



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

Unidad Iztapalapa

**EVALUACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* “Florida 1” COMO
PROBIÓTICO PARA CONSUMO ANIMAL**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

Q.B.P. JUAN CARLOS ACOSTA PULIDO

**TUTOR: DR. CARLOS VÁZQUEZ SALINAS.
ASESOR: M en C. ELSA IRMA QUIÑONES.**

México, D.F. JULIO 2009

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

*Por el regalo de la vida y por poner siempre en mi camino,
a gente excelente que son parte fundamental para lograr
miles de cosas.*

Gracias Señor....

A Elivier Pulido V^{III} y Agustín Acosta M.

Por guiarme y ser lo mejor en mi vida.

Gracias Mamá y Papá....

*A Ácidos Orgánicos S.A de C.V Ing. Saul Toral, Ing. Carlos Vázquez y M en C.
Larissa Ventura.*

Por creer en nuestro proyecto y darnos toda la facilidad para llevarlo a cabo.

A QFB. Angélica Gómez y QBP. Roxana Rodríguez.

Por ser excelentes personas capaces de impulsar y compartir conocimientos.

A M en C. Elsa Irma Quiñones, Dr. Carlos Vazquez y M en C. Xochitl Nochebuena

Por ser excelentes profesores y por todo su apoyo y paciencia en todo momento....

A Q.A Adriana Pescador

Por su gran apoyo, gran amistad y ser parte de este logro...

A Q.B.P Lizeldi V, Q.B.P. Erika G y Q.B.P. Miriam D.

Por su valiosa ayuda y apoyo en todo momento

GRACIAS....

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen.....	vi
I.-Introducción.....	1
I.1.-Antecedentes.....	1
I.2.-Historia de los probióticos.....	3
I.3.-Características de un probiótico.....	4
I.3.1.Mecanismos de acción.....	5
I.3.2.Beneficios de los prebióticos en el sistema inmune.....	6
I.3.3.Acción antitumoral.....	6
I.3.4.Alergias.....	7
I.3.5.Diarreas.....	8
I.3.6.Actividad metabólica.....	8
I.4.Levadura como probiótico.....	9
II. Justificación.....	13
III.1.Objetivo.....	14
III.2.Objetivo general.....	14
IV.Material y Métodos.....	15
IV.1.Tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> (cepa ATCC 9763 y Florida 1 a diferentes pHs.....	15
IV.1.1.Sensibilidad a diferentes pHs.....	16

IV.1.2.-Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable.	16
IV.2.Tolerancia de <i>S.cerevisiae</i> (Cepa ATCC 9763 Y Florida 1) a diferentes concentraciones de bilis.....	17
IV.2.1. Sensibilidad a diferentes concentraciones de TDCA.....	17
IV.2.2. Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable.	17
IV.3. Actividad antimicrobiana de <i>S.cerevisiae</i>	18
IV.3.1.Obtención del sobrenadante de cepas de <i>S.cerevisiae</i>	18
IV.3.2Prueba de Antagonismo	19
IV.4. Ensayo de adherencia.....	19
V. Resultados y Discusión.....	20
V.1.Tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> (cepa ATCC 9763 y Florida 1 a diferentes pHs.....	20
V.1.1.Sensibilidad a diferentes pHs.....	20
V.1.2.-Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable.	22
V.2.Tolerancia de <i>S.cerevisiae</i> (Cepa ATCC 9763 Y Florida 1) a diferentes concentraciones de bilis.....	24
V.2.1. Sensibilidad a diferentes concentraciones de TDCA.....	24
V.2.2. Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable.	26
V.3. Prueba de antagonismo.....	29
V.4. Prueba de adherencia.....	31
VI.-Conclusiones.....	33

VII Bibliografía.....34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Principales probióticos.....	3
Cuadro 2.- Cepas testigos utilizadas para el estudio.....	15
Cuadro 3.- Diferentes pHs y comparativo de cepa <i>S.cerevisiae</i> Florida 1 y ATCC 9763	21
Cuadro 4.- Prueba de viabilidad evaluada para cepa probadas...	22
Cuadro 5.- Resultados de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable.....	23
Cuadro 6.- Prueba de sobrevivencia. Evaluación cualitativa.....	24
Cuadro 7.- Resultados obtenidos de la evaluación de sobrevivencia comparativos entre <i>S.cerevisiae</i> (cepa Florida 1 y ATCC 9763).....	26
Cuadro 8. Aglutinación en cepas de <i>S.cerevisiae</i> sobre algunos patógenos evaluados.....	31

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Barreras frente a la infección.....	2
Figura 2 .- <i>S. cerevisiae</i>	10
Figura 3 y 4. - Figura 2 y 3. Prueba cualitativa. Crecimiento en placas de YPG a pH 2.92. Panel A crecimiento de la cepa de Florida 1. Panel B crecimiento de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763.....	22
Figura 5 y 6.- Prueba cualitativa comparativo de crecimiento Florida 1 (A) y ATCC 9763 (B) a una concentración de TCDA 0.05%	25
Figura 7 y 8.- Prueba cualitativa. Crecimiento cepa ATCC 9763 A y B concentración 0.2 % TDCA.....	25
Figura 9.- Prueba de inhibición. Césped <i>E.coli</i> . Como control positivo <i>L.casei</i> (con inhibición) Cepa Florida 1 y ATCC9763 sin inhibición.....	28
Figura 10.- Prueba de inhibición. Césped <i>S.tiphy</i> . Como control positivo <i>L.casei</i> (con inhibición) Cepa Florida 1 y ATCC9763 sin inhibición.....	27
Figura 14.- Testigo negativo.....	29

RESUMEN

Sacharomyces cerevisiae "Florida 1" es una levadura que se ha comercializado para su uso como consumo animal. Se ha observado que tiene un efecto benéfico en la salud del hospedero. Estudios realizados han demostrado que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* les proporcionan a los animales una mayor resistencia contra diversos tipos de microorganismos patógenos y se favorecen aquellos que están en desarrollo. Por lo cual se le ha considerado como un probiótico. En nuestro estudio se evaluó *in Vitro* la capacidad de la cepa "Florida 1" y cepa ATCC 9763 de poder actuar como un probiótico, en donde se analizó la resistencia a pH 2.92, 3.12, 3.3, 4.17, 4.86, 5.5 y 5.86. Obteniéndose así la mayor cantidad de UFC/ ml en ambas cepas a pH de 3.64. Prueba de resistencia a sales biliares a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 1.0 y 2.0% en la cual se obtuvo sobrevivencia hasta 0.3 % de de TCDA. Se analizó la capacidad de producción de sustancias inhibitoras de microorganismos por el método de difusión en placa y prueba de adherencia por medio de sedimentación y microscopía óptica para las cuales se utilizaron cuatro patógenos (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 y *Staphylococcus aureus*) usando como testigo positivo cepa de *Lactobacillus spp*, aislada de fruta y probada previamente como probiótico para prueba de difusión en placa . Del cual no se observó algún efecto sobre la inhibición de estos microorganismos, ni adherencia en las pruebas de sedimentación de las cepas de *S. cerevisiae*

I.-INTRODUCCIÓN

I.I.-ANTECEDENTES

Desde la antigüedad los microorganismos se han utilizado para producir alimentos de esta manera han formado parte integral de la dieta del hombre y animales, a estos alimentos se les han denominado biopreparaciones debido a que son elaborados a base de cultivos microbianos cuya función es estimular la microbiota gastrointestinal (Rubio *et al.*, 2008). Investigaciones realizadas en nutrición animal indican que se pueden prevenir desordenes entéricos mediante dietas funcionales (Salminen *et al.*, 1998).

