

Concentration of acid detergent fiber, neutral detergent fiber and lignin during solid state fermentation of apple (*Malus domestica*) derivatives

Concentración de fibra detergente ácido, fibra detergente neutro y lignina durante la fermentación en estado sólido de subproductos de manzana (*Malus domestica*)

C. Rodríguez Muela¹, H. E. Rodríguez Ramírez¹, D. Díaz Plascencia¹, R. Bocourt Salabarría² and C. Arzola Álvarez¹

¹Facultad de Zootenia y Ecología, Universidad autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Mexico

²Instituto de Ciencia animal, carretera Central, km 47½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: crmuela@gmail.com

In order to evaluate the changes in carbohydrate concentration (CHO) and the consequent loss of dry matter during the solid state fermentation of apple bagasse, two substrate sources were used, which corresponded to two treatments: T1 (100 % apple bagasse), T2 (66.6 % apple bagasse and 33.4 % waste apple). Dry matter, ash, dry matter loss, lactic acid, short chain fatty acids, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, lignin and *in vitro* digestibility of dry matter were measured. A mixed model of SAS was used to study the differences among these variables and substrate sources, days of solid state fermentation and their interaction were established as fixed effects. As random effects, repetitions within T1 and T2 were used. Dry matter of T1 was higher ($P < 0.05$) than that of T2. The percentage of DM increased as the fermentation time passed (3.65 % on day 0, 6.82 % on day 16). It was higher ($P < 0.05$) in T2 (5.23 vs. 4.49 %) than in T1. There was a higher loss of dry matter ($P < 0.05$) from day 0 to 8 in T1 regarding T2 (41.9 vs. 36.9 %, respectively). Acetic acid content was higher in T1 ($P < 0.05$) than in T2, day 0 (29.82 vs. 8.42 mg * g⁻¹ DM) and day 4 (13.40 vs. 1.64 mg * g⁻¹ DM). There were no differences in propionic and butyric acid content. The NDF, ADF and lignin of T1 decreased ($P < 0.05$), while, in T2, they increased ($P < 0.05$) during the time of fermentation. T1 had lower ($P < 0.05$) digestibility than T2, with differences ($P < 0.05$) due to the effect of fermentation day. It was found that, after 96 h of fermentation, 21.94 % of DM was lost in T1 and 17.55 % in T2. At 192 h, DM loss was 41.88 % and 36.92 % in T1 and T2, respectively. It is concluded that, during solid state fermentation, structural carbohydrates are used.

Key words: *apple bagasse, fermentation, yeast*

Solid state fermentation (SSF) has been used to improve nutritional value of some derivatives or substrates rich in fast-fermenting carbohydrates. Elías *et al.* (1990) reported an increase of true protein (TP) concentration due to the development of yeasts in sugar cane (*Saccharum officinarum*) bagasse. SSFAs are waste products of some microorganisms under anaerobic conditions (van Soest *et al.* 1991). In the SSF of sugar cane and sweet potato (*Ipomoea batatas*) mixtures, there is a ranging production of C₂. In addition, there may also be presence of C₃ in very low concentrations, which disappears after 48 h of SSF (Rodríguez *et al.*, 2001a).

The state of Chihuahua is the main producer of apple in Mexico. The waste apple, as the by-products from

Para evaluar los cambios en la concentración de carbohidratos y la consiguiente pérdida de materia seca durante la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana, se utilizaron dos fuentes de sustrato que se correspondieron con dos tratamientos: T1 (100 % de bagazo de manzana), T2 (66.6 % de bagazo de manzana y 33.4 % de manzana de desecho). Se midió la materia seca, cenizas, pérdida de materia seca, ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina y digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Se usó un modelo mixto de SAS para estudiar las diferencias entre estas variables en las fuentes de sustrato, como efectos fijos se estableció las fuentes del sustrato, días de fermentación en estado sólido y su interacción. Como aleatorio, se usaron las repeticiones dentro de T1 y T2. La MS de T1 fue mayor ($P < 0.05$) que la de T2. El porcentaje de MS se incrementó en la medida que pasó el tiempo de fermentación (3.65 % el día 0, 6.82 % el día 16). Resultó mayor ($P < 0.05$) en T2 (5.23 vs. 4.49 %) que en T1. Hubo mayor pérdida de MS ($P < 0.05$) del día 0 al 8 en el T1 con respecto al T2 (41.9 vs. 36.9 %, respectivamente). El contenido de ácido acético fue mayor en el T1 ($P < 0.05$) con respecto al T2, el día 0 (29.82 vs. 8.42 mg * g⁻¹ MS) y el día 4 (13.40 vs. 1.64 mg * g⁻¹ MS). No se observaron diferencias en el contenido de ácido propiónico y butírico. La FDN, FDay L en T1 disminuyeron ($P < 0.05$), en tanto que en T2 se incrementaron ($P < 0.05$) durante el tiempo de fermentación. T1 tuvo menor ($P < 0.05$) digestibilidad que T2, con diferencias ($P < 0.05$) por efecto del día de fermentación. Se encontró que, después de 96 h de fermentación, se perdió 21.94 % de la MS en el T1 y 17.55 % en el T2. En tanto que, a las 192 h, la pérdida de MS fue de 41.88 % y 36.92 % en T1 y T2, respectivamente. Se concluye que durante la fermentación en estado sólido se utilizan carbohidratos estructurales.

Palabras clave: *bagazo de manzana, fermentación, levaduras*

La fermentación en estado sólido (FES) ha sido empleada para mejorar el valor nutritivo de algunos subproductos o sustratos ricos en carbohidratos de rápida fermentación. Elías *et al.* (1990) informaron incremento en la concentración de proteína verdadera (PV) por el desarrollo de levaduras en el bagazo de caña (*Saccharum officinarum*). Los AGCC son productos de desecho de algunos microorganismos en condiciones anaerobias (van Soest *et al.* 1991). En la FES de mezclas de caña de azúcar y boniato (*Ipomoea batatas*) hay producción fluctuante de C₂. Además, también puede haber presencia de C₃ en concentraciones muy bajas, el cual desaparece después de 48 h de FES (Rodríguez *et al.* 2001a).

El Estado de Chihuahua es el principal productor de manzana de mesa en México. La manzana de desecho,

the juice industry of this fruit, represent a potential food source for animals, due to its low cost and highly fermentable nutrients by yeasts and bacteria. Currently, only about 20 % of the by-product is used for animal feed, and the rest is discarded into the environment, incinerated or used as compost, which generates greenhouse effect gases that represent a large flow of contaminants to the environment (Rodríguez *et al.*, 2010 and Dhillon *et al.* 2013).

“Manzarina” is a food for animal intake, produced by the solid state fermentation of apple by-products (Díaz *et al.* 2013). “Manzarina” has a high nutritional value, in terms of crude protein content. Because of its low moisture content, there is no possibility of being a perishable food, unlike the by-products from which it is obtained (apple bagasse and waste apple). However, it is possible that the “Manzarina” derived from apple bagasse (AB) has a higher nutritional quality than that of waste apple (WA).

This study starts from the hypothesis that with higher availability of fermentable carbohydrates, by adding a proportion of WA to the substrate, a better availability of sugars for the development of yeasts is generated and, therefore, of microbial protein, without existing important differences in the consistency of the substrates.

The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of rapidly fermentable sugars during the SSF of the apple bagasse, with the use of waste apple in the concentration of the carbohydrates within the by-product.

Materials and Methods

This study was carried out in the animal nutrition laboratory of the Faculty of Zootechnics and Ecology of the Autonomous University of Chihuahua.

In the fermentation, two treatments were used: apple bagasse (T1) and apple bagasse + ground waste apple (T2) in a ratio of 2:1 on a wet basis. Substrates were prepared to have a differential in the concentration of fermentable carbohydrates. Seventy-two plastic containers of 500 mL were used, in which ~ 350 g of substrate were deposited for fermentation. Each container was considered as one repetition, and each treatment had 36 repetitions.

AB was obtained three days before the beginning of procedure and WA two days earlier. The WA was milled one day prior to preparation of the T2 substrate mixture. Containers were placed in two incubators at a temperature of 30 ± 1 °C. According to previous studies (Elías *et al.*, 1990 and Díaz *et al.*, 2013), urea, minerals and ammonium sulfate were added to both substrates (AB or AB + WA) in a proportion of 1.5, 0.5 and 0.4 %, respectively, based on the wet weight of the substrate.

