

Chemical and microbiological characterization of a technological variant of Vitafert intended for animal production. Technical note

Caracterización química y microbiológica de una variante tecnológica del aditivo Vitafert, destinada a la producción animal. Nota técnica

Daymara Bustamante García¹, Lourdes L. Savón Valdés¹, A. Elías Iglesias^{1†}, Y. Caro Ríos¹, Elaine C. Valiño Cabrera¹, M. Valera Rojas¹, C. Martin Nyachoti² and S. Mireles³

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba

²Department of Animal Science, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3T 2N2. Canada

³Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara, Zapopán, Jalisco, México

Email: dbustamante@ica.co.cu

Daymara Bustamante García: <https://orcid.org/0000-0002-7973-6349>

Lourdes L. Savón Valdés: <https://orcid.org/0000-0001-9880-0310>

Y. Caro Ríos: <https://orcid.org/0000-0002-2372-5042>

Elaine C. Valiño Cabrera: <https://orcid.org/0000-0003-4178-03286>

M. Valera Rojas: <https://orcid.org/0000-0003-1680-4639>

C. Martin Nyachoti: <https://orcid.org/0000-0001-7075-7226>

S. Mireles: <https://orcid.org/0000-0003-3340-7343>

To chemically and microbiologically characterize a technological variant of Vitafert, intended for animal production, chemical composition and amino acid profile of dry Vitafert were determined. In the microbiological analysis, populations of lactic acid bacteria, yeasts, fungi and pathogenic microorganisms were evaluated. A descriptive analysis was applied for data processing. Glutamic acid, leucine, proline, aspartic acid and alanine were predominant in the amino acid pattern. Dry Vitafert showed high concentration of lactic acid bacteria (15×10^7 CFU.g⁻¹) and absence of pathogenic microorganisms. Concentration of individual short chain fatty acids was low and the pH value was 5.41. Results indicate the potential of dry Vitafert for its use in animal feed, due to its chemical composition and concentration of lactic acid bacteria.

Keywords: *fermented product, chemical composition, microbial populations, feeding*

Fermented products are important for animal production, due to the versatility in their application, either as additives, supplements or food (Xu *et al.* 2020).

At the Institute of Animal Science, in Cuba, a microbial preparation called Vitafert (Elías and Herrera 2011) was obtained, composed of lactic acid bacteria, yeasts and organic acids that promote a low pH. Several researches describe its use as a zootechnical additive, with positive effects on immunological, productive and health indicators of species of economic interest (Gutiérrez 2005, Gutiérrez *et al.* 2012 and Beruvides *et al.* 2018).

For years, different variants and formulations of this biopreparation have been tested, which are related

Para caracterizar química y microbiológicamente una variante tecnológica del aditivo Vitafert, destinada a la producción animal, se determinó la composición química y el perfil de aminoácidos del Vitafert seco. En el análisis microbiológico se evaluaron las poblaciones de bacterias ácido lácticas, levaduras, hongos y microorganismos patógenos. Se aplicó un análisis descriptivo para el procesamiento de los datos. En el patrón aminoacídico predominó el ácido glutámico, leucina, prolina, ácido aspártico y alanina. El Vitafert seco mostró alta concentración de bacterias ácido lácticas (15×10^7 UFC.g⁻¹) y ausencia de microorganismos patógenos. La concentración de ácidos grasos de cadena corta individuales resultó baja y el valor de pH fue de 5.41. Los resultados indican las potencialidades del Vitafert seco para su utilización en la alimentación animal, dadas por su composición química y concentración de bacterias ácido lácticas.

Palabras clave: *producto fermentado, composición química, poblaciones microbianas, alimentación*

Los productos fermentados son de gran interés para la producción animal, debido a la versatilidad en su aplicación, sea como aditivos, suplementos o alimentos (Xu *et al.* 2020).

