

SUERO DE LECHE FERMENTADO CON LACTOBACILOS PARA LA ALIMENTACIÓN DE BECERROS EN EL TRÓPICO

FERMENTED WHEY WITH LACTOBACILLI FOR CALF FEEDING IN THE TROPICS

Maribel Montero-Lagunes^{1*}, Francisco I. Juárez-Lagunes², Hugo S. García-Galindo³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental "La Posta" km 22.5 carretera libre Veracruz-Córdoba. Paso del Toro, Veracruz. Apartado Postal No. 1224. Veracruz, Veracruz. CP. 91700. (maribel_montero@hotmail.com). ²Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Circunvalación esquina Yáñez. Veracruz, Veracruz. CP. 91710. (juarezf@hotmail.com). ³UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz. M.A. de Quevedo 2779, Veracruz, Veracruz CP. 91897. (hsgarcia@itver.edu.mx).

RESUMEN

La descomposición del suero de leche (SL) es rápida. Fermentado, podría ser usado en la alimentación de rumiantes. Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar químicamente al SL; fermentar el SL con *Lactobacillus casei* (SLF); y usarlo en la alimentación de becerros. Se obtuvo SL de nueve queserías (de los municipios de Cotaxtla y Medellín de Bravo, Veracruz, México) cada 7 d durante dos meses, y se determinó: acidez, pH, proteína, grasa, lactosa y sólidos totales; y se calculó el promedio y desviación estándar. El crecimiento (de 0 a 96 h) de *L. casei* NRRL B-1922 en SL pasteurizado a 63 °C por 15 min, se midió contando las UFC mL⁻¹ en agar MRS. Se comparó contra un testigo (consumo de leche 4 L d⁻¹) (T1), la adición de SL 2 L d⁻¹ (T2), de SLF 2 L d⁻¹ (T3), y la sustitución de leche 1 L d⁻¹ por SLF 3 L d⁻¹ (T4), en 24 becerros (Holstein×Cebú) del nacimiento a los 3 meses de edad, en crianza artificial en el trópico (Veracruz), midiendo ganancia diaria de peso (GDP) y consumo de concentrado (CC). El análisis de varianza fue con PROC MIXED (SAS) para cuatro tratamientos y mediciones repetidas en el tiempo. Las características del SL (base húmeda) fueron: acidez 2.1±0.46 %, pH 5.6±1.10, proteína 2.2±0.52 %, grasa 0.5±0.22 %, lactosa 4.3±0.21 % y sólidos totales 7.1±0.92 %. Los lactobacilos alcanzaron su máximo crecimiento (1×10⁷ UFC mL⁻¹) a las 24 h. Las GDP fueron similares (p>0.05) en todos los becerros; pero el CC en los becerros T2 y T3 fue 38.7 % menor que con T1, y el consumo de leche en T4 fue 25 % menor (p≤0.05). Se concluye que el SLF con *L. casei* prolonga su estabilidad aeróbica, reduce el CC sin cambiar la GDP en becerros Holstein×Cebú en el trópico.

Palabras clave: Bovinos, probiótico, sustituto de leche.

INTRODUCCIÓN

El suero de leche (SL), un subproducto de la industria quesera, tiene lactosa y proteínas de alto valor biológico (lactoglobulinas y albúminas)

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Abril, 2008. Aprobado: Julio, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 43: 585-593. 2009.

ABSTRACT

Whey (SL) spoils rapidly and lactic fermentation is a viable preservation alternative; once fermented, it can be used to feed ruminants. Therefore the objectives of the present study were to chemically characterize whey; fermented with *Lactobacillus casei* (SLF); and use it for calf feeding. Whey was obtained from nine small cheese plants located in the municipalities of Cotaxtla and Medellín de Bravo, Veracruz, Mexico, every 7 d during two months. Acidity, pH, protein, fat, lactose and total solids were determined, and the average and standard deviation were calculated. The growth (from 0 to 96 h) of *L. casei* NRRL B-1922 in whey pasteurized at 63 °C for 15 min was measured counting the UFC mL⁻¹ in MRS agar. A control (milk intake, 4 L d⁻¹) (T1) was included for comparison purposes: in the addition of whey, 2 L d⁻¹ (T2), or SLF, 2 L d⁻¹ (T3); and milk, 1 L d⁻¹, replaced by SLF 3 L d⁻¹ (T4), in 24 calves (Holstein×Zebu) from birth until three months old, in artificial rearing in the tropic (Veracruz). Average daily weight gain (ADG) and concentrate consumption (CC) were monitored. ANOVA was performed with PROC MIXED (SAS) for four treatments and repeated measurements over time. The characteristics of whey (wet basis) were: acidity 2.1±0.46 %, pH 5.6±1.10, protein 2.2±0.52 %, fat 0.5±0.22 %, lactose 4.3±0.21 % and total solids 7.1±0.92 %. Lactobacilli reached their maximum growth (1×10⁷ UFC mL⁻¹) in 24 h. ADGs were similar (p>0.05) in all the calves; but CC in T2 and T3 calves was 38.7 % lower than under T1, and the use of milk in T4 was 25 % lower (p≤0.05). It was concluded that SLF with *L. casei* extended its aerobic stability, and reduced CC without changing the ADG in Holstein×Zebu calves in the tropic.

Key words: Bovine, probiotics, milk substitute.

INTRODUCTION

Whey (SL), a by-product of the cheese industry, contains lactose and proteins of high biological value (lactoglobulins and albumins) and great potential as food for ruminants. In

y gran potencial como alimento para rumiantes. En México las queserías artesanales procesan 2000 a 10 000 L de leche d^{-1} ; en Veracruz, 56 % de la producción de leche se usa para producir quesos. La mayor parte del SL es desechado a los mantos acuíferos o al suelo; no ha sido un subproducto útil debido principalmente a su alto contenido acuoso y rápida descomposición. Por tal motivo, el SL fresco tiene poco uso en la alimentación de becerros.