Substrates with nutrients were mixed four times a day, every 5 h for 16 d, starting the process at 08:00 h at d0, d1, d2, d4, d8 and d16 of fermentation.

como los subproductos provenientes de la industria de extracción de jugo de esta fruta, representan una fuente de alimento potencial para los animales, con la ventaja de su bajo costo y de poseer nutrientes altamente fermentables por parte de las levaduras y bacterias. Actualmente, solo se utiliza aproximadamente 20 % del subproducto para alimentación animal, y el resto se desecha al medio, incinerado o composteado, lo que genera gases de efecto invernadero que representan un gran flujo de contaminantes al medio (Rodríguez *et al.* 2010 y Dhillon *et al.* 2013).

La manzarina es un alimento para consumo animal, producido por la fermentación en estado sólido de subproductos de manzana (Díaz *et al.* 2013). La manzarina tiene un valor nutritivo mayor, en cuanto a contenido de proteína cruda. Por su bajo contenido de humedad, no tiene peligro de ser un alimento perecedero, a diferencia de los subproductos de los que se obtiene (bagazo de manzana y manzana de desecho). Sin embargo, es posible que la manzarina proveniente de bagazo de manzana (BM) tenga una calidad nutritiva mayor que la de manzana de desecho (MD).

Este estudio parte de la hipótesis de que con mayor disponibilidad de carbohidratos fermentables, al agregar una proporción de MD en el sustrato, se genera mayor disponibilidad de azúcares para el desarrollo de las levaduras y, por lo tanto, de proteína microbiana, sin que existan diferencias considerables en la consistencia de los sustratos.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de azúcares rápidamente fermentables durante la FES del bagazo de manzana, con la utilización de manzana de desecho en la concentración de los carbohidratos presentes en el subproducto.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

En la fermentación se usaron dos tratamientos: bagazo de manzana (T1) y bagazo de manzana + manzana de desecho molida (T2) en una proporción de 2:1 sobre base húmeda. Los sustratos se prepararon para tener un diferencial en la concentración de carbohidratos fermentables. Se utilizaron 72 recipientes de plástico de 500 mL, en los que se depositaron ~350 g de sustrato para fermentar. Cada recipiente se consideró una repetición, y cada tratamiento tuvo 36 repeticiones.

El BM se obtuvo tres días antes de iniciar el procedimiento y la MD dos días antes. La MD se molió un día antes de preparar la mezcla del sustrato de T2. Los recipientes se colocaron en dos incubadoras, a temperatura de 30 ± 1 °C. A ambos sustratos (BM o BM+MD) se les agregó urea, minerales y sulfato de amonio en proporción de 1.5, 0.5 y 0.4 % en base al peso húmedo del sustrato, según estudios previos (Elías *et al.* 1990 y Díaz *et al.* 2013).

Los sustratos con nutrientes se mezclaron cuatro veces al día cada 5 h durante 16 d, iniciándose el

Six containers (repetitions) were taken from each treatment, weighed and their content used to perform the corresponding analyzes. The weight of each vessel was recorded, before and after adding the substrate to be fermented. The difference weight was calculated by the weight of the substrate within each container.

Dry matter (DM), ash (A), DM loss due to SSF process (DML), short chain fatty acid (SCFA) concentration, structural carbohydrates (NDF, ADF), lignin (L) and *in vitro* digestibility of DM (IVDDM) were evaluated.

During the fermentation process, six containers with substrate (samples) from each treatment were taken at d0, d1, d2, d4, d8 and d16. The substrate was frozen at -4 °C. Subsequently, it was dehydrated at 60 °C, for at least 48 h in a forced air oven. The weight was recorded before and after, to calculate the percentage of DM and the loss of moisture (in percentage) to calculate later biomass loss due to the fermentation process. The dehydrated material was milled (1 mm mesh, Wiley mill) and stored in identified polyethylene bags. Later, residual DM (%) was determined at 100 °C and, sequentially, its ash (A) concentration on a dry basis at 600 °C (AOAC 1999).

DM consumed by the SSF process was expressed in percentage and calculated in the d1, d2, d4, d8 and d16 of fermentation.

Concentration of lactic acid of samples was determined by colorimetry according to the procedure of Taylor (1996).

SCFA concentration was analyzed in the samples from d0, d1, d2 and d4. Samples taken during the process were diluted in distilled water (9:1) and centrifuged to determine pH, SCFA (acetic, propionic and butyric acid), NH₃ and lactic acid. These last were determined by spectrophotometry. Determinations of SCFA were made on a SRI 8610 chromatographer, with a 15 m long Alltech phase EC™ 1000 column, 0.53 mm of internal diameter and a layer thickness of 1.20 µm. Samples were injected with a 10 µl Hamilton syringe. Each sample was injected (2.5 µl) three times. Nitrogen was used as a carrier gas and an ion detector with flame fed by a mixture of hydrogen and air. The temperature program was: start at 100 °C, increase from 100 to 130 °C in two min. ($\Delta 15\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), and from 130 to 140 °C in 1 min. ($\Delta 10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). To determine the temperature, it was increased from 140 to 200 °C in 2.4 min ($\Delta 25\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). The column was heated to 200 °C for at least 30 min. before beginning the analysis of the samples every day. Concentrations of SCFA were calculated according to the area formed by peaks in the chromatogram and the quantities injected, based on the chromatogram obtained with the injected standard. The results were expressed on wet and dry basis.

proceso a las 08:00 h en los d0, d1, d2, d4, d8 y d16 de fermentación. Se tomaron seis recipientes (repeticiones) de cada tratamiento, se pesaron y su contenido se utilizó para realizar los análisis correspondientes. El peso de cada recipiente se registró, antes y después de agregar el sustrato a fermentar. El peso por diferencia se calculó por el peso del sustrato dentro de cada recipiente.

Se evaluaron las variables MS, cenizas, pérdida de MS debido al proceso de FES (PMS), concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), carbohidratos estructurales (FDN, FDA), lignina (L) y digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS).

Durante el proceso de fermentación, se tomaron de cada tratamiento seis recipientes con sustrato (muestras) en los d0, d1, d2, d4, d8 y d16. El sustrato se congeló a -4 °C. Posteriormente, se deshidrató a 60 °C, por al menos 48 h en una estufa de aire forzado. El peso se registró antes y después para calcular el porcentaje de MS y la pérdida de humedad (en porcentaje) para posteriormente calcular la pérdida de biomasa debido al proceso de fermentación. El material deshidratado se molió (malla de 1 mm, molino Wiley) y se conservó en bolsas de polietileno identificadas. Posteriormente, se determinó la MS (%) residual a 100 °C y, de manera secuencial, su concentración de cenizas (Cen) en base seca a temperatura de 600°C (AOAC 1999).

La MS consumida por el proceso de FES se expresó en porcentaje y se calculó en el d1, d2, d4, d8 y d16 de fermentación.

La concentración de AcL de las muestras se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996).

La concentración de AGCC se analizó en las muestras del d0, d1, d2 y d4. Las muestras que se tomaron durante el proceso se diluyeron en agua destilada (9:1) y se centrifugaron para determinar pH, AGCC (ácido acético, propiónico y butírico), NH₃ y AcL. La determinación de estos últimos se hizo por espectrofotometría. Las de AGCC se hicieron en un cromatógrafo SRI 8610, con columna Alltech phase EC™ 1000 de 15 m de largo, 0.53 mm de diámetro interno y espesor de capa de 1.20 µm. Las muestras se inyectaron con una jeringa Hamilton de 10 µl. Cada muestra se inyectó (2.5 µl) tres veces. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador y un detector de iones con flama alimentada por una mezcla de hidrógeno y aire. El programa de temperatura fue: inicio a 100°C, incremento desde 100 hasta 130°C en dos min. ($\Delta 15\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), y de 130 a 140°C en 1 min. ($\Delta 10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Para determinar la temperatura, se incrementó desde 140 hasta 200 °C en 2.4 min ($\Delta 25\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). La columna se calentó a 200 °C por al menos 30 min. antes de comenzar el análisis de las muestras diariamente. Las concentraciones de AGCC se calcularon en función del área formada por los picos en el cromatograma y las cantidades inyectadas, tomando como base el cromatograma obtenido con el estándar inyectado. Los resultados se expresaron en base húmeda y en base seca.

The concentration of neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and L, in percentage of DM, was only determined in the samples of 0d and 8d of the SSF process. The determinations were performed with ~ 0.45 g of sample, with fiber analysis bags (ANKOM™), sequentially, with an ANKOM200 fiber analysis equipment and commercially available solutions for the procedures (ANKOM). L was determined by introducing the bags with sample for 3 h in H₂SO₄ at 72 %, shaking every 30 min. (ANKOM, 2005).

