



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**“ESTUDIO DE *Saccharomyces cerevisiae* CEPA FLORIDA 2
COMO PROBIÓTICO DESTINADO AL CONSUMO HUMANO”**

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

P R E S E N T A:

Q.A. ADRIANA PESCADOR DIONICIO

TUTOR: DR. CARLOS VÁZQUEZ SALINAS

MÉXICO, D.F., 2009

Dedicatorias

A mi madre, Adriana Dionicio, gracias mami, por tu amor, apoyo y confianza.

A Pável, por estar a mi lado día con día compartiendo tu amor y apoyándome en cada momento.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica e influir en mi vida profesional y personal.

A la empresa Ácidos Orgánicos S.A. de C.V., Grupo La Florida, en especial a Ing. Saúl Toral Martiñon, Ing. Carlos Vázquez Rivas y M. en C. Larissa Ventura G., por el apoyo y la confianza depositada para la realización de éste proyecto.

A las QFB Angélica Gómez Hernández, y QBP Roxana Rodríguez Rocha, por ser impulsoras y promotoras de ésta inquietud, por su apoyo, confianza y amistad brindadas.

Al Dr. Carlos Vázquez Salinas, por la oportunidad y confianza para la realización de éste proyecto.

A la M. En C. Elsa Irma Quiñones Ramírez por sus aportaciones y el tiempo dedicado para el enriquecimiento de éste trabajo.

A la M. En C. Xóchitl Nochebuena Pelcastre, por su valiosa asesoría, disposición, ayuda y consejo.

A Juan Carlos Acosta Pulido, por contribuir con sus conocimientos a mi aprendizaje, por el trabajo en equipo, pero sobre todo por su valiosa amistad (incluidos los momentos difíciles y los chuscos).

Un agradecimiento sincero a Lizeldi, por su aportación para la conclusión de éste trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Índice de cuadros

Resumen

1. Antecedentes.....	1
1.1.-Tracto gastrointestinal humano.....	2
1.2.-Probioticos	3
1.2.1 Mecanismo de acción.....	8
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.3.1 Características generales	10
2. Justificación	15
3.Objetivo General	16
4 .Objetivos particulares.....	16
5. Metodología.....	17
5.1 Efecto de diferentes pHs en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> , cepa Florida 2 y ATCC	17
5.2 Tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de bilis	18
5.3 Estudio de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de <i>S. cerevisiae</i> sobre patógenos	19
5.4 Ensayo de adherencia	20
6. Resultados y Discusión.....	22
6.1 Efecto de diferentes pHs en el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> , cepa Florida 2 y ATCC	22

6.2 Tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de bilis	29
6.3 Estudio de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de <i>S. cerevisiae</i> sobre patógenos	32
6.4 Ensayo de adherencia	35
Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	39
Anexo I.....	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Microorganismos presentes en tracto digestivo.....	3
Cuadro 2. Resumen de características de un probiótico.....	6
Cuadro 3. Principales probióticos	7
Cuadro 4. Principales contribuciones de los probióticos	9
Cuadro 5. Crecimiento de cepas de <i>S. cerevisiae</i> (Florida 2 y ATCC 9763) en medio YPG	23
Cuadro 6. Registro de crecimiento en placa a diferentes pH's.....	24
Cuadro 7. Supervivencia de cepas de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> en medio ajustado a diferentes pHs	26
Cuadro 8. Tolerancia a bilis de cepas en estudio.....	28
Cuadro 9. Tolerancia de cepas a diferentes concentraciones de bilis	30
Cuadro 10 Efecto de sobrenadantes sobre el crecimiento de patógenos.....	32
Cuadro 11. Adherencia de patógenos a <i>S. cerevisiae</i>	36

RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Cepa La Florida 2, es un componente biológico empleado principalmente en la industria de la panificación, con el objetivo de transformar los azúcares presentes en la masa en dióxido de carbono, alcohol etílico y energía, dando como resultado el incremento de volumen en el pan y modificación de sus características sensoriales. Aunque es el campo de mayor aplicación, existe un gran interés en comercializarla por las contribuciones benéficas en la salud del hombre, ya que se ha observado un efecto protector en el sistema digestivo al consumirla y puede ser considerada como un probiótico. En el presente estudio se evaluaron éstas características en la Cepa Florida 2 y una cepa ATCC 9763, para establecer su potencial como probiótico. Se realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativamente sobre la resistencia a pH, en el intervalo 2.92 a 5.86, obteniendo un crecimiento óptimo a pH 3.11 tanto para la Cepa Florida 2 como para el ATCC. En cuanto a la prueba de tolerancia a sales biliares, se realizaron evaluaciones en concentraciones de 0.05 a 2.0% de TCDA, resistiendo hasta 0.25 % de TCDA. La actividad antimicrobiana, se evaluó mediante difusión en placa en conjunto con la observación en microscopio óptico, la adherencia de patógenos (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella* Typhi ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 y *Staphylococcus aureus*), no se observó algún efecto que contribuyera a la inhibición de los patógenos, no se observa producción de compuestos antimicrobianos, ni adhesión de los patógenos a la cepas, Florida 2 y ATCC.

1.- ANTECEDENTES

1.1 TRACTO GASTROINTESTINAL HUMANO

El tracto gastrointestinal, también llamado tracto digestivo, es el sistema de órganos que cumplen con funciones de ingestión, digestión, absorción y excreción (Bruce, 2004).

Los microorganismos presentes en el tracto digestivo, tienen una cuenta aproximadamente 1×10^{11} bacterias por gramo de contenido, divididas entre aproximadamente 400 diferentes microorganismos, los más abundantes incluyen, *Bacteroides*, *Pepto-Streptococcus*, *Eubacteria*, *Bifidobacteria*, *Enterobacteria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Staphylococcus* (Naidu *et al.*, 1999).

La microbiota presente en el tracto gastrointestinal, es el resultado de la interacción entre las bacterias internas y el medio externo. En la vida cotidiana esta interacción puede modificarse por factores como, edad del individuo, dieta, estado inmunológico, uso de antibióticos, estrés, consumo de alcohol, pH intestinal, y la presencia de fibra soluble no digerible en el intestino (Cuadro1)(Kopp, 2001).

El intestino delgado aloja poca diversidad de microorganismos, donde encontramos especialmente *Streptococcus*, *Lactobacillus* y levaduras en órdenes

de 10^1 a 10^3 UFC/ml, en tanto que regiones como el íleon distal contienen enterobacterias y Bacteroides en órdenes de hasta 10^7 UFC/ml (Pérez, 2003).

Cuadro 1. Microorganismos presentes en tracto digestivo

Microorganismo de tracto digestivo	Ubicación
<i>Achromobacter</i> spp.	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Acidaminococcus frementans</i>	Intestino grueso
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Intestino grueso, íleon
<i>Aeromonas</i> spp.	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Bacillus</i> spp.	Intestino grueso
<i>Bacteroides</i> spp.	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Intestino grueso
<i>Butyriviberio fibrosolvans</i>	Intestino grueso
<i>Campylobacter</i> spp.	Intestino grueso
<i>Candida albicans</i>	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Clostridium</i> spp.	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Corynebacterium</i> spp.	Intestino grueso, íleon bajo
Enterobacteriaceae	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Enterococcus</i>	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Eubacterium</i> spp.	Intestino grueso
<i>Flavobacterium</i> spp.	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Fusobacterium</i> spp	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Lactobacillus</i> spp	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Mycobacteria</i> spp	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Mycoplasma</i> spp	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Peptostreptococcus</i> spp	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Propionibacterium</i> spp	Intestino grueso
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Ruminococcus bromii</i>	Intestino grueso
<i>Sarcina</i> spp	Intestino grueso
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Veillonella</i> spp	Intestino grueso
<i>Streptococcus grupo viridans</i>	Intestino grueso, íleon bajo
<i>Vibrio</i> spp	Intestino grueso, íleon bajo

Tomado de (Montiel, 1997).