En el tracto gastrointestinal se encuentran normalmente un gran número de microorganismos comensales y patógenos; se calcula que aproximadamente la concentración en rumiantes es de 10^{10} cel/ml, 10^6 cel/ml de protozoarios y 10^4 cel/ml de hongos, sin embargo, cuando se incrementa la cantidad de microorganismos patógenos pueden producir alteraciones de la salud y muerte (Camacho, 1999; Jouany, 1994).

El 80% de las enfermedades entéricas que afectan al ganado porcino son producidas por microorganismos que forman parte del tracto gastrointestinal, estas pueden ser combatidas gracias a la administración de probióticos (Agarwal *et al.*, 2000)

Las funciones digestivas, la microbiota intestinal, la barrera de la mucosa y la respuesta inmune son fundamentales en la prevención de enfermedades entéricas en animales (Fig 1), (Oliveira and González, 2007). La causa principal de las pérdidas económicas en la industria porcina son las enfermedades entéricas, especialmente en lechones. El control

de estas enfermedades se basan en el uso de antibióticos agregados al alimento; no obstante, la práctica prolongada puede generar resistencia a ciertos tipos de bacterias patógenas (Lázaro *et al.*, 2007). Por otro lado, los efectos benéficos de algunos microorganismos de la microbiota intestinal se conocen desde hace más de 100 años. Debido a su heterogeneidad, agruparlos en un solo término fue difícil; así en 1974 surgió el término Probiótico en oposición al de antibiótico (Schrezenmeir and Vrese, 2001).

La FAO define a un probiótico como un microorganismo no patógeno resistente a la digestión, que llega al estómago e intestino en forma viable y que se ha probado científicamente que tiene un efecto promotor de la salud para el hospedero. Ejemplos de probióticos son bacterias de los géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterias*, *Enterococos*, *Streptococos* y algunas levaduras. Las acciones benéficas de estas sustancias se encuentran documentadas en múltiples referencias de la literatura mundial y los efectos han sido muy diversos (Amores *et al.*; 2004)

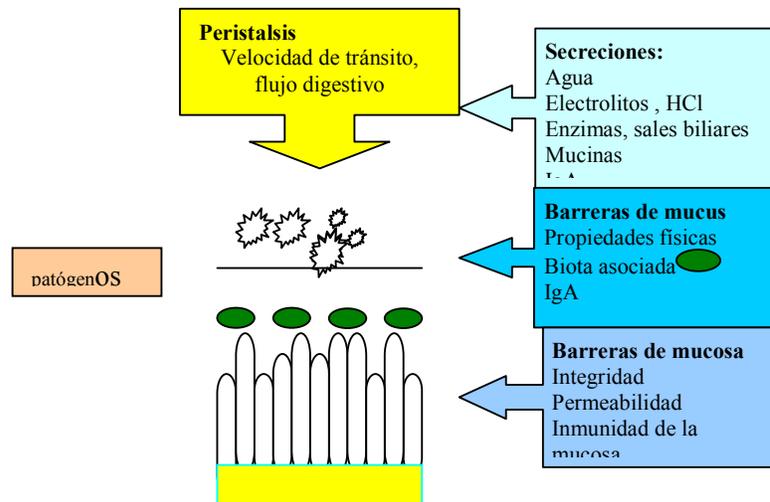


Fig 1: Barreras intestinales frente a la infección.

(Modificado de Olveira and González, 2007)

I.2.-Historia de los Probióticos

En el sistema digestivo se ha estimado que habitan cientos de especies de bacterias. Algunas de estas son llamadas bacterias benéficas, mientras que otras menos deseables son bacterias patógenas, productoras de enfermedades, que a menudo invaden ciertas partes de nuestro organismo (Amores *et al*; 2004).

Estas bacterias benéficas (Cuadro 1) o llamadas probióticos, son: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la biota microbiana en el intestino". Las cepas más utilizadas para estos fines son las bacterias ácido lácticas, dentro de ellas se destacan los lactobacilos y bifidobacterias. Para producir estos productos se emplean microorganismos de forma individual ó en forma de mezclas (Oliveira and González, 2007).

Cuadro 1. Principales probióticos

Género <i>Lactobacillus</i>	Género <i>Saccharomyces</i>	Género <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. kefirgranum</i> <i>Lb. helvetius</i> <i>Lb. delbrueckii sp.</i> <i>Bulgaricus</i> <i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. unisporus</i>	<i>Ln. latis</i> <i>Ln. mesentroides sp.</i> <i>Mesentroides</i> <i>Ln. mesentroides sp. Cremori</i> <i>Ln. mesentroides sp.</i> <i>Dextranicum</i>
	Género <i>Kluyveromyces</i>	Otros géneros

<i>Lb. casei</i>	<i>K. marxianus sp. Marxianus</i> <i>K. marxianus sp. lactis</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Lb. zeae</i>	Género <i>Lactococcus</i>	<i>Geotrichum candidum</i> Link
<i>Lb. plantarum</i>		Otras bacterias
<i>Lb. brevis</i>		<i>L. lactis sp. Lactis</i> <i>L. lactis sp. Cremoris</i> <i>L. lactis sp. Lactis biovar diacetylactis</i>
<i>Lb. buchneri</i>		
<i>Lb. fermentum</i>		
<i>Lb. kefir</i>		
<i>Lb. Parakefir</i>		

(Modificado de Olveira and González, 2007)

I.3.-Características de un probiótico

Un probiótico debe reunir las siguientes características:

Las cepas utilizadas en los probióticos deben tener una historia de no ser patógenas, especialmente para personas con inmunocompromiso, no ir asociadas con enfermedades como endocarditis infecciosa y/o trastornos gastrointestinales.

- No ser sensible a las enzimas proteolíticas.
- Ser capaces de sobrevivir el tránsito gástrico.
- Deben ser estables frente a ácidos y bilis, y no conjugarse con las sales biliares.
- Tener capacidad para adherirse a las superficies epiteliales.
- Sobrevivir en el ecosistema intestinal.
- Ser capaces de producir componentes antimicrobianos.
- Deben permanecer vivas y estables durante su empleo.
- Deben tener un mecanismo específico de adhesión al intestino humano.
- Deben ser capaces de un crecimiento rápido en las condiciones del ciego.

- Deben ser capaces de inmunoestimulación pero sin efectos proinflamatorios.

Los probióticos pueden también funcionar sintetizando ciertos compuestos o produciendo subproductos metabólicos que pueden tener una acción protectora o inducir efectos positivos (DeSimone *et al.*, 1991; Solis *et al.*, 1991).

I.3.1.-Mecanismo de acción

Los mecanismos de acción pueden ser de distintos tipos: un mecanismo directo con producción de sustancias antibacterianas o bien otro indirecto, a través de la estimulación de la respuesta inmune.

Los cambios que se puedan producir en la composición de la microbiota van a depender asimismo del número crítico de microorganismos del probiótico.

Según estudios realizados por Vanderhoof, (1998) el mecanismo de prevenir la acción de los patógenos puede realizarse de los siguientes modos:

I) algunos ácidos excretados por los microorganismos de los probióticos bajan el pH intestinal por debajo del nivel que toleran los patógenos.

II) efecto competitivo que puede ser mediado por la ocupación de los lugares de colonización y mejoría de los mecanismos nutricionales.

III) capacidad de secreción por parte de los lactobacilos y bacterias bifidas de los inhibidores naturales que pueden tener un amplio espectro de actividad como lactocinas, helveticinas, lactacinas, curvacinas, nicinas y bifidocinas.