In vitro digestibility of DM (IVDDM) was only determined in the ground samples of dehydrated substrate of d0 and d8 of the SSF process. For its determination, the *in vitro* true digestibility procedure of ANKOM (2005) was used, in which the samples were placed in fiber analysis bags, sealed and later incubated at 39 °C for 48 h in a solution composed by buffering solution plus ruminal liquor as inoculant. The incubation solution was prepared by purging the surface of the liquid with CO₂. The process was performed in a DAISYII incubator equipment.

Statistical analysis of all variables was performed by using a mixed model, in which the fixed effects were substrate type (treatment), fermentation day and their interaction. As a random effect, repetitions nested in each treatment were used. The results of analysis of variance, means, standard error and comparisons among means were obtained with the MIXED procedure of SAS (2009). The used model was the following:

$$Y_{iju} = \mu + t_i + dj + (td)_{ij} + \delta_{iu} + \varepsilon$$

where:

Y_{iju}.- is the response variable

μ.- is the general mean

t_i.- is the effect of the i-th treatment (substrate type)

d_j.- is the effect of the j-th fermentation day

(td)_{ij}.- is the effect of the interaction between the i-th treatment (substrate type) and the j-th fermentation day

δ_{iu}.- is the random effect of the u-th repetition nested within the i-th treatment

ε.- is the residual error

Results and Discussion

Dry matter (DM) and ashes (A). DM and A showed treatment effect (P < 0.05) and day of SSF (P < 0.05). T1 had, as average, a higher percentage of DM (P < 0.05) (27.34 ± 1.28 %) than the T2 substrate (23.30 ± 1.28 %). The average DM amount in the substrates was increased (P < 0.05) from d8 (17.07 ± 2.16 %) to d16 (68.42 ± 2.16%). From d0 up to d8 of SSF, DM concentration was relatively low at the beginning of the SSF in both treatments and maintained a mean moisture content higher than 70 % at the end of this process (figure 1).

The process of obtaining “Manzarina” is similar to that of Saccharina (Díaz 2006). Regarding this last,

La concentración de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FAD) y L en porcentaje de MS se determinó, únicamente, en las muestras de los d0 y d8 del proceso de FES. Las determinaciones se realizaron con ~0.45 g de muestra, con bolsas para análisis de fibra (ANKOM™) de manera secuencial, con un aparato para análisis de fibra ANKOM200 y soluciones comercialmente disponibles para los procedimientos (ANKOM). La L se determinó introduciendo las bolsas con muestra por 3 h en H₂SO₄ al 72 %, agitando cada 30 min. (ANKOM, 2005).

La digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) se determinó, únicamente, en las muestras molidas de sustrato deshidratado de los d0 y d8 del proceso de FES. Para su determinación, se utilizó el procedimiento de digestibilidad verdadera *in vitro* de ANKOM (2005), en el que las muestras se introducen en bolsas para análisis de fibra, se sellan y posteriormente se incuban a 39 °C durante 48 h en una solución compuesta por solución amortiguadora más líquido ruminal como inoculante. La solución para incubación se preparó purgando la superficie del líquido con CO₂. El proceso se realizó en un aparato incubador DAISYII.

El análisis estadístico de todas las variables se realizó mediante un modelo mixto, en el que los efectos fijos fueron el tipo de sustrato (tratamiento), el día de fermentación y su interacción. Como efecto aleatorio, se utilizaron las repeticiones anidadas en cada tratamiento. Los resultados del análisis de varianza, medias, error estándar y comparaciones entre medias, se obtuvieron con el procedimiento MIXED de SAS (2009). El modelo utilizado fue:

$$Y_{iju} = \mu + t_i + dj + (td)_{ij} + \delta_{iu} + \varepsilon \text{ donde:}$$

Y_{iju}.- es la variable de respuesta

μ.- es la media general

t_i.- es el efecto del i-ésimo tratamiento (tipo de sustrato)

d_j.- es el efecto del j-ésimo día de fermentación

(td)_{ij}.- es el efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento (tipo de sustrato) y el j-ésimo día de fermentación

δ_{iu}.- es el efecto aleatorio de la u-ésima repetición anidada dentro del i-ésimo tratamiento

ε.- es el error residual

Resultados y Discusión

Materia Seca (MS) y Cenizas (Cen). La MS y Cen mostraron efecto de tratamiento (P < 0.05) y de día de FES (P < 0.05). El T1 tuvo como promedio mayor porcentaje de MS (P < 0.05) (27.34 ± 1.28 %) que el sustrato de T2 (23.30 ± 1.28 %). La cantidad de MS promedio en los sustratos se incrementó (P < 0.05) del d8 (17.07 ± 2.16 %) al d16 (68.42 ± 2.16 %). Desde el d0 hasta el d8 de FES, la concentración de MS fue relativamente baja al inicio de la FES en ambos tratamientos y mantuvo un contenido promedio de humedad mayor a 70 % al final de dicho proceso (figura 1).

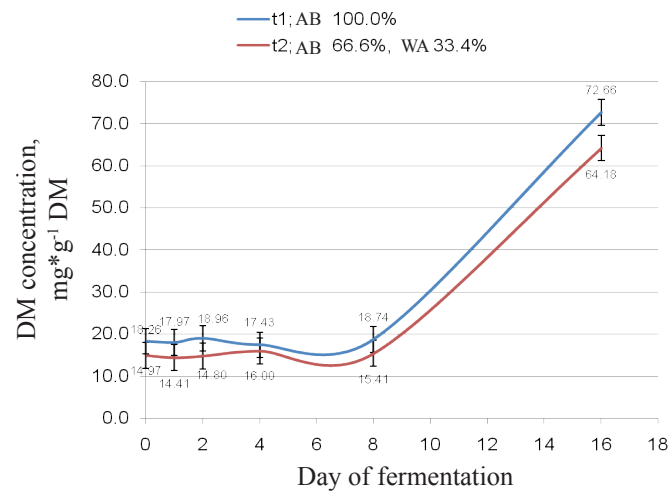


Figure 1. DM concentration of substrates during SSF

Vivas and Carvajal (2004) stated that, in the process of obtaining Saccharina, it is necessary to dry the product for storing it.

In this experiment, the fermented substrates were not dried during the process. Fermentation temperature (30 ± 1 °C) was maintained during the 16 d to know if the percentage of humidity decreased faster in any treatment and thus to obtain “Manzarina” in less time. In addition to knowing how necessary it is to dehydrate the substrate to stop the fermentation, it was observed that substrates retain their humidity for up to eight days, which maintains the humidity conditions to preserve fermentation. However, the maximum fermentative activity was carried out during the first 24 h, which is evidenced by some of the variables evaluated in this study.

The ideal moment to stop the SSF process in “Manzarina” production depends on the TP concentration, due to the increase of yeasts that is achieved in the first 72 h of the process, with countings higher than 10^8 cell*mL (Rodríguez *et al.* 2010), as well as to fungi growth (Dhillon *et al.*, 2011). This is one of the best indicators of microbial protein synthesis (Rodríguez *et al.* 2001a).

T2 had a mean ash concentration higher ($P < 0.05$) than T1 at the beginning of fermentation. The mean concentration of A during the process in T1 was $4.49 \pm 0.07\%$ and in T2, $5.23 \pm 0.07\%$ (figure 2). The mean A concentration of the two substrates was increased ($P < 0.05$) from d0 ($3.65 \pm 0.11\%$) to d1 ($4.06 \pm 0.11\%$) and from d4 ($4.48 \pm 0.11\%$) to d16 ($6.82 \pm 0.11\%$). From d1 to d4 of SSF, the daily increase of A concentration was slower than in the rest of the process.

DM loss during SSF increases the relative concentration of some components, such as fiber, crude protein and A concentration (Zhong-Tao *et al.* 2009). This effect was observed in A concentration in the two treatments of this study. Although the mean concentration of A in T2 was slightly higher than that in

El proceso de obtención de la manzarina es similar al de la saccharina (Díaz 2006). Con respecto a este último, Vivas y Carvajal (2004) mencionan que en el proceso de obtención de saccharina se requiere secar el producto para poder almacenarlo.