La microbiota intestinal, produce los siguientes efectos: 1) Degradación de nutrientes, 2) Producción de ácidos grasos volátiles, 3) Absorción de metabolitos bacterianos, entre otros. Existen dos tipos de microbiota intestinal: la autóctona y la transitoria. La autóctona se adhiere a las células epiteliales de la mucosa, generalmente son microorganismos que se multiplican rápidamente, se adaptan, estabilizan y son inoctrinos. La flora transitoria, son microorganismos no patógenos que no se fijan al epitelio (Koop *et al.*, 2001).

1.2 PROBIÓTICOS

Las bacterias lácticas han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace muchos años, dando características organolépticas a los alimentos como yogurt, quesos, productos cárnicos, pan y conservas ().

Hacia 1907, el biólogo ruso Elie Metchnikoff, ganador en 1903 del premio Nobel por su teoría de los fagocitos, sugirió que el proceso de envejecimiento es el resultado de la intoxicación putrefactiva crónica ocasionada por la microbiota intestinal, esto basado en los descubrimientos en habitantes de algunas regiones de Bulgaria quienes consumían yogurt como parte de su dieta normal y tenían una longevidad notoria. Metchnikoff propuso que la vida se prolongaba por el consumo de las bacterias lácticas como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* presentes en leche fermentada, surgiendo así la teoría de que las

bacterias nocivas en el intestino pueden ser eliminadas por la acción de estas bacterias benéficas (Kingsley, 2007).

En 1965 Lilly y Stillwell utilizan por primera vez el término probiótico, de origen griego que significa, "a favor de la vida", término utilizado para estas bacterias que viven y conviven todos los días en nuestro tracto intestinal (Fuller, 1989).

Para 1989, Fuller estableció que un probiótico son microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, agregados como suplemento en la dieta, los cuales afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la microbiota intestinal.

De acuerdo a Schrezenmeier y De Vrese (2001), un probiótico es: "Preparación de un producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) en la mucosa intestinal del hospedero provocando efectos benéficos sobre la salud del mismo". Por lo mencionado anteriormente este tipo de alimentos, se consideran dentro del grupo de los funcionales (Palou and Serra. 2000).

Actualmente 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. Las acciones benéficas se encuentran documentadas en múltiples referencias de la literatura (FAO, 2001).

Los probióticos han sido señalados como posibles sustitutos de los antibióticos (Lázaro *et al.*, 2007). Entre los criterios importantes considerados para seleccionar a un microorganismo como probiótico son la sobrevivencia y desarrollo en el tracto gastrointestinal (Martins *et al.*, 2004). En el cuadro 2 se presentan las principales características de un probiótico.

Cuadro 2. Resumen de características de un probiótico

Características
Estabilidad durante su paso por estómago, pH ácido.
Resistencia a las sales biliares, siendo estables ante éstos compuestos.
Ser resistentes ante la acción de enzimas proteolíticas.
Capacidad de adhesión al intestino, con un mecanismo específico.
Presentar un efecto antagónico contra bacterias patógenas.
Generación de compuestos antimicrobianos.
Propiedades inmunomoduladoras, modificando la respuesta del antígeno.
Crecimiento rápido
Viabilidad durante el procesado, empaçado, almacenamiento y comercialización.

Modificado de Padio 1994 y Jin *et al.*, 1998.