En el Instituto de Ciencia Animal, en Cuba, se obtuvo un preparado microbiano denominado Vitafert (Elías y Herrera 2011), compuesto por bacterias ácido lácticas, levaduras y ácidos orgánicos que promueven un pH bajo. Numerosas investigaciones describen su uso como aditivo zootécnico, con efectos positivos en los indicadores inmunológicos, productivos y sanitarios de especies de interés económico (Gutiérrez 2005, Gutiérrez *et al.* 2012 y Beruvides *et al.* 2018).

Durante años se han ensayado diferentes variantes y formulaciones de este biopreparado, que se relacionan

to its form of presentation (liquid/dry), inoculum used (feces/yogurt/ruminal content) and modifications in raw materials (final molasses/raw sugar), used to obtain it (Bustamante *et al.* 2016, Beruvides 2019 and Savón *et al.* 2020).

The knowledge of the composition of this preparation is necessary for its application in animal feeding. However, there are few studies on the characterization of these microbial additives.

The objective of this study was to chemically and microbiologically characterize a technological variant of Vitafert, intended for animal production.

Vitafert was prepared in the Food Production Laboratory, belonging to the Central Laboratory Unit of the Institute of Animal Science of the Republic of Cuba. The methodology described by Elías and Herrera (2011) was followed for this purpose. The chemical composition of this preparation is: pH 4.28 ± 0.08 , lactic acid $452.0 \text{ mMol.L}^{-1}$, acetic acid $227.36 \text{ mMol.L}^{-1}$, butyric acid $85.32 \text{ mMol.L}^{-1}$, DM $90.9 \text{ g/kg} \pm 0.08$ and CP $80.2 \text{ g/kg DM} \pm 0.10$. Populations of lactic acid bacteria and yeasts were 10^{10} and 10^7 CFU.g^{-1} , respectively. The presence of *Escherichia coli* was not detected.

The technological variant was prepared from the mixture of Vitafert with corn meal 1:1 (w/v), as proposed by Gutiérrez (2005). Drying was carried out by direct exposure to sun for 72 h, with mean maximum temperature values of $27.3 \text{ }^\circ\text{C}$ and relative humidity of 76 %. Dry Vitafert was stored in double-layer paper bags for five days. Five samples of 1 kg each were taken to perform chemical and microbiological analyzes. Particle size was reduced to 1 mm in a Thomas Wiley mill (Model 4. Thomas Scientific, Swedesboro, NJ).

Chemical analyzes were conducted at the Department of Animal Science at the University of Manitoba, Canada. Standard procedures of the AOAC (2006) were used for calculating DM, CP, ether extract and amino acid profile. Gross energy was determined on an adiabatic bomb calorimeter (model 6400. Parr Instrument Company, Moline, Illinois, USA). Fiber fractioning was performed according to van Soest *et al.* (1991).

To determine the pH and the concentration of individual short chain fatty acids (iSCFA), 5 g of dry Vitafert were taken and diluted in 45 mL of distilled water 1:10 (w/v) by mechanical stirring for 20 min. The pH was determined with a digital pH meter, WPA brand (CD-70 series of English manufacture). The quantification of iSCFA was carried out in a DANI Master GC gas chromatograph (DANI Instruments S.p.A, Milan, Italy).

A 1 mL aliquot was taken from the aqueous extraction of dry Vitafert to make the serial dilutions in peptone water (0.1 % w/v). The 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} dilutions were cultivated in tubes rolled with Rogosa agar (Rogosa

con su forma de presentación (líquido/seco), inóculo utilizado (excretas/yogurt/contenido ruminal) y modificaciones en las materias primas (miel final/azúcar crudo) empleadas para su obtención (Bustamante *et al.* 2016, Beruvides 2019 y Savón *et al.* 2020).

El conocimiento de la composición de este preparado es necesario para su aplicación en la alimentación animal. Sin embargo, en la literatura existen pocos estudios acerca de la caracterización de estos aditivos microbianos.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar química y microbiológicamente una variante tecnológica del aditivo Vitafert, destinada a la producción animal.