En este experimento, los sustratos fermentados no se secaron durante el proceso. La temperatura de fermentación (30 ± 1 °C) se mantuvo durante los 16 d para conocer si el porcentaje de humedad disminuía más rápido en algún tratamiento y obtener así manzarina en menor tiempo. Además de conocer qué tan necesario es deshidratar el sustrato para detener la fermentación, se observó que los sustratos conservan su humedad hasta ocho días, lo que mantiene las condiciones de humedad para conservar la fermentación. No obstante, la máxima actividad fermentativa se llevó a cabo durante las primeras 24 h, lo que se manifiesta por algunas de las variables evaluadas en este trabajo.

El momento ideal para detener el proceso de FES en la producción de manzarina depende de la concentración de PV, debido al incremento de levaduras que se logra en las primeras 72 h del proceso, con conteos superiores de 10^8 cel*mL (Rodríguez *et al.* 2010), así como al crecimiento de hongos (Dhillon *et al.* 2011). Este es uno de los mejores indicadores de la síntesis de proteína microbiana (Rodríguez *et al.* 2001a).

El T2 tuvo como promedio una concentración de Cen mayor ($P < 0.05$) que el T1 al iniciar la fermentación. La concentración promedio de Cen durante el proceso en T1 fue de $4.49 \pm 0.07\%$ y en T2, de $5.23 \pm 0.07\%$ (figura 2). La concentración promedio de Cen de los dos sustratos se incrementó ($P < 0.05$) del d0 ($3.65 \pm 0.11\%$) al d1 ($4.06 \pm 0.11\%$) y del d4 ($4.48 \pm 0.11\%$) al d16 ($6.82 \pm 0.11\%$). Del d1 al d4 de la FES, el incremento diario de la concentración de Cen fue más lento que en el resto del proceso.

La pérdida de MS durante la FES incrementa la concentración relativa de algunos componentes, como la fibra, proteína cruda y la concentración de Cen (Zhong-Tao *et al.* 2009). Ese efecto se observó en la concentración de Cen en los dos tratamientos de este trabajo. A pesar

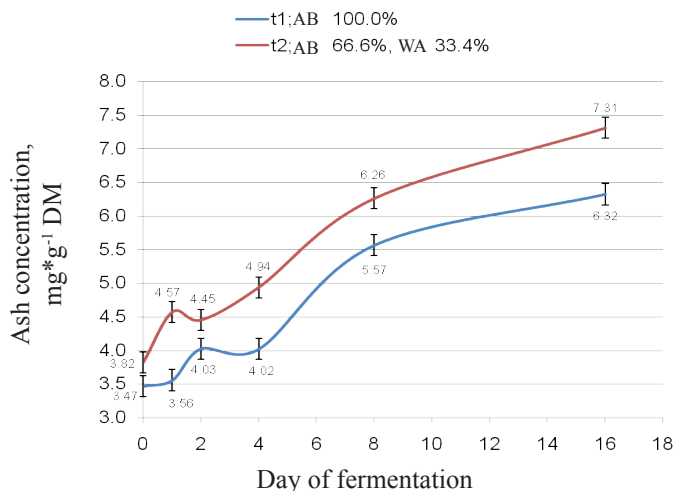


Figure 2. Ash concentration under dry basis of substrates during SSF

T1, the performance of the increase in its concentration was similar ($P > 0.05$).

According to NRC (2001) tables, the AB contains up to 35.9 % of DM and 2.6% of A (DB). In this study, the AB used contained 18.26 % (d0) of DM. Values reported by USDA (2011) are 14.4 % of DM and 1.3 % of A (DB). According to FAO/LATINFOODS (2002), apple may reach 14.9 % of DM and 2.0 % of A (DB). This indicates that, in general, the AB contains more DM and A than apple, and explains the differences in the mean concentrations of DM and A in DB during the SSF process of substrates. The concentration of A in the substrates is higher than those reported in the literature, and this is due to the addition of minerals for its enrichment and subsequent SSF process.

Dry matter loss during SSF (DML). This variable showed an interaction effect ($P < 0.05$) of treatment per day. In T1, there was higher DML ($P < 0.05$) than in T2. In d8 of SSF, the amount of DM available in T1 (AB 100.0 %) was 58.1 ± 1.3 % from the initial DM amount (loss of 41.9%) and in T2, the amount of DM during d8 was 63.1 ± 1.3 % of that in d0 (loss of 36.9% DM). This indicates that T2, having a higher amount of fast fermenting sugars, was used during the first twenty-four hours and then reversed the performance with higher DML in T1 vs. T2. This may have occurred due to the fact that from that point started the use of the rest of the organic matter available in the substrates by the presence of enzymes produced by fungi in the AB, as reported by Ajila *et al.* (2012).

As mentioned before, there is a loss of DM from substrates during fermentation. This loss is due to the use of structural and non-structural carbohydrates, as well as the use of other compounds as an energy source (Zhong-Tao *et al.*, 2009). This is illustrated in figure 3, where a decrease in lactic acid concentration is observed due to its use as an energy source for the growth of microorganisms during the first hours of the SSF. These microorganisms produce water, carbon dioxide and

de que la concentración promedio de Cen en T2 fue ligeramente mayor que la de T1, el comportamiento del incremento en su concentración fue similar ($P > 0.05$).

Según las tablas del NRC (2001), el BM tiene hasta 35.9 % de MS y 2.6 % de Cen (BS). En este trabajo, el BM utilizado tuvo 18.26 % (d0) de MS. Los valores informados por USDA (2011) son 14.4 % de MS y 1.3 % de Cen (BS). De acuerdo con la FAO/LATINFOODS (2002), la manzana puede llegar a tener 14.9 % de MS y 2.0 % de Cen (BS). Lo anterior indica que, en general, el BM tiene más MS y Cen que la manzana, y explica las diferencias en los promedios de concentración de MS y Cen en BS durante el proceso de FES de los sustratos. La mayor concentración de Cen de los sustratos a las reportadas en la literatura, se debe a la adición de minerales para su enriquecimiento y el posterior proceso de FES.

Pérdida de materia seca durante la FES (PMS). Esta variable mostró un efecto ($P < 0.05$) de interacción de tratamiento por día. En T1 hubo mayor PMS ($P < 0.05$) que en T2. En el d8 de FES, la cantidad de MS disponible en T1 (BM 100.0 %) fue 58.1 ± 1.3 % de la cantidad inicial de MS (pérdida de 41.9 %); en T2 la cantidad de MS en el d8 fue 63.1 ± 1.3 % de la que había en el d0 (pérdida de 36.9 % de MS). Esto indica que el T2, teniendo mayor cantidad de azúcares de rápida fermentación, fue usado durante las primeras veinticuatro horas para luego invertirse el comportamiento con mayor PMS en el T1 vs. el T2. Esto se pudo deber, tal vez, a que a partir de ahí se empezó a usar el resto de la materia orgánica disponible en los sustratos por la presencia de enzimas producidas por hongos en el BM, tal y como lo informan Ajila *et al.* (2012).

Como se mencionó, hay pérdida de MS de los sustratos durante la fermentación. Esta pérdida se debe al uso de carbohidratos estructurales y no estructurales, así como a la utilización de otros compuestos como fuente de energía (Zhong-Tao *et al.* 2009). Lo anterior se ilustra en la figura 3, donde se observa disminución en la concentración de ácido láctico, debido a su

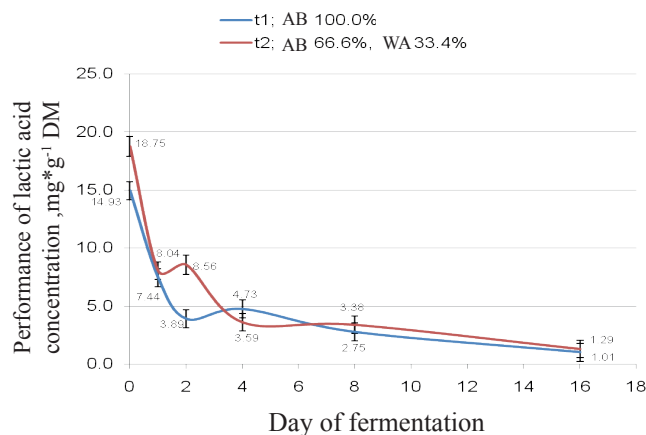


Figure 3. Performance of lactic acid concentration under DB during SSF

soluble or volatile compounds (Rodríguez *et al.* 2001b) during their metabolism.

The production of liquid compounds during the SSF caused a high moisture in the substrate, so DM percentage was steady during the first 8 d of SSF in this experiment. In addition, the liquid compounds came from the DM of substrates that caused their reduction.