I.3.2.-Beneficios de los probióticos en el sistema inmune

A principios de la década pasada se señaló la influencia de los Probióticos sobre la respuesta inmune. Es esencial que las BAL (Bacterias ácido-lácticas) sobrevivan después de atravesar el tracto gastrointestinal, para poder expresar así sus propiedades inmunomoduladoras (Marteau *et al.*, 1997).

En este sentido, se ha observado que ciertas cepas de BAL actúan sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada, producción de anticuerpos, activación funcional de macrófagos (Perdigón *et al.*, 1995); se ha podido demostrar además que algunas son capaces de prevenir infecciones entéricas, así como de ejercer una acción antitumoral al inhibir agentes químicos carcinogénicos (Nadathur *et al.*, 1995).

Con frecuencia se han citado en la bibliografía ciertas propiedades inmunomoduladoras de las BAL, aunque sigue sin comprenderse con exactitud cuales son los mecanismos implicados. Sin embargo, se ha descrito en modelos animales un efecto protector que ejercen las BAL frente a patógenos intracelulares, y que podría estar asociado con una activación del sistema reticuloendotelial (Condony *et al.*, 1988; Saloff, 1995).

I.3.3.-Acción antitumoral

Aunque todavía no se ha podido comprobar el mecanismo exacto de la acción antitumoral de los probióticos existe la hipótesis de un incremento de la

apoptosis o muerte celular programada de las células del intestino frente a un carcinógeno (Nadathur *et al.*,1995, Perdigon *et.al.*,1995).

Hirayama y Rafter, (2000) describieron las vías hipotéticas por las que las bacterias probióticas inducen su efecto en reacciones que tienen un papel determinante en las fases iniciales de la carcinogénesis de colon y el efecto de las enzimas fecales sobre el metabolismo de las sustancias carcinogénicas en el interior del intestino, la capacidad de las bacterias probióticas de evitar la absorción de mutágenos y carcinógenos en el intestino, y los efectos de los probióticos en la cinética de las células epiteliales del colon.

I.3.4.-Alergias

Es una patología en la que se inicia el estudio de los efectos de las BAL, sin embargo, hasta el momento, los resultados son controvertidos y no se conocen los mecanismos de acción.

Se ha observado en experimentos realizados en humanos en una población de 42 jóvenes y 56 adultos tras la ingestión de 200 gramos al día de yogur durante 1 año remisión de síntomas alérgicos de tipo nasal, en comparación con un grupo control. Sin embargo, se desconoce cuales podrían ser los mecanismos implicados, puesto que los autores no han encontrado diferencias significativas en los parámetros inmunológicos estudiados. (Trapp *et al.*, 1993).

I.3.5.-Diarreas

Se ha considerado el concepto de probióticos para el tratamiento de la diarrea aguda y crónica demostrando que algunos son muy efectivos, aportando ventajas costo beneficio en los tratamientos. Se ha observado que cuando se ingiere leche fermentada con *L. casei* y *L. acidophilus* durante 8 días antes de la inoculación con *Shigella sonnei* se produce un incremento en la supervivencia del animal de experimentación, así como un aumento de anticuerpos séricos contra la bacteria, lo que sugiere la protección del intestino frente al proceso infeccioso (Nader *et al.*, 1992).

El efecto de las Bifidobacterias en su paso por el intestino y los mecanismos por los que estimulan el sistema inmune han sido estudiados, pudiéndose comprobar que el consumo regular de leche fermentada puede prevenir la infección gracias a la acción de la IgA secretora que impide la absorción de antígenos por el epitelio de las mucosas, así como su entrada al interior del organismo y de este modo se evita el anclaje de microorganismos patógenos al epitelio intestinal (Robinson and Samona, 1992).

I.3.6.-Actividad metabólica

Los probióticos poseen diversas funciones, entre las que se encuentran aumentar la actividad fisiológica en el hígado, hidrólisis de las sales biliares las cuales se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico (St-Onge *et al.*, 2000; García, 2002), Los

mecanismos de acción propuestos para lograr esta respuesta de los probióticos explican la necesidad de su permanencia en el tracto gastrointestinal para ejercer su efecto. Se plantea que: **1)** pueden propiciar la formación de esteres de colesterol en el intestino favoreciendo su excreción (Agerholm *et al.*, 2000; Kiebling *et al.*, 2002), **2)** existe asimilación del compuesto por la bacteria (Gilliland *et al.*, 1985), **3)** la actividad de la hidrolasa de sales biliares (Lim *et al.*, 2004).

I.4.-LEVADURA COMO PROBIÓTICO

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular y es quizá la levadura más ampliamente comercializada. Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino entre otros, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Hasta antes del siglo XIX *S. cerevisiae* solo se le identificaba como la levadura de panadería. Sin embargo a lo largo del tiempo se le ha identificado como modelo biológico en la investigación: por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo; y por otro lado el hecho de que posee un ciclo de vida con una fase sexual (González and Valenzuela, 2003).

Las levaduras se han administrado a los animales en el alimento durante más de 100 años, ya sea en la forma de una masa fermentada producida en el rancho, subproductos de levaduras de cervecería o destilería, o productos comerciales elaborados a base de levaduras específicamente para la alimentación animal. Aun cuando esta práctica de utilizar las levaduras en los

alimentos pecuarios ha existido durante mucho tiempo, todavía no hay mucha difusión en la industria para utilizarlas, pero el uso de levaduras tiene grandes beneficios, ya que la levadura en si, proporciona vitaminas del complejo B, minerales, es una buena fuente de proteína y de aminoácidos. Aproximadamente el 40% del peso de la levadura seca consiste en proteína. La calidad de la proteína de la levadura es excelente, tratándose de una proteína de origen vegetal, y su calidad es equivalente a la soya, pues ambas son ricas en lisina (Aghdamshahriar *et. al.*, 2006; Peralta *et al.*, 2008).

Las levaduras son hongos microscópicos, o sea organismos unicelulares del reino vegetal, que suelen medir de 5 a 10 micras, se consideran como organismos anaeróbicos facultativos.

Durante la fase vegetativa, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre, posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de los dos células. Por muchos años se consideró que a diferencia de los hongos denominados filamentosos, *S. cerevisiae* era incapaz de formar hifas o filamentos y que su crecimiento vegetativo, a través de la gemación, únicamente resultaba en la formación de células esféricas denominadas levaduras, sin embargo en estudios anteriores se encontró que *Saccharomyces* puede formar pseudohifas (Gimeno *et al.*, 1992)



Fig 2.-*S.cerevisiae*
http://genome.ucsc.edu/images/S_cerevisiae.jpg

Ciertas características importantes observadas por Hubert y Jonas Thomas (1987) son: 1) No son patógenos ni tóxicos, 2) No se absorben en tracto digestivo 3) No dejan residuos 4) se utilizan en pequeñas cantidades 5) proliferan *in vivo* e *in vitro*, 6) promueven el crecimiento de bacterias celulolíticas 7) son estables a temperaturas elevadas 8) no causan mutación. Y sobre todo la adición de *S.cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram - en el contenido ruminal 1.6×10^4 a 2.0×10^5 UFC/ ml así como también incrementa el contenido de bacterias Gram - en heces de 1.1×10^4 vs 2.6×10^3 UFC / ml y estimula el crecimiento de bacterias amilolíticas a nivel ruminal. Las levaduras, son microorganismos que se ubican dentro del grupo que corresponden los probióticos ya que han demostrado ser capaces de participar en procesos de inhibición de la colonización de bacterias enteropatógenas entre otros atributos (Halomilton, 1996).