El Vitafert se elaboró en el Laboratorio de Producción de Alimentos, perteneciente a la Unidad Central de Laboratorios del Instituto de Ciencia Animal de la República de Cuba. Se siguió para ello la metodología descrita por Elías y Herrera (2011). La composición química de este preparado es: pH 4.28 ± 0.08 , ácido láctico $452.0 \text{ mMol.L}^{-1}$, ácido acético $227.36 \text{ mMol.L}^{-1}$, ácido butírico $85.32 \text{ mMol.L}^{-1}$, MS $90.9 \text{ g/kg} \pm 0.08$; PB $80.2 \text{ g/kg MS} \pm 0.10$. Las poblaciones de bacterias ácido lácticas y levaduras fueron 10^{10} y 10^7 UFC.g^{-1} , respectivamente. No se detectó la presencia de *Escherichia coli*.

La variante tecnológica se elaboró a partir de la mezcla del Vitafert con la harina de maíz 1:1 (p/v), según lo propuesto por Gutiérrez (2005). El secado se realizó mediante la exposición directa al sol durante 72 h, con valores de temperatura máxima promedio de $27.3 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 76 %. El Vitafert seco se conservó en sacos de papel de doble capa durante cinco días. Se tomaron cinco muestras de 1 kg para realizar los análisis químicos y microbiológicos. El tamaño de partícula se redujo a 1 mm en un molino Thomas Wiley (modelo 4. Thomas Scientific, Swedesboro, NJ).

Los análisis químicos se realizaron en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Manitoba, en Canadá. Se utilizaron los procedimientos estándar de la AOAC (2006) para el cálculo de MS, PB, extracto etéreo y perfil de aminoácidos. La energía bruta se determinó en un calorímetro adiabático de bomba (modelo 6400. Parr Instrument Company, Moline, Illinois, EUA). Para el fraccionamiento de la fibra se procedió según van Soest *et al.* (1991).

Para determinar el pH y la concentración de los ácidos grasos de cadena corta individuales (AGCCi), se tomaron 5 g del Vitafert seco y se diluyeron en 45 mL de agua destilada 1:10 (p/v) mediante agitación mecánica durante 20 min. El pH se determinó con un pH metro digital, marca WPA (serie CD-70 de manufactura inglesa). La cuantificación de los AGCCi se realizó en un cromatógrafo de gases DANI Master GC (DANI Instruments S.p.A, Milán, Italia).

Se tomó una alícuota de 1 mL de la extracción acuosa del Vitafert seco para realizar las diluciones seriadas en agua peptona (0.1 % p/v). Las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se sembraron en tubos rodados con agar Rogosa (Rogosa *et al.* 1951). Los tubos se inocularon a razón

et al. 1951). Tubes were inoculated at 1:10 (v/v) and incubated for 48 h at 37 °C. The number of CFU.mL⁻¹ was quantified by visual counting of colonies. The microbiological quality was carried out in the National Laboratory of Food Hygiene (National Reference Center), belonging to the Central Laboratories Unit for Agricultural Health of the Ministry of Agriculture in Cuba. The current Cuban standards for yeasts and fungi/g (NC-ISO 1004: 2016), Salmonella in 25 g (NC-ISO 6579: 2008) and total coliforms/g (NC-ISO 4832: 2010) were applied.

Five samples were analyzed by triplicate for chemical analysis. In the case of amino acids, a determination was made by duplicate.

For the chemical indicators, the position and dispersion statistics: mean, standard deviation and coefficient of variation (%), were determined. InfoStat statistical package, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012), was used.

Table 1 shows the chemical and energy composition of dry Vitafert. DM content was superior to 85 %, an aspect that must be considered for the conservation and storage of the product. According to Belén-Camacho *et al.* (2007), the reduction of humidity content increases the useful life of products, since it causes a decrease of water activity, which delays microbial growth and slows down various deteriorating reactions.

de 1:10 (v/v) y se incubaron durante 48 h, a 37 °C. El número de UFC.mL⁻¹ se cuantificó por conteo visual de las colonias. La calidad microbiológica se realizó en el Laboratorio Nacional de Higiene de los Alimentos (Centro de Referencia Nacional), perteneciente a la Unidad de Laboratorios Centrales de Sanidad Agropecuaria del Ministerio de la Agricultura en Cuba. Se aplicaron las normas cubanas vigentes para levaduras y hongos/g (NC-ISO 1004:2016), Salmonella en 25 g (NC-ISO 6579:2008) y coliformes totales/g (NC-ISO 4832:2010).