Joshi and Sandhu (1996), in SSF of AB inoculated with yeasts, found DM losses from 35 to 46 % during a 96 h fermentation. Dhillon *et al.* (2012) reported rapid loss of DM with the use of a specific strain of *Aspergillus niger* for the production of cellulases and hemicellulases through the SSF of AB.

Concentration of lactic acid. In both substrates, the concentration of lactic acid under DB decreased ($P < 0.05$), due to the fermentation conditions. However, the highest ($P < 0.05$) concentration of lactic acid under DB of T2 (figure 3), regarding T1, indicated that from d1 to d2, there was a production of lactic acid in the substrate of T2, due to the presence of a higher availability of rapidly fermentable sugars, which started a rapid decrease in the concentration of this acid from that moment, due to the process of the SSF.

The lactic acid is a product from carbohydrate catabolism (Rodríguez *et al.* 2001a). In this study, the presence of this acid in a high amount in the d0 of SSF in the substrates of T1 and T2 is a result of the availability of fermentable carbohydrates in this by-product. They cause the formation of lactic acid from the moment in which AB is produced until it is used (Anrique and Viveros 2002), which is a common condition that appear due to the activity of lactic acid bacteria. In this study, the fast decrease of lactic acid concentration indicates that it could have been used as an energy source by the microorganisms present in the first hours of SSF, mainly yeasts.

Short chain fatty acids (SCFA). C2 showed interaction effect of treatment per day of SSF ($P < 0.05$). During the SSF, the concentration of C2 in T1 was higher (P

empleo como fuente de energía para el crecimiento de microorganismos en las primeras horas de la FES. Estos microorganismos durante su metabolismo producen agua, bióxido de carbono y compuestos solubles o volátiles (Rodríguez *et al.* 2001b).

La producción de compuestos líquidos durante la FES ocasionó que la humedad se haya conservado alta en el sustrato, por lo que el porcentaje de MS se mantuvo durante los primeros 8 d de la FES en este experimento. Además, los compuestos líquidos provinieron de la MS de los sustratos que causaron su reducción.

Joshi y Sandhu (1996) en FES de BM inoculado con levaduras encontraron pérdidas de MS de 35 a 46 % durante una fermentación de 96 h. Dhillon *et al.* (2012) informaron pérdida rápida de MS con la utilización de una cepa específica de *Aspergillus niger* para la producción de celulases y hemicelulasas mediante la FES de BM.

Concentración de ácido láctico. En ambos sustratos, la concentración del AcL en BS disminuyó ($P < 0.05$), debido a las condiciones de fermentación. Sin embargo, la mayor ($P < 0.05$) concentración de AcL en BS de T2 (figura 3) con respecto a la de T1, indicó que del d1 al d2, hubo producción de AcL en el sustrato de T2, debido a la presencia de mayor disponibilidad de azúcares rápidamente fermentables, que inició un rápido descenso en la concentración de este ácido a partir de ese momento, debido al proceso de la FES.

El AcL es un producto del catabolismo de los carbohidratos (Rodríguez *et al.* 2001a). En este trabajo, la presencia de este ácido en una cantidad alta en el d0 de FES en los sustratos de T1 y T2 es resultado de la disponibilidad de carbohidratos fermentables en este subproducto. Estos causan la formación de AcL desde el momento en el que el BM se produce hasta que se utiliza (Anrique y Viveros 2002), lo que es una condición común que se origina por la actividad de bacterias ácido lácticas. En este trabajo, el rápido descenso en la concentración de AcL indica que pudo haber sido utilizado como fuente de energía por los microorganismos presentes en las primeras horas de la FES, principalmente levaduras.

Ácidos grasos de cadena corta (AGCC). El C2 mostró efecto de interacción de tratamiento por día de FES

<0.05) than that of T2 in d0 (29.82 ± 1.43 vs. $8.42 \pm 1.56 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$) and in d4 (13.40 ± 1.43 vs. $1.64 \pm 1.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$). From d0 to d1, there was a decrease ($P < 0.05$) in the concentration of C2 in the substrate of T1. The concentration of C2 in the substrate of T1 was low and similar ($P > 0.05$) to the substrate of T2 in d1 and d2 of SSF. Later, from d2 to d4, the concentration of C2 in the substrate of T1 increased ($P < 0.05$). In T2, C2 concentration had a gradual decrease ($P < 0.05$), from d0 to d4 of SSF (figure 4).

The concentration of propionic acid (C3) was

($P < 0.05$). Durante la FES, la concentración de C2 en el T1 fue mayor ($P < 0.05$) que la del T2 en el d0 (29.82 ± 1.43 vs. $8.42 \pm 1.56 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$) y en el d4 (13.40 ± 1.43 vs. $1.64 \pm 1.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$). Del d0 al d1, hubo disminución ($P < 0.05$) en la concentración de C2 en el sustrato de T1. La concentración de C2 en el sustrato de T1 fue baja y similar ($P > 0.05$) a la del sustrato del T2 en el d1 y el d2 de la FES. Posterior a esto, del d2 al d4, la concentración de C2 en el sustrato del T1 se incrementó ($P < 0.05$). En el T2, la concentración de C2 decreció ($P < 0.05$) paulatinamente, desde el d0 hasta el d4 de la FES (figura 4).

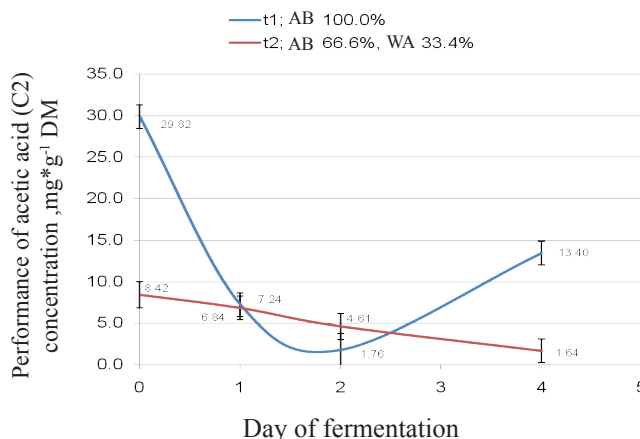


Figure 4. Performance of acetic acid (C2) concentration under DB during SSF

different among substrates ($P < 0.05$) (figure 5). In d0 ($0.64 \pm 0.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$), the mean concentration was low. This concentration increased from d0 to d1 ($1.45 \pm 0.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$) and then decreased ($P < 0.05$) from d1 to d4 ($0.23 \pm 0.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$). The variability of C₃ was high. It is possible that, to analyze this variable under these conditions, a higher number of samples is needed to detect differences with better precision.

In the butyric acid concentration (C4), there was only effect ($P < 0.05$) of the day of SSF (figure 6). C4 concentration was relatively low at d0 ($0.52 \pm 0.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$), reaching $0.91 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$ at d1, and later decreased ($P < 0.05$) from d1 to d2 ($0.40 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$

La concentración de ácido propiónico (C₃), fue diferente entre sustratos ($P < 0.05$) (figura 5). En el d0 ($0.64 \pm 0.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$), la concentración promedio fue baja; esta concentración se incrementó ($P < 0.05$) del d0 al d1 ($1.45 \pm 0.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$) y posteriormente disminuyó ($P < 0.05$), del d1 al d4 ($0.23 \pm 0.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$). La variabilidad del C3 fue alta; es posible que para analizar esta variable en estas condiciones, se necesite un mayor número de muestras para detectar diferencias con mayor precisión.

En la concentración de ácido butírico (C4), únicamente se observó efecto ($P < 0.05$) del día de FES (figura 6). La concentración de C4 fue relativamente baja en el d0 ($0.52 \pm 0.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$), llegando a $0.91 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ en el d1 y posteriormente disminuyó ($P < 0.05$) del

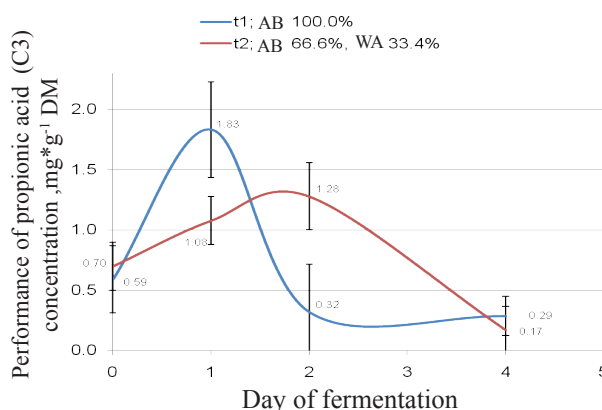


Figure 5. Performance of propionic acid (C3) concentration under DB during SSF

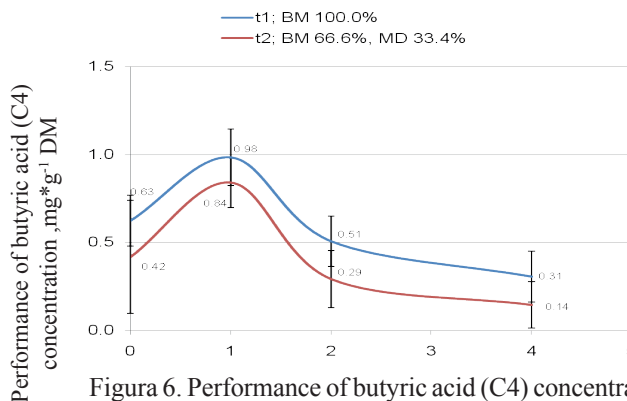


Figura 6. Performance of butyric acid (C4) concentration under DB during SSF

DM). The concentration of C4 in d4 of SSF was $0.22 \pm 0.10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$.