Según Dawson (1993), los probióticos son aditivos no nutritivos, los cuales contienen diferentes preparaciones de levaduras con efectos diversos sobre la actividad ruminal: Tasa de digestibilidad de los componentes de la dieta, porcentaje de degradabilidad del forraje, cambios en el patrón de fermentación ruminal, modificación del pH ruminal, cambios en el número de microorganismos, del rumen interacción bacterias- dieta (Arambel and Kent, 1990; Wohlt *et al.*, 1991; Wohlt *et al.*, 1998).

Los probióticos han sido señalados como posibles reemplazadores de los antibióticos (Lázaro *et al.*, 2007). Entre los criterios importantes considerados para seleccionar a un microorganismo como probiótico son debe sobrevivir y desarrollarse en tracto gastrointestinal así como presentar un efecto benéfico,

resistencias a las lisozimas, enzimas pancreáticas, pH bajos, ácidos orgánicos y sales biliares (Jin *et al.*, 1998)

II.-JUSTIFICACIÓN

Aun cuando esta práctica de utilizar las levaduras en los alimentos pecuarios ha existido durante mucho tiempo, todavía no hay mucha difusión en la industria para utilizarlas. El uso de levaduras tiene grandes beneficios, debido a la producción de metabolitos como vitaminas del complejo B, minerales, es una buena fuente de proteína y de aminoácidos. Aproximadamente el 40% del peso de la levadura seca consiste en proteína. La calidad de la proteína de la levadura es excelente, tratándose de una proteína de origen vegetal, y su calidad es equivalente a la soya, pues ambas son ricas en lisina.

Actualmente *S. cerevisiae* se vende como probiótico por la industria de la levadura, lo que hace que la empresa “La Florida” tenga interés en documentar que las cepas de *S. cerevisiae* Florida 1 puede actuar como probiótico si es ingerido por animales.

III.2.-OBJETIVO

- Establecer el potencial de la cepa Florida 1 de *S.cerevisiae* como posible probiótico para consumo animal.

III.3.-OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de diferentes pHs (2.9 a 5.86) en el crecimiento de *S.cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763.
- Estudiar la influencia de diferentes concentraciones (0.05 a 0.2%) del ácido taurodeoxicólico en el crecimiento de *S.cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763
- Observar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *S.cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763 sobre *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114.
- Investigar si las cepas *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114. tienen la capacidad de adherirse a la pared de *S. cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763

IV.-MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas para este trabajo fueron la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada por la empresa Ácidos Orgánicos S.A de C.V. y las cepas testigo mencionadas en el cuadro.

CUADRO 2.- Cepas testigo utilizadas para el estudio.

CEPA	ATCC o Fuente
<i>Lactobacillus casei</i>	Aislado
<i>E. coli</i> O157:H7	35150
<i>Listeria monocytogenes</i>	19114
<i>Salmonella</i>	6539
<i>S. cerevisiae</i> "Florida 1"	Ácidos Orgánicos
<i>S. cerevisiae</i>	9763

IV.1.-TOLERANCIA DE *S.cerevisiae* (Cepa ATCC 9763 y Florida 1) A

DIFERENTES pHs (Modificado de Colins, 1989)

IV.1.1.-Sensibilidad a diferentes pHs:

Cada cepa fue sembrada en caldo YPG (Yeast peptone glucose) (Yépez, 1995) posteriormente se sembraron en el medio YPG (Yépez, 1995) ajustado a: 2.92, 3.12, 3.3, 4.17, 4.86, 5.5, 5.86. Se incubó a 37 °C /48h y se registró el crecimiento en cada uno de los medios.

IV.1.2.-Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable:

Cada cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (Florida 1 y ATCC 9763), fue ajustada a una concentración 1.5×10^6 UFC/ml usando el nefelómetro de McFarland (tubo No. 5). A cada cultivo se le hicieron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6}

para cada concentración en medio de YPG (Yépez, 1995) a pH de 2.97, 3.11, 3.64 y 5.86 Se incubó a 35 °C durante 48 horas. Al final se realizó la cuenta de cada dilución, por cada cepa y pH tomando en cuenta aquellas placas que tuvieran entre 10 y 150 UFC/ml (NOM-111-SSA1-1994).

Para cada cepa se llevo a cabo prueba de viabilidad sin ajuste de pH en el medio YPG (Yépez, 1995) . (Cepa ATCC 9763 y Florida 1)

IV.2.-TOLERANCIA DE *S. cerevisiae* (Cepa ATCC 9763 y Florida 1) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BILIS (Modificado Perez *et al.*,2005)

IV.2.1. Sensibilidad a diferentes concentraciones de TDCA:

Cada cepa se sembró en gelosa YPG (Yépez, 1995) adicionado con ácido taurodeoxicólico (TDCA), en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, y 0.3, 0.5 y 2%. Se incubaron a 35 °C/ 48 horas y se observó el crecimiento en cada uno de las gelosas.

IV.2.2.- Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes concentraciones de sales biliares no.3 mediante cuenta viable:

Las cepas de *S. cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763, fueron ajustadas a 1.5×10^{-6} del nefelómetro de McFarland. (tubo no. 5) Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} usando los medios con concentraciones de 0.05 a 0.25% de sales biliares ajustado en medio YPG (Yépez, 1995) , se incubaron a 35°C durante 48 horas. Al final se verificó la cuenta de placas en donde se obtuvo la cuenta viable entre 10 y 150 UFC/ml (NOM-111-SSA1-1994).

**Para cada cepa se hizo cuenta viable en donde se realizaron los mismos pasos anteriormente mencionados sin sales biliares. El ensayo se hizo por triplicado.

IV.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *S. cerevisiae* (Modificado de Texeira *et al.*, 2006)

IV.3.1.- OBTENCIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE CEPAS DE *S. cerevisiae*

Se sembraron las cepas de *S. cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763 en caldo YPG (Yépez, 1995) , se incubaron 35°C durante 24 horas. Los tubos que presentaron crecimiento, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes libres de células obtenidos, se esterilizaron por filtración con ayuda de filtros de nitrocelulosa con poro de 0.22 µm.

IV.3.2.- PRUEBA DE ANTAGONISMO

En cajas de Petri se vaciaron 20 ml de agar BHI y se colocó cada una de las cepas testigo a una concentración del tubo no.5 del nefelómetro de MC Farland, se adicionó de manera tal que se formará un césped.y se esperó a que se solidificaran.

Posteriormente con ayuda de pinzas estériles se colocaron cada uno de los penicilindros a una distancia equidistante sobre el césped de agar solidificado. Con ayuda de un micropipeta se colocaron 200 µl del sobrenadante de la cepa ATCC Y Florida 1, obtenidos anteriormente. Las placas se incubaron a 35°C durante 48 horas, pasado el tiempo se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

IV.4. ENSAYO DE ADHERENCIA (Modificado de Pérez *et al.*, 2005)

Para la prueba de aglutinación se creció el cultivo de *S.cerevisiae* cepa Florida 1 y ATCC 9763, en caldo YPG (Yépez, 1995) , durante 48 horas a 35 ° C .

Los patógenos se crecieron en caldo BHI durante 48 horas a 35 ° C (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella* Typhi ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114.)

Se ajustó el crecimiento de las cepas al tubo ·no.5 del nefelometro de Mc Farland por separado (cepas prueba y potógenos) se realizó la mezcla de la cepa Florida 1 con cada uno de los patógenos y de la misma manera para la cepa ATCC 9763, se incubó a 35 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de se colocó una gota de patógeno y una de *S.cerevisiae* (cepa Florida 1 ATCC 9763) esto se llevo a cabo para cada cepa. Posteriormente se hizo una observación al microscopio (objetivo 40x).

V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Saccharomyces cerevisiae ha sido considerado como una levadura inocua de interés principalmente industrial para la elaboración de vino, cerveza y pan. Ha sido utilizada como probiótico en el tratamiento y la prevención de enfermedades entéricas (Bouza *et al.*, 2004).