Se analizaron cinco muestras por triplicado para los análisis químicos. En el caso de los aminoácidos, se realizó una determinación por duplicado.

Para los indicadores químicos se determinaron los estadígrafos de posición y dispersión: media, desviación estándar y coeficiente de variación (%). Se utilizó el paquete estadístico InfoStat, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

La tabla 1 muestra la composición química y energética del Vitafert seco. El contenido de MS resultó superior al 85 %, aspecto que se debe considerar para la conservación y almacenamiento del producto. Según Belén-Camacho *et al.* (2007), la reducción del contenido de humedad aumenta la vida útil de los productos, ya que ocasiona descenso de la actividad del agua, lo que retrasa el crecimiento microbiano y disminuye la velocidad de varias reacciones deteriorantes.

Table 1. Chemical and energy composition of dry Vitafert

Nutrients, %	Mean	SD	CV (%)
DM	90.11	6.58	0.17
CP	14.58	0.02	0.11
Ether extract	2.58	0.13	1.20
Gross energy*	18.40	0.04	0.19
NDF	11.32	0.42	0.75
ADF	3.10	0.16	1.02
Hemicellulose	8.22	0.30	0.28

*expressed as MJ

The high content of CP could be associated with biochemical transformations that occur during the absorption time of water present in the system on the solid support and during drying in the sun. This suggests that fermentation process was able to continue. According to Anguita *et al.* (2006), the biotechnological processing of cereals, rich in carbohydrates, favors an increase of starch hydrolysis and, consequently, an increase of the amount of non-starch polysaccharides. For this reason, microbial populations present in the product were able to use soluble corn starch to increase single-cell biomass. Similarly, the protein contribution of corn meal used as absorbent material is another factor that could have contributed to the increase in protein in the final product.

El alto tenor de PB pudiera estar asociado a las transformaciones bioquímicas que ocurren durante el tiempo de absorción del agua presente en el sistema sobre el soporte sólido y en el secado al sol. Esto sugiere que el proceso de fermentación pudo continuar. Según Anguita *et al.* (2006), el procesamiento biotecnológico de cereales ricos en carbohidratos favorece el incremento de la hidrólisis del almidón y, por consiguiente, el aumento en la cantidad de polisacáridos no amiláceos. Por esta razón, las poblaciones microbianas presentes en el producto pudieron utilizar el almidón soluble del maíz para el incremento de la biomasa unicelular. De igual forma, el aporte proteico de la harina de maíz utilizada como material absorbente es otro factor que pudo contribuir al aumento de la proteína del producto final.

Por lo general, los valores del resto de los indicadores

In general, values of the rest of dry Vitafert indicators can be a result of the concentration of nutrients that takes place during the drying process, together with the previously described aspects.

There are few studies that deepen into the changes that occur during the drying of liquid fermented products. However, it is known about other technological variants which used the same support for this operation.

Gutiérrez (2005) characterized the dry preparation, obtained from the fermentation of fresh poultry manure with final molasse, and observed a rise in protein content from 8.01 to 13.49 %. Savón *et al.* (2017) indicated a value of 8.04 % for the dry fermented product, made from rumen content. Variation in results can be related to modifications in the formulation of Vitafert.

Figure 1 shows the amino acid profile of dry Vitafert, with the ten essential amino acids and eight of the non-essential ones. A high content of non-essential amino acids was observed, in the following order: glutamic acid, proline, aspartic acid, alanine, serine, cystine, tyrosine and glycine. However, leucine, arginine, valine, phenylalanine, lysine and threonine predominated in the essentials. The amino acid content of Vitafert is not known, so its availability and concentration in this technological variant could be determined by the factors described above.

del Vitafert seco se pueden deber a la concentración de nutrientes que tiene lugar durante el proceso de secado, unido a los aspectos antes descritos.