SCFAs are waste products from some microorganisms under anaerobic conditions. In the SSF of mixtures of sugar cane and sweet potato (*Ipomoea batatas*), there is fluctuating production of C2 during the process. There may also be presence of C3 in very low concentrations. The latter disappears after 48 h of SSF (Rodríguez *et al.* 2001a). Something similar happened in this study because there was a presence of C2 and C3. The concentration of C2 was fluctuating in T1 and C3 concentration was low and decreased after 24 h of SSF in T1 and T2. The presence of these acids indicates that, in certain moments of the SSF and in certain areas, there were conditions of anaerobiosis, also finding small amounts of C4.

The decrease of C2 and the increases of C3 and C4 from d0 to d1 of the SSF of the substrates of T1 and T2, coincide with the decrease of lactic acid. Van Soest *et al.* (1991) describes that, in certain chemical reactions that occur in the metabolic processes, C3 and C4 can be produced from the lactic acid. The process evaluated in this study occurred under aerobic conditions, so this would be the reason for the detected low amounts of C3 and C4. The increase of C2, C3 and C4 indicates the possible presence of anaerobic bacteria. In the development of non-lactic fermentations, if there are available amounts of C2 and lactic acid, C4, CO₂ and H₂ can be produced. There could be also formation of C3 from lactate (Van Soest 1991 *et al.*). Anrique and Viveros (2002) mentioned that lactic acid may have a secondary fermentation and produce organic acids in the silage of AB. According to van Soest (1991 *et al.*) and considering that in the SSF of some substrates, there may be a great variety of species of microorganisms (Valiño *et al.* 2002), this explains the decrease of lactic acid and C2 in substrates due to the inclusion of oxygen during the metabolism of anaerobic microorganisms, which can be confirmed in this study (Gassara *et al.* 2013).

The decrease of C3 and C4 after 24h of SSF, may have occurred because both were used as energy sources (Van Soest *et al.* 1991). Likewise, the increase

d1 al d2 ($0.40 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$), la concentración de C4 en el d4 de FES fue de $0.22 \pm 0.10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$.

Los AGCC son producto de desecho de algunos microorganismos en condiciones anaerobias. En la FES de mezclas de caña de azúcar y boniato (*Ipomoea batatas*), hay producción fluctuante de C2 durante el proceso. También puede haber presencia de C3 en concentraciones muy bajas, este último desaparece después de 48 h de FES (Rodríguez *et al.* 2001a). En este trabajo, sucedió algo similar, hubo presencia de C2 y C3. La concentración de C2 fue fluctuante en T1 y la concentración de C3 fue baja y disminuyó a partir de las 24 h de FES en T1 y T2. La presencia de estos ácidos indica que en ciertos momentos de la FES y en ciertas áreas, hubo condiciones de anaerobiosis, encontrando además, pequeñas cantidades de C4.

La disminución de C2 y los incrementos de C3 y C4 del d0 al d1 de la FES de los sustratos de T1 y de T2, coinciden con la disminución de AcL. Van Soest *et al.* (1991) describe que, en ciertas reacciones químicas que se presentan en los procesos metabólicos, se pueden producir C3 y C4 a partir del AcL. Debido a que el proceso evaluado en este trabajo es en condiciones aerobias, esto explicaría las bajas cantidades detectadas de C3 y C4. El incremento de C2, C3 y C4 indica la posible presencia de bacterias anaerobias. En el desarrollo de fermentaciones no lácticas, si hubiera cantidades disponibles de AcL y C2, se pueden producir C4, CO₂ y H₂. Así también, puede haber formación de C3 a partir del lactato (van Soest 1991 *et al.*). Anrique y Viveros (2002) mencionan que el AcL puede tener una fermentación secundaria y producir ácidos orgánicos en el ensilaje de BM. De acuerdo con van Soest (1991 *et al.*) y considerando que en la FES de algunos sustratos puede haber gran diversidad de especies de microorganismos (Valiño *et al.* 2002), se explica la disminución del AcL y el C2 en los sustratos, debido a la incorporación de oxígeno durante el metabolismo que tiene lugar por parte de microorganismos aerobios, lo que se puede constatar en este trabajo (Gassara *et al.* 2013).

La disminución de C3 y C4, después de 24 h de FES, se pudo deber a que ambos se utilizaron como fuentes de energía (Van Soest *et al.* 1991). Asimismo,

of C2 during T1 fermentation (from d2 to d4), may be explained as a result of metabolism of amino acids by clostridia or that of hexoses, pentoses and/or organic acids by the action of heterolactic, homolactic bacteria, enterobacterias and/or yeasts. The change of C2 in the SSF of T1 substrate is attributed to an increase in the amount of cellulolytic microorganisms that produce succinate, acetate and format (van Soest *et al.* 1991), because, in this experiment, T1 also showed decrease of the concentration of structural carbohydrates and lignin. In this study and under these conditions, the previously mentioned processes explain the increase of C2. However, in order to have a solid knowledge of those microorganisms responsible for these changes, it is necessary to perform a detailed microbiological analysis of the dynamics of the main populations of bacteria, fungi and yeasts, which are part of the SSF of AB during the process of obtaining "Manzarina".

Structural carbohydrates. NDF, ADF and L showed interaction effect of treatment per day of SSF ($P < 0.05$). From d0 to d8, concentrations of NDF, ADF and L decreased ($P < 0.05$) in T1 (AB), while in the substrate of AB+WA (T2), it was increased ($P < 0.05$) (table 1). This indicates that during the fermentation of AB, a great amount of structural carbohydrates was degraded, while in the SSF of the combination of AB with WA, structural carbohydrates were not likely degraded and had a relative increase, like with ashes.

Rodríguez *et al.* (2001b) reported that in the SSF

el incremento de C2 durante la fermentación del T1 (del d2 al d4), se puede explicar como resultado del metabolismo de aminoácidos por clostridios o el de hexosas, pentosas y/o ácidos orgánicos por acción de bacterias heterolácticas, homolácticas, enterobacterias y/o levaduras. El cambio del C2 en la FES del sustrato de T1 se atribuye a un incremento en la cantidad de microorganismos celulolíticos que producen succinato, acetato y formato (van Soest *et al.* 1991), ya que en este experimento T1 también mostró disminución de la concentración de carbohidratos estructurales y de lignina. En este trabajo y con estas condiciones, los procesos mencionados explican el incremento de C2. Sin embargo, para conocer de manera concreta las especies de microorganismos responsables de estos cambios, es necesario un análisis microbiológico detallado de la dinámica de las principales poblaciones de bacterias, hongos y levaduras, que actúan en la FES del BM, durante el proceso de obtención de manzarina.