V.I.-TOLERANCIA DE *S.cerevisiae* (Cepa ATCC 9763 y Florida 1) A DIFERENTES pHs

V.I.I- Sensibilidad a diferentes pHs:

En la prueba cualitativa, la cepa de Florida 1 y la cepa ATCC 9763 presentaron crecimiento a partir de pH de 3.3 hasta 5.86 cuadro 3 . El pH esta directamente relacionado con la capacidad de un microorganismo para sobrevivir o multiplicarse en un alimento o en un medio de cultivo. El efecto se advierte fundamentalmente en los procesos de nutrición, respiración, multiplicación, todos aquellos donde se vea involucrada la actividad enzimática (Fernandez, 2000). El pH es considerado como uno de los factores importantes en la fisiología de la levadura, este parámetro se utiliza para predecir la fermentación en el mosto (Imai *et. al.*, 1995). El pH es importante para la selección de las cepas, así como la resistencia a ácidos orgánicos y sales biliares (Agarwal *et al.*, 2000). Las levaduras crecen en intervalos de 3.5 a 5.0 esto es debido a que la actividad de las proteínas plasmáticas de las levaduras se desarrollan en los límites de su membrana los cuales se dan en estos valores (Rose, 1987; Reynolds *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la levadura pudiera mantener su

actividad metabólica y resistencia al estrés físico, calentamiento y exposición a pH ácido (Dawson 1989) .

Cobos (1996) observó *in vitro* que en condiciones de anaerobiosis y en interacción con bacterias, la viabilidad de cepas de esta levadura disminuye después de 12 h de incubación..

Cuadro 3 .-Diferentes pHs y comparativos con la cepa Florida 1 y la cepa ATCC 9763 de *Saccharomyces cerevisiae*.

pH	CEPA FLORIDA 1	ATCC 9763
2.92	++	++
3.12	++	++
3.3	+++	+++
4.17	+++	+++
4.86	+++	+++
5.5	+++	+++
5.86	+++	+++

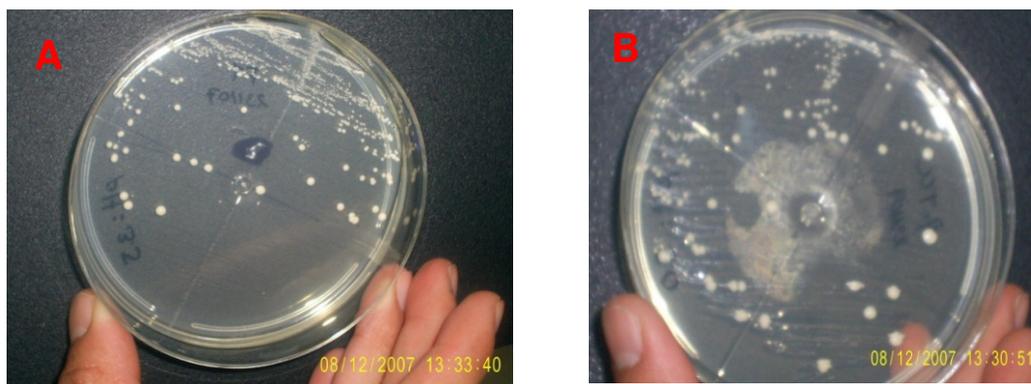


Figura 2 y 3. Prueba cualitativa. Crecimiento en placas de YPG a pH 2.92. Panel A crecimiento de la cepa de Florida 1. Panel B crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* ATCC 9763.

Mediante la evaluación a partir de una concentración de 1.5×10^{-6} UFC/ml, Neférolometro de Mc farland y por medio de una serie de diluciones hasta exponente 10^{-7} se verificó la viabilidad para ambas cepas.

V.I.2.-Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable

Cuadro 4 .- Prueba de viabilidad evaluada para cepas probadas.

VIABILIDAD					
concentración	1.00E+05	1.00E+04	1.00E+03	1.00E+02	1.00E+01
diluciones	1.00E+03	1.00E+04	1.00E+05	1.00E+06	1.00E+07
FLORIDA 1	-----	----	----	27 UFC/ml	-----
ATCC	-----	----	----	59 UFC/ml	-----

----- Cajas con cuenta fuera de 150 y 10 UFC/ml

Con respecto a los resultados obtenidos para esta prueba en el cuadro no. 5 observamos que aun cuando la cepa ATCC 9763 tuvo mayor número de colonias, la diferencia no es significativa con respecto a la cepa Florida 1 ya que en nuestro experimento ambas se mantienen viables.

Otros trabajos realizados por Doreau y Jouany 1998 demuestran que la levadura a pHs ácidos se adapta, esto lo observaron *in situ* en vacas. Otros investigadores han mencionado que existe una interacción de diferentes microorganismos provocando cambios en el pH del rumen (Dawson, 1993).

En la literatura se menciona que los animales que reciben probióticos en su alimentación, estimula su sistema inmunológico; Las levaduras en el caso de los rumiantes favorecen el crecimiento de bacterias anaerobias, parece ayudar a que el pH ruminal sea estable y a su vez a la degradación de la fibra por la proliferación de las bacterias celulolíticas (Sullivan *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2002).

Por lo tanto las cepas utilizadas en procesos de fermentación a diferentes pHs y ser agregadas en los alimentos como probióticos para ingesta de animales, proporcionándoles proteínas necesarias para su crecimiento.

Cuadro 5.- Resultados de la sobrevivencia de las cepas a diferentes pHs mediante cuenta viable.

		ATCC UFC/ml	A1 UFC/ml
	Concentración	1.00E+02	1.00E+02
	Dilución	1.00E+06	1.00E+06
Ph	2.97	69	35
	3.11	71	40
	3.64	56	20
	5.86	86	37

V.2- TOLERANCIA DE *S. cerevisiae* EN PRESENCIA DE SALES BILIARES

V.2.1.- Sensibilidad a diferentes concentraciones de TDCA:

En el cuadro 6 observamos que la cepa Florida 1 sobrevivió a las sales biliares a concentración de 0.2% a diferencia de la cepa ATCC 9763 que tuvo una resistencia hasta 0.3%.

Cuadro 6.- .Prueba de sobrevivencia, evaluación cualitativa. (TDCA)

CONCENTRACION SALES BILIARES N.3	CEPA FLORIDA 1	ATCC 9763
0.05%	+	+
0.1%	+	+
0.2%	+	+
0.3%	-	+
0.5%	-	-
1.5%	-	-
2.0%	-	-

La literatura reporta que la concentración de sales biliares usada en la búsqueda de cultivos de levaduras es de 0.9%, la cual es mucho mayor a la encontrada en el intestino de muchos animales domésticos (Agarwal *et al.*, 2000. Gilliland y colaboradores (1984) mencionan que la concentración de sales biliares considerada ideal para la búsqueda de levaduras es del 0.3%. Estos resultados concuerdan con lo obtenido con la cepa de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y en el caso de la cepa "Florida 1" es menor pero también se

considera que las concentraciones pueden variar dependiendo el tipo de levadura (Agarwal *et al.*, 2000).