En la literatura disponible existen pocas investigaciones donde se profundice en los cambios que ocurren durante el secado de productos fermentados líquidos. Sin embargo, se conoce de otras variantes tecnológicas en las que se empleó el mismo soporte para esta operación.

Gutiérrez (2005) caracterizó el preparado seco, obtenido a partir de la fermentación de la gallinaza fresca con miel final, y observó ascenso en el contenido de proteína de 8.01 a 13.49 %. Savón *et al.* (2017) indicaron un valor de 8.04 % para el producto fermentado seco, elaborado a partir del contenido de rumen. La variación en los resultados se puede relacionar con las modificaciones en la formulación del Vitafert.

En la figura 1 se muestra el perfil aminoacídico del Vitafert seco, con los diez aminoácidos esenciales y ocho de los no esenciales. Se observó alto contenido de aminoácidos no esenciales, en el orden que sigue: ácido glutámico, prolina, ácido aspártico, alanina, serina, cistina, tirosina y glicina. Sin embargo, predominó en los esenciales la leucina, arginina, valina, fenilalanina, lisina y treonina. El contenido de aminoácidos del Vitafert no se conoce, por lo que su disponibilidad y concentración en esta variante tecnológica pudo estar determinada por los factores descritos anteriormente.

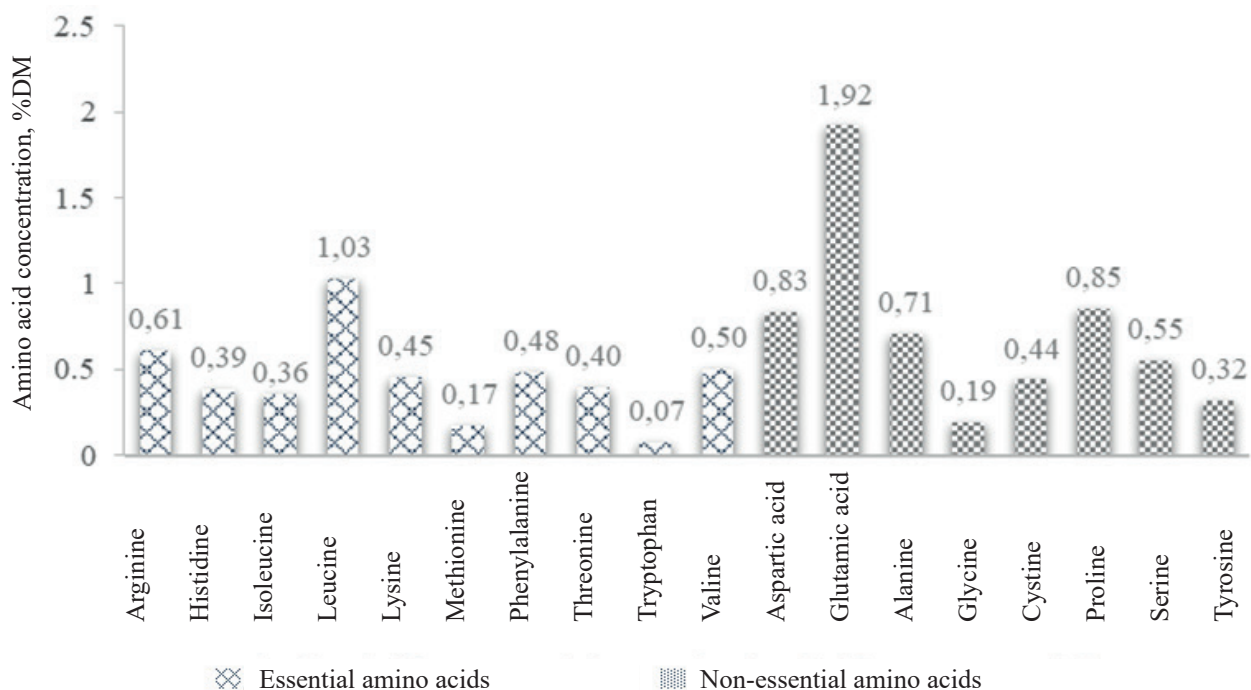


Figure 1. Concentration of essential and non-essential amino acids (% DM) in dry Vitafert