Carbohidratos estructurales. FDN, FDA y L presentaron efecto de interacción de tratamiento por día de FES ($P < 0.05$). Del d0 al d8 las concentraciones de FDN, FDA y L disminuyeron ($P < 0.05$) en T1 (BM), en tanto que en el sustrato de BM + MD (T2) se incrementó ($P < 0.05$) (tabla 1). Esto indica que durante la fermentación del BM se degradó gran cantidad de carbohidratos estructurales, mientras que en la FES de la combinación de BM más MD, los carbohidratos estructurales no se degradaron de igual manera y se incrementaron de manera relativa, como

Table 1. Performance of NDF, ADF and L in the two substrate types during the SSF

Variable ¹	d0		d8	
	T1 ²	T2 ²	T1 ²	T2 ²
NDF	55.81±0.79 ^a	45.07±0.79 ^b	28.59±0.79 ^a	61.45±0.79 ^b
ADF	40.52±0.52 ^a	31.97±0.52 ^b	24.67±0.52 ^a	48.82±0.52 ^b
L	17.29±0.83 ^a	9.83±0.83 ^b	09.62±0.83 ^a	25.87±0.83 ^b

¹Percentage of DM

²T1: AB 100.0%; T2: AB 66.6%, WA 33.4%

^{a, b}Different letters as superscripts indicate difference ($P < 0.05$) among treatments (substates) in d0 and d8 of SSF

of mixtures of sugar cane with sweet potato, fungi could be developed after 96 h of the beginning of the process. Valiño *et al.* (2002) stated that in the SSF of sugar cane bagasse, there was a decrease of NDF and a delignification due to the development of cellulolytic fungi from *Aspergillus* and *Trichoderma* genera. This effect also increases the nutritional value of the fermented product. Dhillon *et al.* (2012) reported a decrease of constituents of the cell wall in apple bagasse in SSF, with the use of *Aspergillus niger*.

The relationship between the development of fungi and the decrease of cell wall components and L has been demonstrated in substrates with high content of lignified structural carbohydrates. Gassara *et al.* (2013) reported the effect of air methodology and agitation in

sucedió con las Cen.

Rodríguez *et al.* (2001b) informaron que en la FES de mezclas de caña de azúcar con boniato se pueden haber desarrollado hongos a partir de las 96 h de iniciado el proceso. Valiño *et al.* (2002) refirieron que en la FES de bagazo de caña de azúcar, disminuye la FDN y hay delignificación, debido al desarrollo de hongos celulolíticos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*. Este efecto también incrementa el valor nutritivo del producto fermentado. Dhillon *et al.* (2012) informaron disminución de constituyentes de la pared celular en bagazo de manzana en FES, con la utilización de *Aspergillus niger*.

La relación entre el desarrollo de hongos y la disminución de componentes de la pared celular y de L ha sido demostrada en sustratos con alto contenido

SSF of apple bagasse, with the use of *Phanerochaete chrysosporium* fungus, for obtaining linolytic enzymes and extraction of phenolic extracts, with the subsequent use of cell wall and lignin.

In this study, perhaps there was a development of fungi after 96h of SSF in the substrate of T1, which was evidenced due to the decrease of NDF, ADF and L. This is similar to the findings of Rodríguez *et al.* (2001b). This fact indicates that the development of certain type of cellulolytic fungi has been favored by the presence of oxygen and NH₃. Ibarra *et al.* (2002) reported that cellulolytic fungi also provide TP, so the type and amount of fungi within SSF of AB for obtaining “Manzarina” should be evaluated, as well as their enzyme activity because, at a certain point, these species may provide cellulolytic and lignolytic enzymes. If these enzymes are accumulated in the fermented substrate, together with other fermentation products, as happens with saccharina (Vivas and Carvajal 2004), this could generate important beneficial effects for animal feeding, with the inclusion of “Manzarina” as part of the diet.

In vitro digestibility of dry matter. IVDDM showed differences among substrates and day of SSF ($P < 0.05$), but there was no interaction among the main factors (table 2). T1 had lower ($P < 0.05$) digestibility than T2. Substrates in d8, after the SSF process, had lower ($P < 0.05$) digestibility than before the fermentation (d0).

In d0, concentrations of NDF, ADF and L of T1 were

de carbohidratos estructurales lignificados. Gassara *et al.* (2013) informaron el efecto de la metodología de aireación y agitación en FES de bagazo de manzana, con la utilización del hongo *Phanerochaete chrysosporium* para la obtención de enzimas linolíticas y extracción de extractos fenólicos, con la consecuente utilización de pared celular y lignina.

En este trabajo, quizás se hayan desarrollado hongos después de 96 h de FES en el sustrato de T1, lo que se ha indicado por la disminución de FDN, FDAy L.. Esto ha sido similar a lo encontrado por Rodríguez *et al.* (2001b). Lo anterior indica que el desarrollo de cierto tipo de hongos celulolíticos se ha favorecido por la presencia de oxígeno y NH₃. Ibarra *et al.* (2002) informaron que los hongos celulolíticos también aportan PV, por lo que se debe evaluar el tipo y la cantidad de hongos presentes en la FES de BM para la obtención de manzarina, como también su actividad enzimática, pues en un momento dado estas especies pueden aportar enzimas celulolíticas y ligninolíticas. Si estas enzimas se acumulan en el sustrato fermentado, unida a otros productos de fermentación, como sucede con la saccharina (Vivas y Carvajal 2004), se podrían generar efectos benéficos importantes en la alimentación animal, al incluir manzarina como parte de la dieta.

Digestibilidad in vitro de la materia seca. La DIVMS presentó diferencias entre sustratos y día de FES ($P < 0.05$), pero no se encontró interacción entre estos factores principales (tabla 2). El T1 tuvo menor ($P < 0.05$) digestibilidad que T2. Los sustratos en el d8, después del proceso de FES, tuvieron menor ($P < 0.05$) digestibilidad

Table 2. *In vitro* digestibility of DM in the two types of substrate during the SSF

Treatment/d of SSF	d0	d8	Mean
T1 (AB 100.0%)	87.95±0.40	81.21±0.40	84.58±0.29 ^a
T2 (AB 66.6%, WA 33.4%)	90.37±0.40	84.82±0.40	87.59±0.29 ^b
Mean	89.16±0.28 ^c	83.02±0.28 ^d	---

^{a, b}Different letters as superscripts indicate difference ($P < 0.05$) among treatments (T1 vs. T2)

^{c, d}Different letters as superscripts indicate difference ($P < 0.05$) among days (d0 vs. d8 of SSF)

higher than T2. Fiber content affected digestibility and produced lower effective degradability (Anrique and Viveros 2002). In d8, NPN proportion in T1 was lower than in T2, regarding the observation of the relationship TP/CP, which indicated that T2 had higher amount of residues of urea and ammonia sulfate, from the amounts added at the beginning of SSF process.

It is known that nitrogen, coming from urea and ammonia sulfate, is highly soluble (NRC 2001). As a consequence, they are detected as 100 % digestible in digestibility tests. The low digestibility in T1 may be explained by the high content of structural carbohydrates in d0 and the low proportion of NNP in d8 of T1 regarding T2.

que antes de ser fermentados (d0).

En el d0, las concentraciones de FDN, FDAy L de T1 fueron mayores que las de T2. El contenido de fibra afectó la digestibilidad y produjo menor degradabilidad efectiva (Anrique y Viveros 2002). En el d8, la proporción de NNP en T1 fue menor que la de T2, según lo observado en la relación PV/PC, lo que indicó que T2 tuvo mayor cantidad de residuos de urea y sulfato de amonio, provenientes de las cantidades que se agregaron al inicio del proceso de FES.

Se conoce que el nitrógeno, proveniente de la urea y del sulfato de amonio, es altamente soluble (NRC 2001). Como consecuencia de ello, en pruebas de digestibilidad se detectan como 100 % digestibles. Mayor contenido de carbohidratos estructurales en el d0 y menor proporción

The AB and the WA may have a high proportion of non-structural carbohydrates, as it can be observed in the chemical composition published by Joshi and Sandhu (1996) and USDA (2011). This type of carbohydrate may be highly digestible and decreases in the processes of anaerobic fermentation (NRC 2001) and in the SSF (Joshi and Sandhu 1996 and Rodríguez *et al.* 2001b).

Similar to the observed in T1 vs. T2, in d8 of SSF, the mean proportion of TP/CP of substrates in d0 was lower than the mean of this proportion in d8. This indicates that substrates fermented in d0 had higher amount of non-protein nitrogen (NPN) than the substrates fermented in d8. Because this NPN comes from urea and aggregated ammonia sulfate, and these compounds are highly soluble (NRC 2001), it may be suggested that the highest digestibility of substrates in d0, regarding d8, occurred due to its high content of urea and ammonia sulfate.

Therefore, it is not recommended the addition of grounded WA to apple bagasse for obtaining "Manzarina" under the SSF conditions of this experiment because its cost in time, management and money of waste apple increases without a substantial increase in the production of microbial protein.

It is possible that 1.5 % of urea and 0.4 % of ammonia sulfate, conditioned to apple bagasse in a humid base for SSF, is superior to the optimal one because with these amounts, some NPN is lost in the shape of NH_3 .