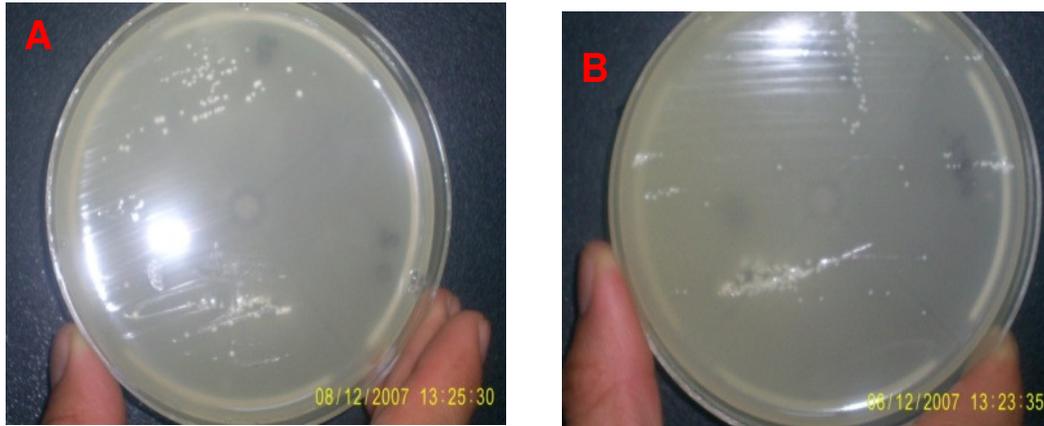


Figura 5 y 6. Prueba cualitativa. Comparativo de crecimiento cepa "Florida 1" (A) Y (B) a una concentración de TDCA del 0.05%.

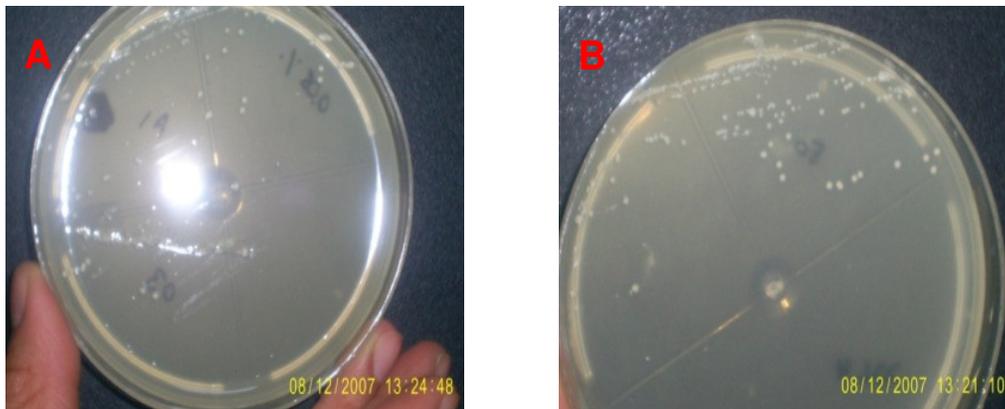


Figura 7 y 8.- Prueba Cualitativa. Crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* ATCC 9763 A y B a una concentración de TDCA de 0.2 %.

V.2.2.- Evaluación de la sobrevivencia de las cepas a diferentes concentraciones de sales biliares no.3 mediante cuenta viable:

Continuando con los resultados evaluados en nuestros experimentos, en el cuadro 7 observamos que las cepas Florida 1 y ATCC 9763 se desarrollaron a concentraciones de 0.05% al 0.2% de sales biliares. A partir de 0.25% de TCDA la cepa Florida 1 crece en la dilución 10^{-1} a 10^{-3}

Cuadro 7.- Resultados obtenidos de evaluación de la sobrevivencia, comparativo de *S.cerevisiae* cepa Florida 1 y ATCC 9763.

0.05%			
concentracion	1.00E+05	1.00E+04	1.00E+03
diluciones	1.00E+03	1.00E+04	1.00E+05
FLORIDA 1	*	*	25 UFC/ml
ATCC	*	*	11UFC/ml
0.10%			
concentracion	1.00E+05	1.00E+04	1.00E+03
diluciones	1.00E+03	1.00E+04	1.00E+05
FLORIDA 1	*	*	10 UFC/ml
ATCC	*	*	19 UFC/ml
0.20%			
concentracion	1.00E+05	1.00E+04	1.00E+03
diluciones	1.00E+03	1.00E+04	1.00E+05
FLORIDA 1	*	29 UFC/ml	*
ATCC	*	144 UFC/ml	13 UFC/ml
0.25%			
concentracion	1.00E+06	1.00E+05	1.00E+04
diluciones	1.00E+02	1.00E+03	1.00E+04
FLORIDA 1	137UFC/ml	13 UFC/ml	0
ATCC	*	*	54 UFC/ml

*Colonias fuera del intervalo entre 10 y 150UFC/ml.

Las concentraciones a partir de 0.3% de sales biliares usadas para el experimento son mucho más elevadas que las que se han reportado encontradas en intestino de la mayoría de rumiantes (Gilliand *et al.*, 1984). Sin

embargo en nuestro estudio el crecimiento fue mejor para ATCC 9763 . En estudios hechos por Agarwal y col. (2000) probaron concentraciones de 0.3 a 0.9 % observando que la mayoría de cepas probadas no sobrevivieron, sin embargo una de las cepas de estas sobrevivió a concentraciones del 0.9 %. Kühle y col. (2005) las cepas de *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* var. *Boulardii* mostraron resistencia a concentraciones de 0.3% de sales biliares

Rubio y col. (2008) probaron *in-vitro* fue de 0.05 a .3% obteniendo como resultado que las cepas probadas resisten a estas concentraciones

S. cerevisiae posee proteínas integrales de membrana unidas a ATP (proteínas ABC), responsables de la traslocación de las sales biliares y transportando eficientemente como ácidos biliares conjugados. Otro mecanismo podría ser la acumulación de polioles y glicerol para regular la presión osmótica de la célula (Ortiz *et al.*, 1997).

Los datos obtenidos sugieren que las cepas de *S. cerevisiae* y Florida 1 pueden ser utilizadas como prebiótico en alimento para animales debido a la resistencia obtenida en resultados anteriores.

V.3- Prueba de Antagonismo

L. casei retada contra *Salmonella* Typhi. En la Fig 12 observamos que los sobrenadantes de las cepas *S. cerevisiae* no inhibieron a ninguna de las cepas

patógenas probadas, solo se el efecto de inhibición fue para la cepa de *L. casei* probada contra *Salmonella* Typhi. y no se presentó la inhibición de las cepas de *S. cerevisiae* "Florida 1" y ATCC (Figuras 12, 13 y 14).

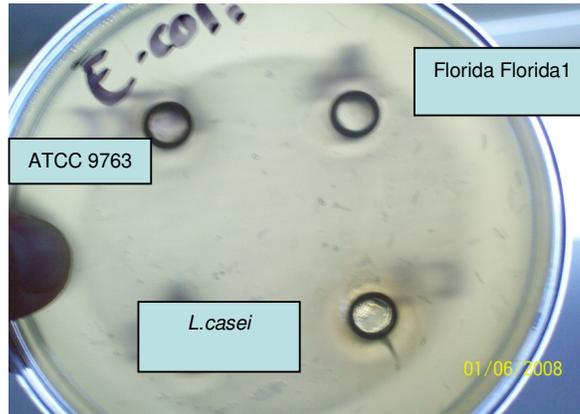


Figura 9.-Prueba de inhibición. Césped de *E. coli* . Como control positivo *L. casei* con inhibición. Cepa Florida 1 y ATCC 9763 sin inhibición.