Se han realizado varios estudios para encontrar el método menos costoso de desechar el SL, identificar nuevas opciones de uso, prevenir la pérdida potencial de nutrientes valiosos y reducir la contaminación ambiental (González-Martínez *et al.*, 2002). Una opción puede ser fermentarlo con lactobacilos (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005); además, los lactobacilos vivos en el SL fermentado podrían constituir un alimento probiótico (Jelen, 2003). El uso de lactobacilos en leche y sustitutos de leche ha sido benéfico para la alimentación de becerros desde sus primeras etapas de crecimiento, que es la más difícil debido a la alta incidencia de mortalidad por enfermedades diarreicas (Cruywagen *et al.*, 1996). Pero el SL líquido de leche no pasteurizada, fermentado con lactobacilos usado en la alimentación de becerros es una práctica no documentada. Se podría sustituir una proporción de leche por SL fermentado para alimentar becerros, lo que mejoraría el ingreso económico para el productor. La hipótesis en este estudio fue que el suero de leche no pasteurizada puede ser preservado por fermentación con lactobacilos, y que el SL fermentado puede ser usado para alimentar becerros en sustitución parcial de leche. Por tanto, los objetivos fueron preservar el SL con lactobacilos, y determinar el efecto de sustituir 25 % del consumo de leche por SL fermentado sobre el consumo de concentrado (CC), peso corporal (PC) y ganancias diarias de peso (GDP) en becerros al destete (90 d) y hasta 6 meses de edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Preservación de suero de leche por fermentación con lactobacilos

Caracterización química y bacteriológica del suero de leche

Se recolectó SL fresco de nueve queserías de los municipios de Cotaxtla y Medellín de Bravo (Veracruz, México), cada 7 d durante dos meses (total, 72 muestras). Para la caracterización química se determinó (base húmeda): pH, proteína total, grasa, sólidos totales, y cuenta total viable de lactobacilos y coliformes (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 2004). Se determinaron los promedios y los coeficientes de variación de cada variable.

México artisan cheese makers process 2000 to 10000 L of milk d^{-1} ; in Veracruz, 56 % of milk production is used to produce cheese. Most whey is wasted and poured into water bodies or on the soil. Whey has not been considered as a useful by-product due mainly to its high water content and fast decomposition. On this account, fresh whey is not much used for feeding calves.

Various studies have been conducted to find the less costly method to dispose of whey, identify new options of use, prevent the potential loss of valuable nutrients and reduce pollution (González-Martínez *et al.*, 2002). An option may be to ferment it with lactobacilli (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005); in addition, the lactobacilli living in whey might serve as a probiotic food (Jelen, 2003). The use of lactobacilli in milk and substitutes of milk has been beneficial to feed calves since their early stage of growth, which is the hardest due to the high mortality rate from diarrheal diseases (Cruywagen *et al.*, 1996). But liquid whey of non pasteurized milk, fermented with lactobacilli and used to feed calves is an undocumented practice. An amount of milk could be replaced by fermented whey to feed calves, which could mean higher economic incomes for farmers. The hypothesis of the present study was that non pasteurized milk whey can be preserved by fermentation with lactobacilli and fermented whey can be used to feed calves, partially replacing milk. Therefore the objectives were to preserve whey with lactobacilli and determine the effect of replacing 25 % of milk consumption for fermented whey on the concentrate consumption (CC), body weight (BW) and average daily weight gain (ADG) in calves at weaning (90 d) and until six months old.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1. Preservation of whey by fermentation with lactobacilli

Chemical and bacteriological characterization of whey

Fresh whey was collected in nine small cheese plants of the municipalities of Cotaxtla and Medellín de Bravo (state of Veracruz, Mexico), every 7 d for two months (total, 72 samples). For a chemical characterization, the study focused on (wet basis): pH, crude protein, fat, total solids and a total viable count of lactobacilli and coliforms (Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 2004). Mean values and their variation coefficients for each variable were calculated.

Whey fermentation with lactic acid bacteria

Whey free from viable bacteria was used to prevent interference with the inoculum. To eliminate viable bacteria without damaging

Fermentación de suero de leche con bacterias lácticas

Se usó SL libre de bacterias viables para evitar la interferencia con el inóculo. Para eliminar las bacterias viables sin dañar las proteínas presentes en el SL (el daño proteico se manifestó por inicio de coagulación) se determinó la temperatura de pasteurización de SL mediante un ensayo: diseño experimental completamente al azar con cuatro temperaturas (57, 60, 63, 66 °C) y 2 tiempos de reacción (15 y 30 min), más un testigo (suero fresco) con tres repeticiones por tratamiento; se usaron tubos de ensaye con tapón de rosca en baño María. El tratamiento seleccionado fue el que mostró menor cuenta total viable (Log UFC mL⁻¹) de coliformes y lactobacilos, sin precipitación de proteínas (manifestada por coagulación del suero). Se hizo un análisis de varianza con los datos y las medias mínimo cuadráticas fueron comparadas con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En SL pasteurizado se evaluó el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, *L. reuteri* NRRL B-14171, *L. casei* NRRL B-1922, y *Bifidobacterium ssp*, a las 0, 12, 24, 48, 60, 72, 84 y 96 h; y su efecto sobre el pH, la cuenta total viable de lactobacilos en agar MRS y coliformes totales en agar McConkey. Se usaron tres tubos de ensaye con tapón de rosca por cada cepa de lactobacilos en cada hora de muestreo. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos (8×4; horas y lactobacilos) y tres unidades experimentales por tratamiento. Las medias mínimo cuadráticas fueron comparadas con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Preparación del suero de leche fermentado con lactobacilos