The contribution of amino acids is important because they regulate or participate in key metabolic pathways for growth, development, reproduction and health of animals. For this reason, the composition of this fermented product could help meeting the requirements of different monogastric species, due to its contribution of functional amino acids. Wu *et al.* (2014) stated that

La contribución de los aminoácidos es esencial porque ellos regulan o participan en rutas metabólicas clave para el crecimiento, desarrollo, reproducción y salud del animal. Por esta razón, la composición de este producto fermentado pudiera contribuir a satisfacer los requerimientos de diferentes especies monogástricas, por su aporte de aminoácidos funcionales. Wu *et al.*

functional amino acids contribute to the metabolic needs of the animal for dietary amino acid, beyond the synthesis of tissue protein, in which essential, non-essential and conditionally essential amino acids are included.

The pH of dry Vitafert is acidic, even though the concentration of individual short chain fatty acids is low (table 2). This performance could be related to drying at room temperature, together with the dilution effect of corn meal, which could cause the volatilization of these acids. However, there was a higher concentration of mMol.L⁻¹ of acetic acid, with a reduction of 7.12% with respect to liquid Vitafert. This is associated with the decrease of bacteria populations that produce this acid.

(2014) definieron que los aminoácidos funcionales contribuyen a las necesidades metabólicas del animal por el aminoácido dietético, más allá de la síntesis de proteína tisular, donde se incluyen aminoácidos esenciales, no esenciales y condicionalmente esenciales.

El pH del Vitafert seco es ácido, aun cuando la concentración de los ácidos grasos de cadena corta individuales es baja (tabla 2). Este comportamiento pudiera estar relacionado con el secado a temperatura ambiente, unido al efecto de dilución de la harina de maíz, que pudo ocasionar la volatilización de estos ácidos. Sin embargo, hubo mayor concentración de mMol.L⁻¹ de ácido acético, con reducción del 7.12 % con respecto al Vitafert líquido. Esto se asocia a la disminución de poblaciones de bacterias productoras de este ácido.

Table 2. Microbiological composition, pH and profile of individual short chain fatty acids of dry Vitafert

	Mean	SD	CV (%)
pH	5.41	0.02	0.45
Individual short chain fatty acids, mMol.L ⁻¹			
Acetic	16.17	0.43	2.69
Propionic	0.40	0.01	2.58
Butyric	0.29	0.01	2.59
Isovaleric	0.08	0.02	1.42
Valeric	0.09	0.06	1.02
Microorganisms, CFU.g ⁻¹			
Lactic acid bacteria	15 x 10 ⁷	0.05	0.01
Yeasts and fungi	<10 ²	-	-
Salmonella	Absent	-	-
Total Coliforms	<10 ²	-	-

Yeh *et al.* (2018) observed that pH of a fermented diet (inoculated with 10⁶ CFU.g⁻¹ food of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*) remained acidic during drying with the use of high temperatures. Authors reported that acetic acid content decreased, while butyric and propionic acids were below detection limits. These results indicate that drying does not affect the acidity of the additive, but its concentration of short chain fatty acids does.

The microbiological composition of dry Vitafert showed a high concentration of lactic acid bacteria, a permissible number of yeasts, fungi and an absence of pathogens. However, during the drying process of Vitafert, there was a reduction of 10² CFU.g⁻¹ of lactic acid bacteria and the content of yeast present in the liquid Vitafert was reduced five times. This corresponds to the low concentration of individual short chain fatty acids that was obtained and, probably, with the dilution effect of corn meal as absorbent material.