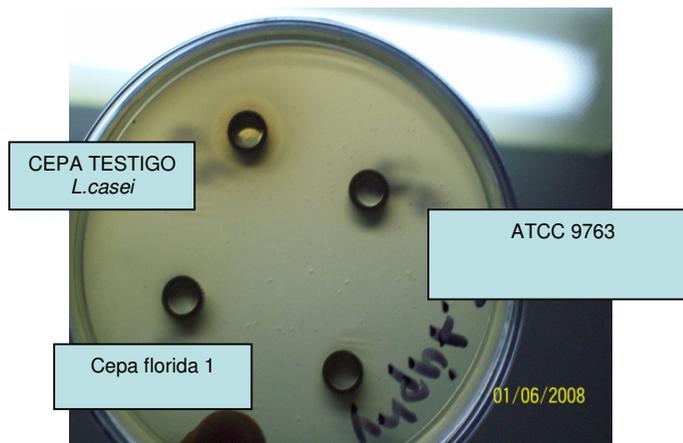


Figura 10. Prueba de inhibición. Césped de *S. typhi*. Como control positivo *L. casei* con inhibición. Cepa Florida 1 y ATCC 9763 sin inhibición

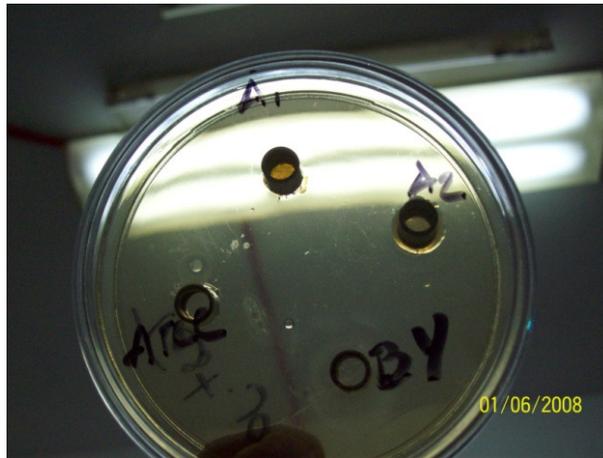


Figura 14. Testigo negativo.

*** Se usó *L.monocytogenes* en donde no se observo halo de inhibición.

Experimentos hechos por Rubio y col. 2008. donde observaron que ninguna de las cepas usadas produjo sustancias antimicrobianas que pudieran difundirse y fueran capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos. Existen pocos estudios en donde se hayan hecho experimentos similares. En nuestro estudio la cepa de *L. casei* presentó inhibición para la cepa de *Salmonella* Tiphy usando el sobrenadante, lo que confirma que las bacterias lácticas actúan de manera diferente a las levaduras, Quizá las levaduras con respecto a otros estudios en donde si se ha demostrado que los patógenos son capaces de adherirse. La levadura tendría la capacidad de resistir el ambiente gastrointestinal siendo su colonización y multiplicación más eficaz (Domitelle y col. 2005, Thrune *et al.*, 2009, Rubio *et al.* 2008)

V.4 PRUEBA DE ADHERENCIA

Los resultados obtenidos fueron negativos para la aglutinación como se muestran en la Cuadro 8. :

Cuadro 8. Aglutinación en cepas de *S.cerevisiae* sobre algunos patógenos evaluados.

CEPA EVALUAR	A	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>Tiphy</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
Florida 1		Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación
ATCC		Sin aglutinación	Sin aglutinación	Sin aglutinación

Con respecto a los resultados obtenidos no observamos aglutinación. Sin embargo resultados obtenidos por Pérez y col. (2005), demostraron tener aglutinación positivos para algunas de las cepas probadas se justifica ya que quizá esta adherencia puede darse por unión a manosa (adhesina Flo1) o por unión a manosa, glucosa o maltosa (Gedek, 1999). Lo resultados anteriores se confirman con pruebas realizadas por Rubio y col (2008) ya en experimento por medio de una evaluación ecométrica modificada probaron la afinidad de *E.coli* , *Salmonella spp* y *Shigella spp* en donde observaron agregados tinción de Gram. Si la cepa de *S.cerevisiae* es capaz de formar agregados de ciertas bacterias esto es de gran importancia ya que impediría que las bacterias patógenas lleguen a la adhesión de patógenos a las células del epitelio.

Los resultados nos muestran que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* probadas en este estudio cumple con ciertas características de un probiótico, ya que aun cuando no inhibe los microorganismos patógenos, resiste concentraciones de sales biliares y pH.

VI.-CONCLUSIONES

* *S. cerevisiae* Florida 1 y ATCC 9763 tienen la capacidad de sobrevivencia a pH 2.92 a 5.8

La cepa Florida 1 y ATCC 9763 resistieron a una concentración de 0.05 % hasta 0.2% de TCDA.

**S. cerevisiae* no producen sustancias con capacidad inhibitoria

Las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114. no se adhieren a la pared celular de *S. cerevisiae* cepa Florida 1 y ATCC 9763.

BIBLIOGRAFÍA

- Aghdamshahriar, H., Nazer, A., y Ahmadzadeh, A. 2006. The effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in replacement fish meal and poultry by product protein in broiler diets. XII European Poultry Conference, Verona, Italia.
- Agerholm, L.; M.L Bell,.; G.K Grunwald,. & A Astrup,. 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short term intervention studies. Eur. J. Clin. Nutr. 54:856
- Amores. R. A; J. R Calvo.; Maestre and H Martinez.. 2004. Prebioticos. Rev. Esp. Quimioterap, 17(2): 131-139.
- Arambel, M. J. and B. A. Kent. 1990. Effect of yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early to midlactation dairy cows. J. Dairy Sci. 73:1560
- Biricik, H. y , I. Türkmen2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fibre of different forage: concentrate ratios in diets. J. FAC. Vet. Med. 20:29.
- Colins, C.H, P Lyne,.1989. Metodos Microbiologicos. Edit. Acribia. Zaragoza España. 524 p.p.
- Camacho, C. 1999. Enfermedades estéricas en los cerdos. Mundo Avícola y Porcino. 31: 39-42.
- Condon, R.; A Mariné,.; M Rafecas,. 1988. Yogurt: elaboración y valor nutritivo. Fundación española de la nutrición. Madrid.

- Dawson, K. A. 1993. The use of yeast culture in animals feeds: a scientific application of direct fed microbials and challenges of the future. En: T. P.Lyons (Ed.). Biotechnology in the Feed Industry, proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium. USA. p. 169.
- Dearriba, J. y A Álvarez,. 2000. Papel del medico veterinario en huracanes e inundaciones. Salud Animal. 22(2):69-72.
- DeSimone, C.; E Rosati,.; S Moretti,. Probiotics and stimulation of the immune response. Eur J Clin Nutr 1991;45:32-4.
- Domitille. F., Ce A drink. N., Berger, M.,Coconnier, V., Moal, L., Servin. A. (2005). Ph, Lactic Acid-, and Non-Lactic, Acid-Dependent Activies of probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica serovar Thiphimurium. Appl Env Microbiol; 71 (10): 6008-6013.
- Farnworth, E.R., 2001. Probiotics and prebiotics. In Handbook of Nutraceutical and functional foods [RE Wildman] Ed. C.R.C. Press. 25: 407 – 422.
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.2002
- Fernández-Escartín, E. 2000. Microbiología sanitaria agua y alimentos. Universidad de Guadalajara. México D.F, p.70-80.
- Ferrer, B y J Dalmau,. 2004. Alimentos funcionales: probióticos. Centro Atención Primaria de Alaquás. Valencia. 1-34 p.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. Journal of Applied Bacteriology (66). 365-378p.
- García,Y . 2002. Efecto del tratamiento térmico en la actividad hipocolesterolémica de un hidrolizado enzimático de crema de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestro en Ciencias en Procesos

- Biocientíficos. Instituto de Ciencia Animal e Instituto de Farmacia y Alimento. La Habana. Cuba.
- Gedek, B.R. 1999. Adherence of *Escherichia coli* serogrupo O 157 and *Salmonella typhimurium* mutant DT104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*. 42:261-264.
- Gilliland, S. E. Staley , T.E and Bosh. L.j 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*67, 3045-3051.
- Gilliland, S.E.; Nelson, C.R.; Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 377-381.
- Hamilton M. Probiotic Remedies Are Not What They Seem. *British Medical Journal* 1996; 1996; 312: 55-56.
- Hirayama, K y J. Rasfter, 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2 (6) 681-686.
- Jin , L.Z., Ho , Y.W. Abdullah, N, and S Jalaludin, (1998). Neid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology* 27, 183-185.
- Jouany, J.P. (1994). *INRA Prod. Anim.*,7(3): 207-225
- Kiebling, G.; J Schneider,. & Jahreis, G. 2002. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: 843.
- Lim, H.; S Kim; W Lee. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *Journal of Veterinary Science* 5: 391-395.

