindustry waste. By his part, Jurado et al (17) and Patil et al (22) improved the quality of the microbial prepared by reducing pH and the load of pathogen agents. But the pH values obtained in the present study are still inferior to the values reported by authors (4, 7 and 11), when obtaining probiotics from pure or mixed strains

The microbiological results (Table 3), are owed to a homo fermentative developing of the employed micro-organisms, which provoked the improve of the lactic acid production in the microbial prepares obtained in the present study (8, 25). The micro-organisms with the capacity to produce lactic acid in the fermented products help to control the growing of *S. aureus* and *Clostridium* (26), fundamentally for the inhibitory action and the capacity of controlling the formation of gases in the nutritious bioproducts (19, 23). By his part, Perez et al (25) reported the importance of know the quantity of micro-organisms introduced to the animal and the effect of these micro-organisms. Similar microbiological values were reported to the present study by Khalil et al (26) and Jacela et al (23) when employed sugar cane molasses and milk serum to ferment *L. Acidophilus* and *S. cerevisiae*.

formar aminoácidos y péptidos con actividad biológica, independientemente a la materia prima utilizada. Mientras que, Miranda (7) en estudios previos, reportó el efecto de los factores físicos y ambientes sobre el contenido nutritivo de los preparados microbianos.

Uno de los aspectos que incide en la reducción de pH en las fermentaciones probióticas es la especie microbiana, los sustratos empleados y el ambiente, en el proceso de la obtención (11, 21). Mientras que, Nazef et al (21) reportaron pH inferior a 3,90 en cultivos microbianos, al emplear leche descremada, Marin (16), obtuvo valores similares cuando utilizaron sustratos a partir de melaza de caña y suero de leche y levadura de tórula, subproductos de la agroindustria. Por su parte, Jurado et al (17) y Patil et al (22) mejoraron la calidad de preparado microbiano al disminuir el pH y la carga de agentes patógenos. Pero los valores de pH obtenidos en el presente estudio, aún son inferiores a los reportados por autores (4, 7 y 11) al obtener probióticos a partir de cepas puras o mixtas.

Los resultados microbiológicos (Tabla 3), podría ser debido a un comportamiento homofermentativo de los microorganismos empleados lo que provoco a una mejora en la producción de ácido láctico en los preparados microbianos obtenidos en el presente estudio (8, 25). Los microorganismos con capacidad de producir ácido láctico en los productos fermentados ayudan a controlar el crecimiento de *S. aureus* y *Clostridium* (26), fundamentalmente por su acción inhibitoria y por la capacidad de controlar la formación de los gases en los bioproductos alimenticios (19, 23). Por su parte, Pérez et al (25) reportaron la importancia de conocer la cantidad de microorganismos que es introducido al animal y el efecto del mismo. Similares valores microbiológicos al presente estudio fueron reportados, por Khalil et al (26) y Jacela et al (23) al emplear melaza de caña de azúcar y suero de leche para fermentar *L. acidophilus* y *S. cerevisiae*.

Los cultivos mixtos desarrollados en subproductos de la agroindustria y su capacidad antagonica a los microorganismos patógenos (Tabla 4), fue debido a la acción de las bacterias ácido lácticas, mediante la producción de ácidos orgánicos débiles principalmente el ácido láctico, competen por los nutrientes, capacidad de sobrevivir en condiciones anaerobias ambiente inhostil para las bacterias aeróbicas (27). Al mismo tiempo, son capaces de producir ácido láctico, peróxido de hidrógeno, posiblemente bacteriocinas, las cuales son características del metabolismo de las bacterias ácido lácticas (13,24).

Mixed cultures developed in agroindustry waste and their antagonistic capacity to the pathogen microorganisms (Table 4), was owed to the action of the lactic-acid bacteria, through the production of weak acids of small chain, mainly the lactic acid, competing for the nutrients, their capacity to survive in anaerobic conditions, non-hostile environment for aerobic bacteria (27). At the same time, there are capable of produce lactic acid, hydrogen peroxide, possibly bacteriocins, which are characteristics of the metabolism of lactic-acid bacteria (13,24).

suggests that the bioprepares obtained in the present study could act against pathogen microorganisms (13,26). Similar result was reported by Marin (16) by employ *L. acidophilus* and *K. fragilis*, who observed changes in the proteins of the membranes that destroy the bile salts secreted by the enzymatic barrier, composed mainly of proteolytic enzymes such as pepsine, trypsin, and chemo-trypsin, those changes were lethal for multiple microorganisms such as *E. coli*. By his part, Heather et al (12) reported the resistance to bacteria and yeasts at different concentrations of gastric secretions. Meanwhile Rodríguez-González (11) reported a microbial concentration of 6.5×10^8 UFC/mL probiotic obtained from the *Lactobacillus spp.*, sufficient amount to establish them selves in the gastrointestinal tract. Perez et al (25) observed *in vitro* tests the growing of *Lactobacillus* on gastric conditions. The bioprepares obtained through molasses-vinasse fermented with yeasts and/or lactic acid bacteria, were capable of inhibit the growing of *E. coli*, *Salmonella spp.* and *S. aureus* strains. Similar results were reported by Khalil et al (26) by employ mixed cultures of lactic bacteria and yeasts.