Debido a su mayor variabilidad se escogió el cultivo de *L. casei* como inóculo para fermentar el SL para los becerros. El cultivo contenía 1×10^7 UFC mL⁻¹, como mínimo; se tomaron 100 mL para inocular 900 mL de SL fresco en un vaso de precipitado (1 L) y se incubó 24 h a 39 °C en una estufa de cultivo. El SL fermentado (SLF) resultante se vertió en 9 L de suero fresco en una cubeta de 10 L, y se fermentó 24 h a 39 °C en una estufa de convección. Los 10 L de SLF se vertieron en 90 L de suero fresco repartidos en dos perolas de 50 L; se taparon y reposaron 24 h a temperatura ambiente. De los 100 L de SLF se tomaron 10 L y se repitió el paso anterior; los 90 L de SLF restantes se ofrecieron a los becerros experimentales. Los dos últimos pasos se repitieron diariamente durante 30 d. Después de los 30 d se reinició el procedimiento desde el primer paso para renovar la cepa de *L. casei*. Así, este método se repitió cada 30 d en los seis meses del experimento con los becerros.

Experimento 2. Alimentación de becerros con suero de leche fermentado

Este experimento fue realizado en una becerra para becerros Holstein×Cebú en jaulas individuales, con heno y agua a libertad, y un comedero para consumo de concentrado comercial (18 % proteína y 70 % NDT). El experimento duró desde el nacimiento de los becerros hasta los seis meses de edad y tuvo una fase de predestete y una de posdestete. Durante el predestete se determinó el efecto de la

the proteins present in whey manifested by whey clotting the pasteurization temperature of whey was determined through a trial consisting of a completely randomized experimental design with four temperatures (57, 60, 63, and 66 °C) and two heating times (15 and 30 min), plus a control (fresh whey) with three replicates per treatment. Test tubes with screw caps immersed in a water bath were used. The treatment selected showed the lowest viable total count (Log UFC mL⁻¹) of coliforms and lactobacilli, without protein precipitation (manifested by whey coagulation). An ANOVA was conducted with the data, and the least square means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$).

In pasteurized whey the populations of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, *L. reuteri* NRRL B-14171, *L. casei* NRRL B-1922, and *Bifidobacterium ssp* were evaluated at 0, 12, 24, 48, 60, 72, 84 and 96 h; as well as their effect on pH values, the total viable count of lactobacilli in MRS agar and total coliforms in McConkey agar. Three tubes were used for each strain of lactobacilli at each hour of sampling. The experimental design was completely random with a factorial arrangement of treatments (8×4; hours and lactobacilli) and three experimental units per treatment. The least square means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Preparation of whey fermented with lactobacilli

Due to its greater viability, *L. casei* was used as inoculum to ferment whey for calves. The culture contained a minimum of 1×10^7 UFC mL⁻¹; 100 mL were taken to inoculate 900 mL of fresh whey in a 1 L beaker which was incubated for 24 h at 39 °C in a culture incubator. The resulting fermented SL (SLF) was poured into 9 L of fresh whey in a 10 L bucket and allowed to ferment for 24 h at 39 °C in a convection oven. The 10 L of SLF were poured into 90 L of fresh whey distributed in two cans of 50 L; they were covered and let to stand for 24 h at room temperature. Of the 100 L of SLF 10 L were taken and the previous step was repeated; the remaining 90 L of SLF were given to the calves of the experiment. The last two steps were repeated daily for 30 d. After this period, the procedure was reinitiated from the first step to renew the *L. casei* strain. Thus, this method was repeated every 30 d during the six months of the experiment with calves.

Experiment 2. Feeding of calves with fermented whey

This experiment was conducted in a room for Holstein×Zebu calves in individual pens with hay and water *ad libitum* and fed with a commercial concentrate containing 18 % crude protein and 70 % TDN. The experiment started when the calves were born and lasted until they were six months old; it had a pre-weaning stage and one of post-weaning. During pre-weaning the effect of SLF addition or replacement on 24 calves from birth until weaning (90 d) was determined; distributed in four treatments (six calves per treatment, three females and three males): 1) Control, 4 L of fresh milk d⁻¹; 2) 4 L of fresh milk plus 2 L of whey d⁻¹; 3) 4 L of fresh milk plus 2 L of SLF d⁻¹; 4) 3 L of fresh milk plus 3 L of SLF d⁻¹. In treatments 2, 3 and 4 the amount of whey increased by 1 L each month. In the

adición o sustitución de SLF en 24 becerros desde el nacimiento hasta el destete (90 d), distribuidos en 4 tratamientos (6 becerros/tratamiento, 3 hembras y 3 machos): 1) Testigo, 4 L leche fresca d^{-1} ; 2) 4 L leche fresca más 2 L SL d^{-1} ; 3) 4 L leche fresca más 2 L SLF d^{-1} ; 4) 3 L leche fresca más 3 L SLF d^{-1} . En los tratamientos 2, 3 y 4 cada mes aumentó la cantidad de SL en 1 L: en el tercer mes los becerros de los tratamientos 2 y 3 consumían 4 L de SL y los del tratamiento 4, 5 L de SLF.

Cada día se recolectó SL de la quesería El Mangal (Medellín, Veracruz, México), donde se procesaba la leche de las vacas madres de los becerros en el estudio para uniformizar la variación en composición química. El SL se ofreció fresco a becerros del tratamiento 2, y se fermentó, como ya se describió, para los becerros de los tratamientos 3 y 4. Las variables fueron: consumo diario de alimento concentrado (CC); peso corporal cada 15 d (PC) y ganancia diaria de peso (GDP).