- Maiorka, A.; E, Santin; S Sugeta; Almeida, J.; Macari, M. 2001. Utilization of Prebiotics, Probiotics or Symbiotics in Broiler Chicken Diets. Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal - FCAV/UNESP. Rev. Bras. Cienc. Avic. vol.3 no.1 Campinas Jan. Abril
- Marteau, P.; K, Minekus; R. Havenaar; Hues in't Veld JHJ. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. J Dairy Sci; 80:1031-7.
- Martínez, M.; Z, Rodríguez, L, Savón; L, Dihigo; González, R.; Nuñez, O.; Orta, M.; Febles, M. 2005. Efecto de un hidrolizado enzimático de crema de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tratado térmicamente, en indicadores microbiológicos y fermentativos en pollitas de reemplazo de ponedoras. ICA.
- Mulder, R. 1991. Probiotics as a tool against salmonella contamination. World Poultry. 33-37.
- Nadathur, SR.; SJ. Gould,; A.T Bakalinsky. 1995. Antimutagenicity of an acetone extract of yoghurt. Mutat Res;334 (2):213-24.
- Nader de Macías, M.E.; M.C. Apella; N.C. Romero; S.N. González; G. Oliver Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. J Appl Bacteriol 1992;73:407-411.
- Neumann, E. 1998. Mono association with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germ free mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Dec. 3: 1565-1573.
- Nieto, A. 1999. Prevención primaria de la alergia alimentaria –probióticos– tolerancia oral. An Esp Pediatr; s126: 31-34.

Norma oficial mexicana nom-111-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Olveira G.F. y I. M. González. 2007. Prebiótico y probiótico en la práctica clínica. Nutr Hosp. Nutr. Hosp; 22(Supl.2):26-34.

Ortiz D., Pierre, S.M., Abdulmessih, A., Arias I. 1997. A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid Transport. J Biol Chem; 272: 15358-15365.

Palou, A. and F. Serra. 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación Nutrición y Salud 7: 76-90.

Peralta, M.F., R.D. Miazzo, y A, Nilson. 2008. Levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) en la alimentación de pollos de carne. REDVET IX:1695-7504.

Perdigón, G.; S. Álvarez;, M. Rachid, G. Agüero;, N. Gobbato 1995b. Immune system stimulation by probiotics. Symposium: Probiotic Bacteria for Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. J Dairy Sci; 78:1597-606.

Perez, S.L., R.M. Talavera, S.H. Monroy, B.L. Lagunas, I.J. Cauron, J, R. Montes de Oca, C.J. Vázquez 2005. *In Vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. Rev Latinoamericana. 47:70-75.

Pino, A.; E, Dihigo. 2006. Estudio de los indicadores morfométricos del Tracto Gastro Intestinal (TGI) de cerdos en crecimiento de preceba alimentados con un producto de actividad prebiótica. Instituto de Ciencia Animal. Segundo Congreso de Producción Animal Tropical (2007, San José de las Lajas, 26-29 Noviembre, Provincia Habana), 176 p.

- Rubio, A. M., M. E. Hernández,, A. R. Aguirre,, R.P Potou,. 2008. Identificación preliminar *in Vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S.cerevisiae* .Rev.MVZ Cordoba vol 13 no.1
- Robinson, R.K.; A. Samona, Health aspects of bifidus productos: a review. Int J Food Sci Nutr 1992;43:175-180.
- Saloff, C. 1995. Fermented milks: effects on the immune system. Danone World Newsletter; 9:2-8. 31.
- Schrezenmeir, J. and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching a definition. Am. J. Clin. Nut. 73 (suppl) 361-364.
- Solis, B.; Lemonnier, D. Induction of 2'-5'. A synthetase activity and interferon in humans by bacteria used in dairy products. Eur Cytokine Net 1991;2:137-40.
- St-Onge, M.P.; Farnworth, E.R.; P.J, Jones., 2000. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. Am J Clin Nutr 71: 674-681.
- Texeira. A.A.;R. A Paula; H.C, Mantovani; and Moraes. C.A. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolates from Italian salam food. Microbial 23: 213-219.
- Trapp, C.L.; C.C, Chang., G.M, Halpern, C.L Kent; M.E, Gershwin., The influence of chronic yogurt consumption in population of young and elderly adults. Int J Immunother 1993; IX:53-64.
- Vanderhoof, J.A, R.J, Young., 1998. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. J Pediatr Gastroenterol Nutr; 27: 323-332.

- Vigliano, F. A.; M. L, Quintáns; R. Bermúdez; M.I, Quiroga., & J. M, Nieto., 2005. Histological, histochemical and ultrastructural analysis of the gastric mucosa of turbot (*Scophthalmus maximus*). Department of Histology and Embryology, School of Veterinary Sciences, National University of Rosario. Argentina. *Int. J. Morphol.*, 23(1):45-94. Octubre.
- Wohlt, J. E.; A. D. Finkelstein and C. H. Chung. 1991. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle early lactation. *J. Dairy. Sci.* 74:1395.
- Yepez, Y. 1995. Selección de una cepa de *S.cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la planta alcoquímica sucromiles S.A, Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota.
- Wolth,J.E., T.T.Corcione and P.K.Zajac, 1998. Effect of yeast 1 t on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. *J. Dairy Sci* 81:1345.

USRL:

internet:http://www.who.int/foodsafety/fs_management/eb/probiotic_guidelinesS
wientek, B. Beneficial Bacteria. Prebiotics and probiotics work in tandem to stimulate a healthy microflora in the gastrointestinal tract. *Food productdevelopment*. [en línea] 2003. Disponible en: http://www.preparedfood.com/archives/2001_01/0101toc.htm [Consulta: Febrero 18 2007].

Lázaro, D.C., Carcelén, C. F., Torre, A.M., Ara, G.M. 2007. Efecto de probióticos en el alimento de las cerdas sobre los parámetros productivos de lechones. AACP. www.produccionanimal.com.ar.

<http://microbiologia.org/microbioenlinea/capitulo20>.

http://genome.ucsc.edu/images/S_cerevisiae.jpg



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00054

Matrícula: 207381247

EVALUACION DE *Saccharomyces cerevisiae* "FLORIDA 1" COMO PROBIOTICO PARA CONSUMO ANIMAL.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de agosto del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. CARLOS VAZQUEZ SALINAS
M. EN C. ELSA IRMA QUIÑONES RAMIREZ

siendo el primero asesor del alumno y lectora la segunda, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: JUAN CARLOS ACOSTA PULIDO

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



JUAN CARLOS ACOSTA PULIDO
ALUMNO

APROBADO

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISOR

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

ASESOR

DR. CARLOS VAZQUEZ SALINAS

LECTORA

M. EN C. ELSA IRMA QUIÑONES RAMIREZ