Negative catalase, of the bio-prepares is characteristic of probiotic organisms and agree with the reported by Le Blanc et al (20), they describes that lactic strains do not present catalase enzyme. Rodríguez-González (11) and Ortiz et al (10), recommends perform *in vitro* tests before apply to the animals in order to rule out the existence of side effects and/or negatives of bio-prepares with probiotic activity (17,22,24).

In the test of antimicrobial susceptibility between antibiotics and the two bio-prepares (table 5), was observed that in both cases there are sensibility to all the antibiotics that were used. The anterior allows to predict that the use of mixed cultures developed through lactic-acid bacteria and yeasts selected in this research, would be recommended to perform *in vivo* studies to evidence their use as an alternative for antibiotics of veterinary usage (8,13). The

Esto sugiere que los biopreparados obtenidos en el presente estudio pudieran actuar frente los microorganismos patógenos (13,26). Similar resultado fue reportado por Marin (16) al emplear *L. acidophilus* y *K. fragilis*, quien observó cambios en las proteínas de las membranas que interlizan las sales biliares secretada en la barrera enzimática compuesta principalmente de enzimas proteolíticas tales como pepsina, tripsina y quimiotripsina, estos cambios fueron letales para muchos microorganismos como la *E. coli*. Por su parte, Heather et al (12) reportaron la resistencia bacterias y levaduras a diferentes concentraciones de jugos gástricos. Mientras que Rodríguez-González (11) reportó concentración microbiana de 6.5×10^8 UFC/mL probiótico obtenido a partir de *Lactobacillus spp.*, cantidad suficiente para instaurarse en el tracto gastrointestinal. Pérez et al (25) en pruebas "*in vitro*" observaron crecimiento de *Lactobacillus* en condiciones gástricas. Los biopreparados obtenidos a partir de melaza-vinaza fermentados con levaduras y/o bacterias ácido lácticas, fueron capaces de inhibir el crecimiento de las cepas de *E. coli*, *Salmonella spp* y *S. aureus*. Resultados similares fueron reportados por Khalil et al (26) al emplear cultivos mixtos de baterías lácticas y levaduras.

Catalasa negativa, de los biopreparados es característico de organismos probióticos y concuerda con los reportados por le Blanc et al (20), quienes describen que las cepas lácticas carecen de la enzima catalasa. Rodríguez-González (11) y Ortiz et al (10), recomiendan realizar pruebas "*in vitro*" antes de emplear a los animales para descartar la existencia de los efectos secundarios y/o negativos de los biopreparados con actividad probiótica (17,22,24).

En la prueba de susceptibilidad antimicrobiana entre antibióticos y los dos biopreparados (Tabla 5), se observó que ambos casos hay sensibilidad a todos los antibióticos utilizados. Lo anterior permite predecir que al uso de cultivos mixtos desarrollados a partir de bacterias ácido lácticas y levaduras seleccionadas en esta investigación, sería recomendable realizar estudios "*in vivo*" para evidenciar su uso como alternativa a antibióticos de uso veterinario (8,13). La sensibilidad de las cepas podría depender de la resistencia a ciertas concentraciones de antibióticos debido a la presencia de algunos plásmidos, o a propiedades particulares de la pared y membrana de estos microorganismos, por un mecanismo inespecífico que actúa frente a diferentes antibióticos y por las modificaciones en el gen que codifica, haciéndolos impermeables (10,21,27).

sensitivity of the strains could depend of the resistance to some antibiotic concentrations due to the presence of some plasmids, or to particular properties of the cell wall and membrane of these microorganisms, by a non-specific mechanism which act against different antibiotics and by the modifications in the encoder gene, making them impermeable (10,21,27).

Under the conditions of this study it can be concluded, the bioprepares obtained through sugar cane molasses - orange vinasse fermented with yeasts and/or lactic acid bacteria proved physiochemical, micro-biological properties with proper conditions for probiotic products. In *in vitro* tests a potential use as a probiotic was demonstrated by accomplish the basic parameters, such as: acid pH resistance, bile salts, broad spectrum of anti-microbial activity and inhibitory effect to the *E. coli* spp., *Salmonella* spp. and *S. aureus*.

Aknowledgments

The main author thanks the, SENESCYT for the scholarship of International Cooperation for the education of Doctor of Philosophy (Ph.D.). Also, to the Faculty of Sciences, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, (Ecuador) for facilitating the use of equipment and laboratories to develop the present study.

En conclusión, los biopreparados obtenidos a partir de melaza de caña de azúcar - vinaza de naranja fermentados con levaduras y/o bacterias ácido lácticas demostraron propiedades fisicoquímicas, microbiológicas con condiciones apropiadas para productos probióticos. Las pruebas "*in vitro*" se demostraron un potencial como probiótico al cumplir con los parámetros básicos, tales como: resistencia a pH ácido, sales biliares, amplio espectro de actividad antimicrobiana y efecto inhibitorio a la *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*.