En la fase posdestete se suspendió el suministro de leche y continuaron los mismos tratamientos los siguientes 90 d (3 a 6 meses de edad). Se fijó el consumo de concentrado 1 kg d^{-1} , pasto verde picado o ensilaje de sorgo y pastoreo, y agua a libertad. La oferta de SL aumentó en 1 L por mes: a los 6 meses los becerros de los tratamientos 2 y 3 consumieron 7 L de suero d^{-1} y los del tratamiento 4, 8 L de suero d^{-1} . Las variables fueron: PC cada 15 d y GDP. El diseño experimental fue completamente al azar y el modelo estadístico incluyó la interacción edad*tratamiento. Para obtener las medias mínimo cuadráticas, se usó el modelo MIXED de SAS para medidas repetidas, utilizando como covariable al peso al nacer, tratamiento como efecto fijo y becerro (edad) como efecto aleatorio (Wang y Goonewardene, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1

Caracterización química y microbiológica de suero de leche

El resultado de los análisis (Cuadro 1) indica que la acidez, pH, proteína, grasa, y sólidos totales presentan coeficientes de variación de 13 a 48 %, y que la carga microbiana por coliformes es elevada. El pH de 5.6 es característico de SL dulce proveniente del procesamiento con renina, ya que el SL ácido resultante de la producción de queso tipo cottage tiene $\text{pH} < 5.1$. El alto contenido de coliformes se debe a que la manufactura del queso en esta región de Veracruz se realiza con leche sin pasteurizar, y que la ordeña se efectúa en condiciones poco higiénicas, con el apoyo del becerro y sin cadena fría. Los contenidos de proteína, grasa, y sólidos totales son similares a los reportados por Pintado (2001), quien coincide en que los SL son significativamente diferentes en su composición química debido principalmente a las variaciones en la fuente, el tipo de queso, así como las prácticas de procesamiento. El

third month calves of treatments 2 and 3 consumed 4 L of whey and those of treatment 4, five liters of SLF.

Whey from the cheese plant *El Mangal* (Medellín, Veracruz, Mexico) was collected daily, and the milk of the calves' mothers from the present study was processed to homogenize the chemical composition. Whey was given fresh to calves of treatment 2 and was fermented, as described above, for the calves of treatments 3 and 4. The variables were daily consumption of concentrated food (CC); body weight every 15 days (BW) and average daily weight gain (ADG).

In the post-weaning stage, milk supply was suspended, and the same treatments continued over the next 90 d (3 to 6 months old). The use of concentrate (1 kg d^{-1}) was set, as well as chopped green grass or sorghum silage and grazing, and water at will. The whey offer increased 1 L per month; at six months old the calves of treatments 2 and 3 consumed 7 L of whey d^{-1} and those of treatment 4, 8 L of whey d^{-1} . The variables were: BW every 15 d and ADG. The experimental design was set totally at random and the statistical model included the age*treatment interaction. To obtain the least squares means the SAS MIXED model was used for repeated measures, using as covariable the birth weight, the treatment as a fixed effect and calf (age) as random effect (Wang and Goonewardene, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

Experiment 1

Chemical and microbiological characterization of whey

The results of the analysis (Table 1) indicate that acidity, pH, protein, fat, and total solids had variation coefficients of 13 to 48 %, and that the microbial load for coliforms was high. The pH of 5.6 is characteristic of sweet whey produced by rennet coagulation, since acid whey results from the production of cottage cheese and has $\text{pH} < 5.1$. The high content of coliforms is attributed to the typical unsanitary manufacturing practices of cheese in this region of Veracruz, which includes non-pasteurized milk, and milking is carried out under less than hygienic conditions, with the suckling of the calf and without cold chain. The contents of protein, fat and total solids are similar to those reported by Pintado (2001), who agrees that wheys are significantly different in their chemical composition due mainly to variations of source, type of cheese, as well as processing practices. The water content of whey is usually high (94 %), which favors the growth of microorganisms like fungi, yeasts, lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae*. It is unknown whether this great variation in the content of nutrients – though relative as it only represents 6% of whey –, could influence the daily consumption of nutrients, and thus the growth of calves fed with whey.

Cuadro 1. Caracterización química y microbiológica del suero de leche (en base húmeda)[†].**Table 1. Chemical and microbiological characterization of whey (on wet basis)[†].**

Variable	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación, %
Acidez, %	2.14	0.46	21.32
pH	5.6	1.10	19.64
Proteína, %	2.19	0.52	23.74
Grasa, %	0.46	0.22	48.35
Sólidos totales, %	7.09	0.92	13.02
Log UFC mL ⁻¹ de coliformes	3.3×10 ⁶	4.4×10 ²	74.87

[†] n=72 observaciones resultado de nueve queserías muestreadas ocho veces durante dos meses ♦n=72 observations resulting from obtaining samples in nine cheese plants eight times for two months,

contenido de humedad del SL es usualmente alto (94 %), lo que favorece el crecimiento de microorganismos como hongos, levaduras, bacterias ácido lácticas y *Enterobacteriaceae*. Se desconoce si esta gran variación en el contenido de nutrientes, aunque relativa porque sólo representa 6 % del SL, pudiera influir en el consumo diario de nutrientes, y por tanto, en el desarrollo de becerros alimentados con SL.