Dentro de los géneros de bacterias los más utilizadas como probióticos son las bacterias ácido lácticas (BAL) como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,

Streptococcus, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Esteptococcus*, entre otros, mencionados en el cuadro 3 (Farnworth. 2001). Actualmente se utilizan mezclas probióticas ya que la unión de varios microorganismos en un producto, potencian su acción (Martins *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Principales probióticos

Género <i>Lactobacillus</i>	Género <i>Saccharomyces</i>	Género <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ln. latis</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>S. unisporus</i>	<i>Ln. mesentroides sp. mesentroides</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>		<i>Ln. mesentroides sp. Cremoris</i>
<i>Lb. helvetius</i>		<i>Ln. mesentroides sp. dextranicum</i>
<i>Lb. delbrueckii sp. bulgaricus</i>	Género <i>Kluyveromyces</i>	Otros géneros
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>K. marxianus sp. Marxianus</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>K. marxianus sp. lactis</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Lb. zeae</i>	Género <i>Lactococcus</i>	Otras bacterias
<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. lactis sp. Lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>L. lactis sp. Cremoris</i>	
<i>Lb. buchneri</i>	<i>L. lactis sp. Lactis biovar diacetylactis</i>	
<i>Lb. fermentum</i>		
<i>Lb. kefir</i>		
<i>Lb. parakefir</i>		

Tomado de Oliveira, 2007

Mecanismo de acción

Los probióticos pueden actuar benéficamente al alterar el metabolismo bacteriano intestinal a través de sus propias actividades metabólicas o bien de forma indirecta, interfiriendo en las actividades metabólicas de otros grupos microbianos e influir en el sistema inmune intestinal (Fuller, 1992).

El mecanismo de acción aún no se ha dilucidado, pero se ha propuesto lo siguiente:

1. Por competencia entre los microorganismos
2. Producción de sustancias antimicrobianas
3. Estimulación de la respuesta inmune (Fuller, 1989).

Los probióticos pueden afectar de forma benéfica las interacciones metabólicas que tienen lugar en el intestino. Esto sucede mediante la supresión de metabolitos tóxicos; por ejemplo, la presencia de proteína no digerida o aminoácidos no absorbidos en el intestino grueso, ocasiona cambios en la flora intestinal. Microorganismos como *Enterobacterias* o *Clostridium sp*, comienzan a dominar y a romper las proteínas generando cadaverina, putrescina, tiramina e histamina. Dichos compuestos, pueden generar una irritación de la pared intestinal, produciendo daño en el epitelio, produciendo un incremento en el valor

osmótico del contenido intestinal, provocando diarrea. De forma adicional, la histamina entra en corriente sanguínea y en dosis elevadas puede generar edemas (Otero *et al.*, 1999).

Las BAL pueden potenciar reacciones de detoxificación, estimulando la digestión del alimento mediante la sustitución de las enzimas digestivas, lo que ayuda a la absorción de los nutrientes generando beneficios (Fuller, 1992). A través del estudio de las BAL se han determinado las diferentes beneficios mencionados en el cuadro 4 (Saavedra, 2001).

Cuadro 4. Principales contribuciones de los probióticos

Acción	Contribución
Antitumoral	<ul style="list-style-type: none"> ● Incremento de la apoptosis o muerte celular programada de las células ● Producción de anticuerpos ● Inhibición de agentes químicos carcinogénicos. ● Efecto de las enzimas fecales sobre el metabolismo de las sustancias carcinogénicas al interior del intestino
Diarrea	<ul style="list-style-type: none"> ● Un incremento en la supervivencia del microorganismo probiótico. ● Aumento de anticuerpos séricos contra la bacterias patógenas ● Protección del intestino frente al proceso infeccioso. ● Previene infecciones entéricas

Recopilado de Perdigon et al 1995b, Nadathur et al 1995, (Hirayama y Rafter, 2000).

Se ha observado que ciertas cepas de BAL actúan sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada, producción de anticuerpos, activación de macrófagos y linfocitos (Perdigón *et al.*, 1995).