Concentration of ADF, NDF and L was higher at the beginning of SSF in T1 than in T2. However, at the end of SSF, the concentration of these components was significantly higher in T2 than in T1. This indicates that, in T1, there was a use of structural carbohydrates during the process, unlike T2, where there was availability of rapidly fermentable sugars.

During the SSF of apple by-products, there was a considerable waste of dry matter, which indicates that there is a great microbial activity that is used as substrate by the structural carbohydrates within these by-products.

With the SSF process of apple by-products, there was around 4.5 % more dry matter waste in T1 than in T2.

Results of this study have a practical importance for producers involved in the use or with possibility of making use of "Manzarina". They will also allow to strengthen the information of professionals related to animal feeding and nutrition, regarding the characteristics of "Manzarina". This research also contributes to increase the available information on the characteristics and process of SSF for obtaining this product.

de NNP en el d8 de T1 con respecto a T2, podrían explicar la menor digestibilidad en T1.

El BM y la MD pueden tener una proporción alta de carbohidratos no estructurales, como se puede observar en la composición química publicada por Joshi y Sandhu (1996) y USDA (2011). Este tipo de carbohidrato puede ser altamente digestible y disminuye en los procesos de fermentación anaerobios (NRC 2001) y en la FES (Joshi y Sandhu 1996 y Rodríguez *et al.* 2001b).

De manera similar a como se observó en el T1 vs. el T2, en el d8 de la FES, el promedio de la proporción de PV/PC de los sustratos en el d0 fue menor que el promedio de esta proporción en el d8. Esto indica que los sustratos fermentados en el d0 tuvieron mayor cantidad de nitrógeno no proteico (NNP) que los sustratos fermentados en el d8. Puesto que ese NNP es proveniente de la urea y el sulfato de amonio agregado, y estos compuestos son altamente solubles (NRC 2001), se puede sugerir que la mayor digestibilidad de los sustratos en el d0 con respecto a lo observado en el d8, se debió a su mayor contenido de urea y sulfato de amonio.

Por lo anterior, no se recomienda la adición de MD molida al bagazo de manzana para la obtención de manzarina en las condiciones de FES de este experimento, pues el costo en tiempo, manejo y dinero de la manzana de desecho se incrementa, sin aumento sustancial en la producción de proteína microbiana.

Es posible que 1.5 % de urea y 0.4 % de sulfato de amonio, adicionados al bagazo de manzana en fase húmeda para el proceso de FES, sea superior al óptimo, ya que con esas cantidades se pierde algo de NNP en forma de NH_3 .

La concentración de FAD, FDN y L fue mayor al inicio de la FES en el T1 con respecto al T2. Sin embargo, al final de la FES, la concentración de estos componentes fue significativamente mayor en T2 que en T1. Esto indica que en T1 hubo utilización de los carbohidratos estructurales durante el proceso, a diferencia del T2, donde hubo disponibilidad de azúcares de rápida fermentación.

Durante la FES de subproductos de manzana, hubo considerable pérdida de materia seca, lo que indica que existe gran actividad microbiana que utilizan como sustrato los carbohidratos estructurales presentes en dichos subproductos.

Con el proceso de la FES de subproductos de manzana, hubo aproximadamente 4.5% más de pérdida de materia seca en el T1 que en el T2

Los resultados de este trabajo son de importancia práctica para productores involucrados en el uso o con posibilidad de hacer uso de la manzarina. También permitirán enriquecer la información de profesionales relacionados con la alimentación y la nutrición animal, en lo que respecta a las características de la manzarina. Esta investigación contribuye además, a incrementar la información disponible acerca de las características y el proceso de FES para la obtención de este producto.

References

- Ajila, C. M., Gassara, F., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D. & Valéro, J. R. 2012. "Polyphenolic Antioxidant Mobilization in Apple Pomace by Different Methods of Solid-State Fermentation and Evaluation of Its Antioxidant Activity". *Food and Bioprocess Technology*, 5(7): 2697–2707, ISSN: 1935-5130, 1935-5149, DOI: 10.1007/s11947-011-0582-y.
- ANKOM. 2005. Acid Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (ANKOM200). Text, ANKOM Technology, Available: <http://www.ankom.com/00_products/product_a200.shtml>, [Consulted: January 30, 2008].
- Anrique, R. & Viveros, M. P. 2002. "Efecto del ensilado sobre la composición química y degradabilidad ruminal de la pomasa de manzana". *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2): 189–197, ISSN: 0301-732X, DOI: 10.4067/S0301-732X2002000200005.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1999. *Official Method of Analysis*. 16th Ed. Washington DC, USA, 1200p
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M. & Tyagi, R. D. 2011. "Enhanced solid-state citric acid bio-production using apple pomace waste through surface response methodology". *Journal of Applied Microbiology*, 110(4): 1045–1055, ISSN: 1365-2672, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.04962.x.
- Dhillon, G. S., Kaur, S. & Brar, S. K. 2013. "Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27: 789–805, ISSN: 1364-0321, DOI: 10.1016/j.rser.2013.06.046.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K. & Verma, M. 2012. "Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation". *Industrial Crops and Products*, 38: 6–13, ISSN: 0926-6690, DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.12.036.
- Díaz, P. D. 2006. *Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya*. M.Sc. Thesis, Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.
- Díaz-Plascencia, D., Rodríguez-Muela, C., Mancillas-Flores, P., Corral, G., Salvador, F., Durán, L. & La O, O. 2013. "Producción de gas in vitro de una ración para vaca lechera suplementada con levaduras aisladas de subproductos de manzana". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(2): 165–169, ISSN: 2079-3480.
- Elías, A., Lezcano, O., Lezcano, P., Cordero, J. & Quintana, L. 1990. "Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (Saccharina)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 24(1): 3–12, ISSN: 2079-3480.
- FAO/LATINFOODS. 2002. *Tabla de composición de alimentos de América latina*. Available: <http://www.rlc.fao.org/es/bases/alimentos>, [Consulted: July 29, 2008]
- Gassara, F., Ajila, C. M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Verma, M. & Valero, J. 2013. "Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols". *International Journal of Food Science & Technology*, 48(10): 2119–2126, ISSN: 1365-2621, DOI: 10.1111/ijfs.12194.
- Ibarra, A., García, Y., Valiño, E., Dustet, J., Albelo, N. & Carrasco, T. 2002. "Influence of aeration on the bioconversion of sugarcane bagasse by *Trichoderma viride* M5-2 in a static bioreactor of solid fermentation". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 36(2): 152–158, ISSN: 2079-3480.
- Joshi, V. K. & Sandhu, D. K. 1996. "Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace". *Bioresource Technology*, 56(2): 251–255, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/0960-8524(96)00040-5.
- NRC (National Research Council) (ed.). 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th ed., call no. SF203 .N883 2001, Washington, D.C: National Academy Press, 381 p., ISBN: 978-0-309-06997-7.
- Rodríguez, Z., Bocourt, R., Elías, A. & Madera, M. 2001a. "Dinámica de fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata*)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 35(2): 147–151, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, Z., Elías, A., Boucourt, R. & Núñez, O. 2001b. "Efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata* Lam.)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 35(1): 29–36, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez-Muela, C., Díaz, D., Salvador, F., Ruiz, O., Arzola, C., Flores, A., La O, O. & Elías, A. 2010. "Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de manzana de desecho (*Malus domestica*)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(1): 23–26, ISSN: 2079-3480.
- SAS Institute 2010. *Statistical Analysis Software SAS/STAT®. version 9.0.2*, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc., ISBN: 978-1-60764-599-3, Available: <http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html#>.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. "A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56(1): 49–58, ISSN: 0273-2289, 1559-0291, DOI: 10.1007/BF02787869.
- USDA. 2011. *National Nutrient Database for Standard Reference. Food Composition Databases, Release 20*, Available: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>, [Consulted: September 16, 2014].
- Valiño, E., Elías, A., Torres, V. & Albelo, N. 2002. "Study of the microbial content on fresh sugar cane bagasse as substrate for animal feeding by solid state fermentation". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 36(4): 359–364, ISSN: 2079-3480.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

- Vivas, N. J. & Carvajal, J. 2004. "Saccharina Rústica una aplicación biotecnológica para la alimentación animal". *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2(1): 43–48, ISSN: 1692-3561.
- Zhong-Tao, S., Lin-Mao, T., Cheng, L. & Jin-Hua, D. 2009. "Bioconversion of apple pomace into a multienzyme bio-feed by two mixed strains of *Aspergillus niger* in solid state fermentation". *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(1): 2–3, ISSN: 0717-3458, DOI: 10.4067/S0717-34582009000100002.

Received: January 30, 2015