Fermentación de suero de leche con bacterias lácticas

La temperatura de 63 °C a 15 min eliminó la cuenta total de coliformes, y disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) la cuenta viable para lactobacilos a 1 log UFC mL⁻¹ (Figura 1). El incremento de temperatura sobre 63 °C provocó la precipitación de las proteínas manifestada por coagulación del suero.

Después de pasteurizar el suero de leche a 63 °C por 15 min, se efectuó la fermentación de cuatro cepas de lactobacilos: *L. acidophilus* (NRRL B-4495), *L. casei* (NRRL-B1922), *L. reuteri* NRRL (B-14171) y *Bifidobacterium spp.* En la Figura 2 se muestra el crecimiento de las cuatro cepas, todas similares entre sí, las cuales logran su máximo crecimiento entre 18 y 36 h (2×10^7 ufc mL⁻¹). A las 48 h la cuenta de lactobacilos (4×10^6 ufc mL⁻¹) disminuyó ($p \leq 0.05$), y a las 72 h el crecimiento de las cepas inoculadas decreció drásticamente. La cuenta total viable de lactobacilos no debe ser menor de 10^6 para que un producto sea considerado como probiótico; por tanto, el SL sería un buen vehículo de probióticos para la alimentación de rumiantes.

En la Figura 3 se describen los cambios en pH en el SL durante la fermentación con cuatro cepas de lactobacilos y, además, cómo estos cambios en el pH influyen en la disminución de la cuenta total viable de coliformes.

Whey fermentation with lactic bacteria

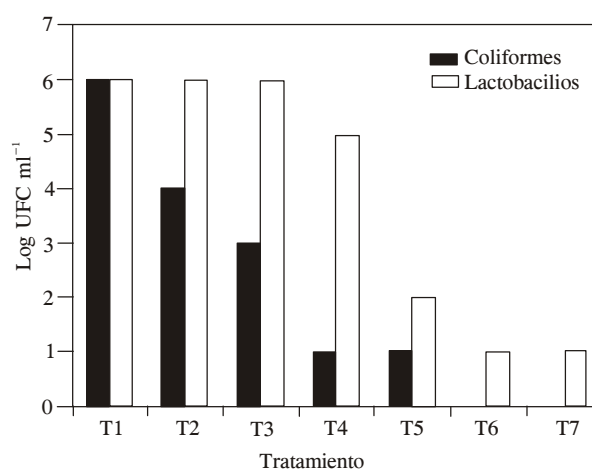
Pasteurization at 63 °C for 15 min eliminated the total coliform population and significantly reduced ($p \leq 0.05$) the viable count of lactobacilli to 1 log UFC mL⁻¹. Heat treatments above 63°C caused the precipitation of proteins that manifested as whey clotting.

After pasteurizing whey at 63 °C for 15 min, the fermentation of four strains of lactobacilli was performed: *L. acidophilus* (NRRL B-4495), *L. casei* (NRRL-B1922), *L. reuteri* NRRL (B-14171) and *Bifidobacterium spp.* In Figure 1 it is show the growth of the four strains and all of them were similar to each other. All strains reached their maximum growth after 18 to 36 h (2×10^7 ufc mL⁻¹). After 48 h the count of lactobacilli (4×10^6 ufc mL⁻¹) decreased ($p \leq 0.05$), and after 72 h the growth of the inoculated strains dropped drastically. The total viable count of lactobacilli should not be less than 10^6 for a product to be considered a probiotic; therefore whey would be a good vehicle of probiotic cultures for feeding ruminants.

In Figure 2 it is shown the pH changes in whey during fermentation with four strains of lactobacilli and also the way these pH changes have an influence on the total viable count drop of coliforms.

Experiment 2

The total consumption of milk was 360 L for calves in treatments 1, 2 and 3, and 300 L for those under



T1, suero fresco; T2, 57 °C 15 min; T3, 57 °C 30 min; T4, 60 °C 15 min; T5, 60 °C 30 min; T6, 63 °C 15 min; T7, 63 °C 30 min.

Figura 1. Efecto de los tratamientos de pasteurización al suero de leche sobre la cuenta total viable de coliformes y lactobacilos.

Figure 1. Effect of whey pasteurization treatments on the viable total count of coliforms and lactobacilli.

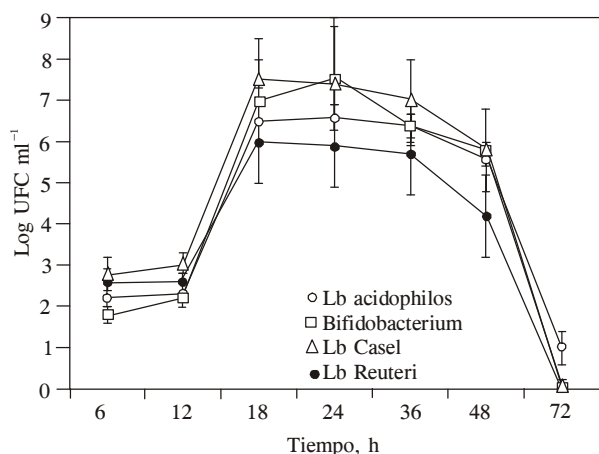


Figura 2. Crecimiento de lactobacilos en suero de leche.
Figure 2. Lactobacilli growth in whey.

Experimento 2

El consumo de leche total fue 360 L para los becerros en los tratamientos 1, 2 y 3, y 300 L para los del tratamiento 4 hasta el destete. Los becerros del tratamiento 4 consumieron 60 L de leche menos que los de los otros tratamientos. Si el precio de 1 L de leche es \$ 3.70 (pesos mexicanos; Compañía NESTLÉ, Coatepec, Veracruz), lo anterior significa un ahorro de \$ 222.00 por becerro a los 3 meses de edad, que representa 17 % del costo por concepto de leche en la alimentación del becerro. No tuvo costo adicional el sustituir leche por SL, ya que no fue difícil conseguir el SL sin costo.