Agradecimientos

El autor principal agradece a Instituto de Fomento a Talento Humano, SENESCYT por la beca de Cooperación Internacional para la formación de Doctor en Ciencias (Ph.D.), Así mismo, a la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, (Ecuador) por facilitar el uso de los equipos y los laboratorios de microbiología, clínica y bromatología para desarrollar el presente estudio.

REFERENCIAS

1. Giang H, Viet T, Ogle B, Lindberg J. Effects of different probiotic complexes of lactic acid bacteria on growth performance and gut environment of weaned piglets. *Livest Sci* 2010; 133(1):182-184.
2. Lyberg K, Lundh T, Pedersen C, Lindberg J. Influence of soaking, fermentation and phytase supplementation on nutrient digestibility in pigs offered a grower diet based on wheat and barley. *Anim Sci* 2006; 82(06):853-858.
3. Corr S, Li Y, Riedel C, O'Toole P, Hill C, Gahan G. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(18):7617-7621.
4. Begum M, Li HL, Hossain MM, Kim IH. Dietary bromelain-C.3.4.22.32 supplementation improves performance and gut health in sows and piglets. *Livest Sci* 2015; 180:177-182.
5. Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart, Wayne L. Bryden. Probiotics in animal nutrition - Production, impact and regulation. Editor Harinder P.S. Makkar. Paper No. 179. FAO, Animal Production and Health: Rome; 2016.
6. De MAN JC, ROGOSA M, SHARPE ME. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J Appl Microbiol* 1960; 23(1):130-135
7. Miranda-Yuquilema J.E. Evaluación del efecto probiótico en dos biopreparados obtenidos a partir de cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras. [Tesis M.Sc]. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara, Cuba; 2016.
8. Dadvar P, Dayani O, Mehdipour M, Morovat M. Determination of physical characteristics, chemical composition and digestion coefficients of treated lemon pulp with *Saccharomyces cerevisiae* in goat diet. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2015; 99(1):107-113.

9. AOAC. International Headquarters 2275 Research Blvd, Rockville: Maryland, USA; 2014.
10. Ortiz A, Reuto J, Fajardo F, Sarmiento S, Aguirre A, Arbeláez G, Gómez D. Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Univ Sci. 2008; 13(2):138-148.
11. Rodríguez-González M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. [Tesis Ph.D. en Ciencias]. Universitat Autònoma de Barcelona: Barcelona, España; 2009.
12. Heather K, Uri Y, Torey L, Meggan B, Thomas A. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. Curr Trends Microbiol 2013; 21(3):114-119.
13. Rezzillo C, Codo R, Sánchez D, Pinto D, Marzani B, Filannino P, et al Lactic acid fermentation as a tool to enhance the functional features of Echinacea spp. Microb Cell Fact 2013; 12:44.
14. Sourav B, and Arijit D. Study of and Cultural Parameters on the Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Indian Fermented Foods. Am J Food Techno 2010; 5(2):111-120.
15. Duncan DB. Multiple range and multiple F test. Biometric 1955; 11(1):1-42.
16. Marin-Cárdenas A. Desarrollo de la tecnología de producción del BIOPRANAL. [Tesis Ph.D en Ciencias]. Universidad Central de Las Villas: Villa Clara, Cuba; 2008.
17. Jurado Gámez H, Ramírez C, Martínez J. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. Rev MVZ Córdoba. 2013; 18:3648-3657.
18. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Perez T, Llanez M, Ferreira C. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. Rev Salud Animal 2015; 37(2):94-104.
19. Iyer R, Tomar S, Umamaheswari T, Singh R. *Streptococcus thermophilus*: a multifunctional lactic acid bacterium. Int Dairy J 2010; 20(3):133-141.
20. Le Blanc J.G., Sybesma, W., Starrenburg, M., Sesma, F., de Vos, W.M., de Giori, S. et al, Supplementation with engineered *Lactococcus lactis* improves the folate status in deficient rats. Nut 2010; 26(7):835-841.
21. Nazef L, Belguesmia Y, Tani A, Prévost H, Drider D. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-Campylobacter and anti-Listeria activities. Poult Sci 2008; 87(2):329-334.
22. Patil A K, Kumar S, Verma A K, Baghel P S. Probiotics as Feed Additives in Weaned Pigs. Livest Res Int 2015; 3(2):31-39.
23. Jacela Y, De Rouchey J, Tokach M, Goodband R, Nelssen J, Renter D, Dritz S. Feed additives for swine: Fact sheets – prebiotics and probiotics, and phytochemicals. J Swine Health Prod 2010; 18(3):132-136.
24. Pajarillo E, Chae J, Balolong M, Kim H, Kang D. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. J Gen Appl Microbiol 2014; 60(4):140-146.
25. Pérez M, Laurencio M, Rondón A, Milian G, Bocourt R, Arteaga F. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. Rev Salud Animal 2011; 33(3):147-153.
26. Khalil R, El Bahloul Y, Djadouni F, Omar S. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. PJN 2009; 8(3):242-250.
27. Klayraung S, Viernstein H, Sirithunyalug J, Okonogi S. Probiotic properties of lactobacilli isolated from thai traditional food. Sci. Pharm 2008; 76(3):485-503.