Even though the concentration of lactic acid bacteria was reduced with this technological variant, it is within the range of 10⁶-10⁷ CFU.g⁻¹, established by FAO/

Yeh *et al.* (2018) observaron que el pH de una dieta fermentada (inoculada con 10⁶ UFC.g⁻¹ alimento de *Bacillus subtilis* y *Bacillus coagulans*) se mantuvo ácido durante el secado con la utilización de altas temperaturas. Los autores refirieron que el contenido de ácido acético disminuyó, mientras que el ácido butírico y el propiónico estuvieron por debajo de los límites de detección. Estos resultados indican que el secado no afecta la acidez del aditivo, pero sí su concentración de ácidos grasos de cadena corta.

La composición microbiológica del Vitafert seco mostró alta concentración de bacterias ácido lácticas, número permisible de levaduras, hongos y ausencia de patógenos. Sin embargo, durante el proceso de secado del Vitafert hubo reducción de 10² UFC.g⁻¹ de bacterias ácido lácticas y se redujo cinco veces el contenido de levaduras presentes en el Vitafert líquido. Lo anterior se corresponde con la baja concentración de ácidos grasos de cadena corta individuales que se obtuvo y probablemente, con el efecto de dilución de la harina de maíz como material absorbente.

Aun cuando la concentración de bacterias ácido lácticas se redujo con esta variante tecnológica, se

WHO (2002). This indicates that the inclusion of these microorganisms in the diet could have beneficial effects for the animal and express a possible probiotic activity, when ingested in sufficient quantities.

Concentration of viable lactic acid bacteria, acid characteristics and decrease of the number of pathogenic microorganisms contributed to the hygienic-sanitary quality of dry Vitafert.

Acknowledgements

Thanks to the Department of Animal Science, University of Manitoba. In particular, to the research technician Atanas Karamanov, for the material and technical assistance.

Conflict of interest

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

Author's contribution

Daymara Bustamante García: Conducting the experiment, data analysis, manuscript writing

Lourdes L. Savón Valdés: Original idea, design the experiment, data analysis

Elías Iglesias: Original idea, Design the experiment, data analysis

Y. Caro Ríos: Conducting the experiment, data analysis

Elaine C. Valiño Cabrera: Data analysis, manuscript writing

M. Valera Rojas: Data analysis, statistical analysis

C. Martin Nyachoti: Lab analysis, data analysis

S. Mireles: Lab analysis, data analysis

encuentra en el rango de 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹, establecido por la FAO/WHO (2002). Esto indica que la incorporación de estos microorganismos en la dieta pudiera tener efectos benéficos en el animal y expresar una posible actividad probiótica, cuando se ingieren en cantidades suficientes.

La concentración de las bacterias ácidos lácticas viables, las características ácidas y la disminución del número de microorganismos patógenos contribuyeron a la calidad higiénico-sanitaria del Vitafert seco.

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Manitoba. En especial, al técnico de investigación Atanas Karamanov, por la asistencia material y técnica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflict de intereses

Contribucion de los autores

Daymara Bustamante García: Conducción del experimento, análisis de datos, escritura del manuscrito

Lourdes L. Savón Valdés: Idea original, diseño de la investigación, análisis de datos