La disponibilidad del SL excede su consumo por los becerros. La fermentación con lactobacilos, como en el presente experimento, permite preservar 24 h al SL y ofrecerlo a los becerros previa adaptación.

En el Cuadro 2 se muestra la cantidad de SL y SLF ofrecida a los becerros durante el experimento. Considerando que el PC promedio de los becerros fue 140 kg a los seis meses de edad, el consumo de SLF en becerros del T4 representó 5 % de su PC, aunque la cantidad consumida en base seca sólo fue 0.5 % de su PC.

Durante el estudio no se observaron diarreas o rechazo que indicara exceso en el consumo de SL o SLF. Generalmente los sustitutos de leche se ofrecen, en base seca, de 1.25 a 1.75 % del PC (Bartlett *et al.*, 2006).

Llama la atención el consumo de SL o SLF respecto al CC (Cuadro 3). Desde los 30 d de edad, cuando se empezó a ofrecer el SL o el SLF, se manifestó el efecto de supresión del CC como se observa a los 60 d en los T2 y T3 con relación al T1. Esta reducción de 40 % en el CC se mantuvo hasta el destete. El ahorro

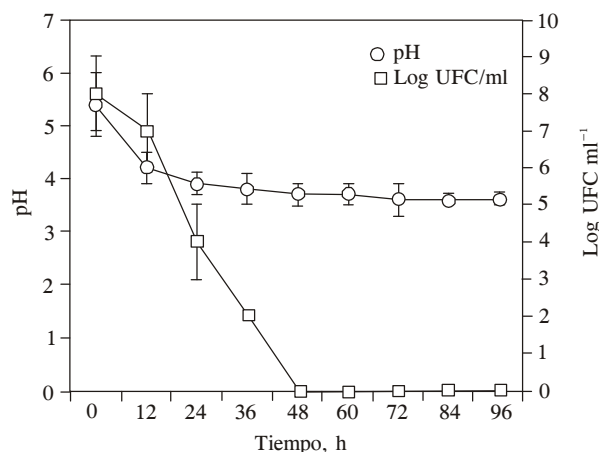


Figura 3. Influencia del pH en el crecimiento de coliformes totales (log ufc mL⁻¹) en suero de leche fermentado con lactobacilos.

Figure 3. Influence of pH on the growth of total coliforms (log ufc mL⁻¹) in fermented whey.

treatment 4 until weaning. Calves on treatment 4 consumed 60 L of milk less than those of the other treatments. This means saving 222 pesos per calf at three months of age, accounting for 17% of the cost of milk to feed these calves. This estimate is based on the fact that at the time of this study, 1 L of milk was 3.70 Mexican pesos (Compañía NESTLÉ, Coatepec, Veracruz). There was no additional cost when using whey instead of milk, as it was not difficult to obtain cost-free whey.

The availability of whey exceeds its consumption by calves. Fermentation with lactobacilli, like the one in the present experiment, enables to preserve whey for 24 h and give it to calves with previous adaptation.

In Table 2 it is shown the amount of whey and fermented whey given to calves during the experiment. Considering that the average BW of calves was 140 kg at six months of age, the consumption of SLF in T4 calves represented 5% of their BW, though the amount consumed on dry matter basis amounted only to 0.5 % of their BW.

Throughout the study no diarrheas or rejections were observed that would suggest an excess in the consumption of either whey or fermented whey. Usually, milk substitutes are given on dry matter basis, from 1.25 to 1.75 % of BW (Bartlett *et al.*, 2006).

The consumption of whey or fermented whey in relation to CC (Table 3) is quite striking. Since 30 d of age, when whey or SLF began to be offered, the suppression effect of CC appeared, as observed at 60 d in T2 and T3 compared to T1. This 40 % reduction in CC continued until weaning. Saving 30 kg of concentrate, at a price of 5.00 Mexican pesos per

Cuadro 2. Consumo de suero de leche fresco y fermentado (L) por los becerros durante el período de estudio.**Table 2. Consumption of fresh and fermented whey (L) by calves during the study period.**

Edad, d	Tratamiento			
	1	2	3	4
90	0	150	150	210
180	0	450	450	540
Total	0	600	600	750

en 30 kg de concentrado considerando el precio a \$5.00 el kg (concentrado comercial Fortachón, Veracruz), representa, por becerro, un ahorro de \$150.00 hasta el destete. El CC fue similar entre becerros de T4 y de T1 (testigo), pero fue mayor respecto a los becerros de T2 y T3. Esta diferencia probablemente se debió a un menor consumo de leche (T4) que los becerros compensaron con concentrado, dado que el consumo de SLF no fue suficiente para compensar los nutrientes de la leche. Los becerros en T4 no consumieron 30 kg menos de concentrado que no se tradujo en un beneficio económico, el cual sí ocurrió por el menor consumo de 60 L de leche. Las tasas de CC para los becerros en T1, T2, T3, y T4 fueron 1.32, 0.65, 0.62, y 1.17 % del PC. El consumo de heno, leche o SL fresco o fermentado permitió completar el 1.5 % establecido por el Nutrient Requirement of Dairy Cattle (National Research Council, 2001) y sugerido por Blome *et al.* (2003).

En la literatura revisada no se encontró información acerca de depresión en el CC en becerros o en cerdos debido a la ingestión de SL o SLF (Lammers *et al.*, 1996; Ratcliffe *et al.*, 1986). Es interesante notar que la depresión del CC en los becerros de T2 y T3 y la sustitución de 1 L de leche por SLF en el T4, no tuvo un efecto negativo sobre el peso corporal (PC). En el Cuadro 4 se manifiesta un PC similar ($p \geq 0.05$) al inicio del estudio y en las edades tempranas hasta el destete (90 d de edad); esta tendencia se mantuvo hasta los 180 d de edad. En la fase predestete para los becerros de T2 y T3, el comportamiento en PC se puede explicar por los consumos de SL y SLF; para T1 y T4 sería por un mayor CC. Las diferencias entre usar SL o SLF serían de operación ya que el SL debe usarse inmediatamente, y el SLF puede utilizarse hasta 24 h después, permitiendo un mayor margen de manejo.

Durante la fase postdestete se esperaba que los becerros que consumían SL o SLF tuvieran un mejor PC que los de T1, pero no fue así. No se midió el consumo de forraje ni el hábito de pastoreo. Se propone que los becerros que consumían suero pudieron haber

Cuadro 3. Consumo de alimento concentrado comercial (kg) para becerros hasta el destete (90 d).**Table 3. Consumption of commercial concentrated food (kg) by calves until weaning (90 d).**

Edad, d	Tratamiento				EEM
	1	2	3	4	
30	4.98 a	3.26 a	3.44 a	4.21 a	0.656
60	26.95 a	11.86 b	11.40 b	23.88 a	1.967
90	48.14 a	31.91 b	36.20 b	47.36 a	3.436
Total	80.06 a	47.03 b	51.05 b	75.46 a	4.487
Destete					
6 meses	170.06 a	137.03 b	141.05 b	165.46 a	4.487

a,b Medias con distinta literal en una hilera son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦a,b Means with a different letter in a row are significantly different ($p \leq 0.05$).

kilogram (concentrate, *Fortachón* brand, Veracruz), represents a 150 pesos saving per calf until weaning. The CC was similar among calves under T4 and T1 (control), but higher compared to T2 and T3 calves. This difference was probably due to a smaller consumption of milk (T4) that calves compensated with concentrate, since the consumption of SLF was not sufficient to make up for milk nutrients. Calves under T4 did not consume 30 kg less of concentrate which in fact was not economically beneficial, yet the lowest consumption of 60 L of milk was less expensive. The CC rates for calves under T1, T2, T3, and T4 were 1.32, 0.65, 0.62, and 1.17 % of BW. The intake of hay, milk or fresh or fermented whey allowed to complete the 1.5 % set by the Nutrient Requirement of Dairy Cattle (National Research Council, 2001) and suggested by Blome *et al.* (2003).

To the best of our knowledge, there is no information on the drop of CC in calves or pigs due to the ingestion of whey or fermented whey (Lammers *et al.*, 1996; Ratcliffe *et al.*, 1986). It is worth noting that the CC drop in T2 and T3 calves and the replacement of 1 L of milk for SLF in T4 had no adverse effect on body weight (BW). In Table 4 it is shown a BW ($p \geq 0.05$) similar to that recorded at the beginning of the study and in calves' early ages until weaning (90 d of age); this trend remained until 180 d of age. In the pre-weaning stage for T2 and T3 calves, the BW performance can be explained by the consumption of whey and fermented whey; for T1 and T4, it could be due to a higher amount of CC. The differences between the use of whey and fermented whey are of operation since whey must be applied at once while fermented whey can be used up to 24 h after preparation, allowing a greater margin of management.

During the post-weaning stage, the calves that had whey or fermented whey were expected to have a better

Cuadro 4. Peso corporal (kg) por mes de los becerros en los cuatro tratamientos.**Table 4. Body weight (kg) of calves per month under the four treatments**

Edad, d	Tratamiento				EEM
	1	2	3	4	
Nacer	35.26	32.58	38.01	30.73	3.684
30	48.21	42.93	51.63	46.22	5.092
90	90.64	82.31	85.28	88.72	5.341
180	136.86	142.60	134.65	139.52	5.321

No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos.

sustituido forraje por suero, suponiendo que si en la fase predestete sustituyeron concentrado por suero, en la fase posdestete pudieron haber sustituido forraje por suero. Además, que los becerros pastoreaban sólo para cubrir las necesidades de crecimiento que el sistema de manejo les permitía.

Las GDP se consideran aceptables, superiores a 500 g d^{-1} (Cuadro 5), y comparables a los becerros que consumieron sustituto de leche con 18 % de proteína a 1.75 % del PC (Barlett *et al.*, 2006). Timmerman *et al.* (2005) utilizaron lactobacilos como probióticos en becerros durante las primeras ocho semanas de vida y obtuvieron GDP similares a las del presente estudio, y sin diferencia entre el grupo testigo y el que consumía probióticos. Pero los becerros sin probiótico requirieron más tratamientos terapéuticos contra diarreas y neumonías.

Para las condiciones de manejo posdestete de los becerros donde el CC se restringe (máximo, 1 kg d^{-1}) y libre pastoreo, pudiera recomendarse el uso del SL o SLF cuando no hay suficiente disponibilidad de forraje en los potreros, como sucede en la época de secas, o cuando el pasto sea de baja calidad para los becerros como sucede en la segunda mitad de la época de lluvias, o cuando se requiera incrementar la carga animal sin sobrepastoreo de los potreros. Las GDP obtenidas en el presente estudio permitirían producir becerros al año con un PC de 240 kg, y becerras con 340 kg a los 18 meses de edad.

CONCLUSIONES

Al inocular el suero de leche con lactobacilos se prolonga su estabilidad aeróbica y potenciala temperatura ambiente hasta por 24 h.

En la fase predestete, el SL o el SLF ahorra 40 % del CC sin afectar la GDP. Además, se puede sustituir 1 L de leche por 3 L de SLF sin cambiar la GDP, mientras que el consumo de SL o SLF no mejora la GDP.