Elías Iglesias: Idea original, diseño de la investigación, análisis de datos

Y. Caro Ríos: Conducción del experimento, análisis de datos,

Elaine C. Valiño Cabrera: Análisis de datos, escritura del manuscrito

M. Valera Rojas: Análisis de datos, análisis estadístico

C. Martin Nyachoti: Análisis de laboratorio, análisis de datos

S. Mireles: Análisis de laboratorio, análisis de datos

References

- Anguita, M., Gasa, J., Martin-Orue, S.M. & Perez, J.F. 2006. "Study of the effect of technological processes on starch hydrolysis, non-starch polysaccharides solubilization and physicochemical properties of different ingredients using a two-step in vitro system". *Animal Feed Science Technology*, 129(1-2): 99-115, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.004>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2006. *Official Methods of Analysis*. 18th Ed. A.O.A.C. International. Washington D.C., U.S.A.
- Belén-Camacho, D.R., Román, J.C., García, D.M., Moreno-Álvarez, M.J., Medina, C. & Ojeda, C.E. 2007. "Efecto del secado solar en los contenidos de humedad, carbohidratos, carotenoides totales e índice de peróxidos del mesocarpio de la Palma Coroba (*Attalea spp.*)". *Interciencia*, 32(4): 257-261, ISSN: 0378-1844.
- Beruvides, A. 2019. Efecto del aditivo zootécnico Vitafert en la respuesta biológica en crías y precebas porcinas. PhD Thesis. Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p. 100.
- Beruvides, A., Elías, A., Valiño, E., Milián, G., Lezcano, Y., Moliner, J.L., Rodríguez, M. & Zamora, H. 2018. "Evaluation of the zootechnical additive VITAFERT in the productive performance and health of pre-fattening piglets". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(1): 49-56, ISSN: 2079-3480.
- Bustamante, D., Savón, L., Elías, A., Caro, Y., Sierra, F. & Almeida, M. 2016. "Effect of Vitafert on the digestive use of nitrogen in roosters that consume Moringa oleifera forage meal. Technical note". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(2): 273-278, ISSN: 2079-3480.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. *InfoStat*. Version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>.
- Elías, A. & Herrera, F. 2011. Registro de Patente. No. 81/2011. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. La Habana, Cuba.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30 & May 1. London, Ontario, Canada, Available: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf, [Consulted: July 25th 2020].

- Gutiérrez, B.R. 2005. Actividad probiótica de un producto biofermentado (VITAFER), en pollos de ceba. Master of Science Thesis. Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p. 52.
- Gutiérrez, D., Elías, A., García, R., Herrera, F., Jordán, H. & Sarduy, L. 2012. "Effect of the microbial additive VITAFERT on the intake of dry matter and neutral detergent fiber in Saanen goats fed *Brachiaria brizantha* hay". Cuban Journal of Agricultural Science, 46(3): 267-271, ISSN: 2079-34780.
- NC-ISO 6579: 2008. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Oficina Nacional de Normalización de Cuba, La Habana, Cuba.
- NC-ISO 4832: 2010. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de Coliformes. Método de referencia. Oficina Nacional de Normalización de Cuba, La Habana, Cuba.
- NC-ISO 1004: 2016. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Oficina Nacional de Normalización de Cuba, La Habana, Cuba.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. & Wiseman, R.F. 1951. "A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli". Journal of Bacteriology, 62(1): 132-133, ISSN: 0021-9193, DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.62.1.132-133.1951>.
- Savón, L.L., Sánchez, B., Elías, A., Ortega, H.J., Gutiérrez, M., Scull, I. & Herrera, M. 2020. "Effect of a dry fermented product on morphological, immunological, histological and health indicators of broilers". Cuban Journal of Agricultural Science, 54(1): 83-92, ISSN: 2079-3480.
- Savón, L.L., Scull, I., Elías, A., Rodríguez, C. & Orta, I. 2017. Potencialidades de un nuevo producto fermentado como alimento animal. In: Memorias VII Seminario Internacional de Porcicultura Tropical, 18-21 de Abril. Hotel Nacional, La Habana, Cuba, ISBN: 978-959-7208-31-0.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B. 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: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wu, G., Bazer, F.W., Dai, Z., Li, D., Wang, J. & Wu, Z. 2014. "Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond". Annual Review of Animal Biosciences, 2: 387-417, ISSN: 2165-8110, DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114113>.
- Xu, B., Li, Z., Wang, C., Fu, J., Zhang, Y., Wang, Y. & Lu, Z. 2020. "Effects of fermented feed supplementation on pig growth performance: A meta-analysis". Animal Feed Science and Technology, 259(1): 114-315, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114315>.
- Yeh, R.H., Hsieh, C.W. & Chen, K.L. 2018. "Screening lactic acid bacteria to manufacture two-stage fermented feed and pelleting to investigate the feeding effect on broilers". Poultry Science, 97(1): 236-246, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pex300>.

Received: October 13, 2020

Accepted: February 5, 2021