Cuadro 5. Ganancias diarias de peso acumuladas (g) del nacimiento a la edad, por tratamiento.**Table 5. Accumulated daily weight gains (g) from birth to a certain age per treatment**

Período	Tratamiento				EEM
	1	2	3	4	
Nacimiento-30 d	432	345	454	516	47.10
Nacimiento-90 d	615	553	525	644	37.21
Nacimiento-180 d	564	611	537	604	25.35

BW than those of T1, but it was not so. Fodder consumption was not measured nor the grazing habit. The assumption posed here is that the calves consuming whey may have replaced fodder for whey, assuming that if at pre-weaning they used whey instead of concentrate, during the post-weaning stage they may have used whey instead of fodder. Additionally, calves grazed only to meet the growth requirements that the management system allowed them.

The ADGs are considered acceptable, above 500 g d^{-1} (Table 5), and comparable to the calves that consumed milk substitute with 18 % of crude protein at 1.75 % of BW (Barlett *et al.*, 2006). Timmerman *et al.* (2005) used lactobacilli as probiotics in calves during the first eight weeks of life and obtained ADG similar to those of the present study, and with no difference between the control group and the group consuming probiotics. However, the calves without probiotics required more therapeutic treatments against diarrheas and pneumonias.

For the post-weaning management conditions of calves, where CC is restricted (1 kg d^{-1} at the most) as well as free grazing, the recommendation could be to use whey or fermented whey when the availability of fodder in the fields is insufficient, as it occurs in the dry season or when grass for calves is of poor quality (which occurs in the second half of the rainy season), or when the intention is to increase stocking rate without overgrazing the fields. The ADGs obtained in the present study would enable to raise male calves of 240 kg at 12 months old, as well as females of 340 kg at 18 months old.

CONCLUSIONS

By inoculating whey with lactobacilli its aerobic stability and potential probiotic function extend at room temperature up to 24 h.

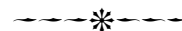
At preweaning, whey or fermented whey saves 40 % of CC without affecting ADG. In addition, it is possible to replace 1 L of milk for 3 L of fermented whey

No se detectaron diferencias entre SL o SLF respecto al comportamiento productivo de los becerros del nacimiento a los seis meses de edad. Por tanto, sería posible producir becerros Holstein×Cebú de 140 kg de peso a los seis meses de edad en crianza artificial en el sistema de lechería tropical.

LITERATURA CITADA

- Bartlett, K. S., F. K. McKeith, M. J. VandeHaar, G.E. Dahl, and J. K. Drackley. 2006. Growth and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein at two feeding rates. *J. Anim. Sci.* 84:1454-1467.
- Blome, R. M., J. K. Drackley, F. K. McKeith, M. F. Hudjens, and G. C. McCoy. 2003. Growth, nutrient utilization, and dairy composition of dairy cattle fed milk replacers containing different amount of protein. *J. Anim. Sci.* 81:1641-1655.
- Cruywagen, C. W., I. A. Jordaan, and L. Venter. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J. Dairy Sci.* 79:483-486.
- Gallardo-Escamilla, F. J., A. L. Kelly, C. M. Delahunty. 2005. Influence of starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.* 88:3745-3753.
- González-Martínez, C., M. Becerra, M. Cháfer, A. Albors, J. M. Carot, and A. Chiralt. 2002. Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. *Trends Food Sci. Technol.* 13:334-340.
- Jelen, P. 2003. Whey processing, utilization and products. In: Roginski, H., J. W. Fuquay, and P. F. Fox (eds). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK. pp: 2739-2745.
- Lammers, B. P., A. J. Heinrichs, and A. Aydin. 1996. The effect of whey concentrate or dried skim in milk replacers on calf performance and blood metabolites. *J. Dairy Sci.* 81:1940-1945.
- Lessard, M., and G. J. Brisson. 1987. Effect of a *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaning pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 67:509-516.
- Gandhi, D. N. 1989. Whey utilization for beverage production. *Indian Dairyman* 41(1):35-37.
- without altering ADG, while the consumption of whey or fermented whey does not favor ADG.
- No differences were detected between whey or fermented whey and the production performance of calves from birth to six months old. Therefore it would be possible to produce Holstein×Zebu calves of 140 kg at six months old with artificial rearing in the tropical dairy system.

End of the English version—



- Gilliland, S. E., B. B. Bruce, L. J. Bush, and T. E. Staley. 1980. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J. Dairy Sci.* 63:964-972.
- Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 2004. Barnes & Noble. 17th ed. Wehr, H.M., and J. F. Frank (eds). American Public Health Association. 570 p.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th rev. ed. National Academy Press. Washington, DC. pp:214-233.
- Ratcliffe, B., C. B. Cole, R. Fuller, and M. J. Newport. 1986. The effect of yoghurt and milk fermented with a strain of *Lactobacillus reuteri* on the performance and gastrointestinal flora of pigs weaned at two days of age. *Food Microbiol.* 3:203-211.
- Schingoethe, D. J. 1976. Feeding whey to ruminants. *FEEDSTUFFS*, August 2, 1976. pp:18-20.
- Timmerman, H. M., L. Mulder, H. Everts, D. C. van Espen, E. van der Wall, G. Klaassen, S. M. G. Rouwers, R. Hartemink, F. M. Rombouts, and A. C. Beynen. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88:2154-2165.
- Wang, Z. and L. A. Goonewardene. 2004. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can. J. Anim. Sci.* 84:1-11.
- Yang, S. T., and E. M. Silva. 1995. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy Sci.* 78:2541-2562.