En la actualidad, existe gran interés en consumir alimentos que, además de su valor nutricional, posean beneficios adicionales previniendo enfermedades. La industria y la investigación han mostrado interés por conocer el modo de acción y los metabolitos de microorganismos probióticos (Palou *et al.*, 2000).

1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Características generales

Las levaduras son hongos microscópicos, unicelulares del reino vegetal, que suelen medir de 4 a 8 micras, son considerados anaerobios facultativos que pueden propagarse empleando un proceso de metabolismo oxidativo (González and Valenzuela, 2003).

Las levaduras pueden ser haploides o diploides según el estadio del ciclo, no obstante ambos tipos celulares son estables y se pueden reproducir de forma asexual mediante mitosis. La división es por gemación, es decir, las células hijas son de tamaño inferior al de las células madre, inicia su crecimiento formando una

yema en la célula madre, con posterior división nuclear, seguida de la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células (Gimeno *et. al.*, 1992).

Requerimientos nutricionales

Adams (1986) y Drew (1985) mencionan que las fuentes de carbono y energía empleadas por ésta levadura son principalmente glucosa y sacarosa, aunque también pueden utilizar fructuosa, galactosa, maltosa y suero hidrolizado. Otra fuente de carbono de la cual puede disponer es el etanol generando glicerol a partir de la fermentación.

En condiciones en las que existen altas concentraciones de glucosa, fructosa o maltosa se realiza una fermentación alcohólica, por medio de la glucólisis y posteriormente se forma etanol. Una vez consumidos los azúcares el etanol producido se utiliza como fuente de carbono en el ciclo de Krebs (Adams, 1985).

Las levaduras además de una fuente de carbono necesitan fuentes de nitrógeno, como fósforo, vitaminas del complejo B y distintos elementos traza.

El nitrógeno asimilable debe administrarse en forma de amoníaco, urea o sales de amonio, aunque también se pueden emplear mezclas de aminoácidos. Para obtener el crecimiento óptimo de *Saccharomyces cerevisiae* se emplea ácido fosfórico como fuente de fósforo, el magnesio como sulfato de magnesio que

provee de azufre, se requieren 200 ug de zinc, 75 ug de hierro, 12-15 ug de cobre, por litro de medio. En cuanto al requerimiento de vitaminas del grupo B, es importante la presencia de biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, pyridoxina y niacina. Es necesario un gramo de oxígeno para la producción de 1 gramo de levadura, en condiciones óptimas, se suministra con el aire que se inyecta en los medios durante la fermentación (Arambel *et al.*, 1990).

Las levaduras, son microorganismos que se ubican dentro del grupo que corresponden los probióticos. Según Dawson (1993), los probióticos son aditivos no nutritivos, los cuales contienen diferentes preparaciones de levaduras con efectos diversos sobre la digestión de los componentes de la dieta.

S. cerevisiae se considera como un patógeno oportunista en personas inmunocomprometidas, donde puede provocar sepsis en enfermos de leucemia y personas con SIDA (Orbera, 2004).

Dentro de las características de las levaduras para poder ser utilizadas como alimentos funcionales son las siguientes:

- 1) no 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 (Hubert, 1987; Thomas, 1987).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más ampliamente comercializada, para la producción de cerveza, pan y vino, debido a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación (González and Valenzuela, 2003).

El uso de levaduras proporciona vitaminas del complejo B, minerales, proteína y aminoácidos. Aproximadamente el 40% del peso de la levadura seca consiste en proteína. La calidad de la proteína de origen vegetal, es equivalente a la soya con una aportación importante de lisina (Aghdamshahriar *et. al.*, 2006; Peralta *et. al.*, 2008).

S. cerevisiae, puede ser comercializada como:

1) Levadura activa, viable con un conteo de 10 mil a 20 mil millones de células vivas por gramo, esta levadura se utiliza principalmente como probiótico;

2) Levadura Inactiva, con casi nula viabilidad, prácticamente 1.0×10^2 células vivas por gramo, empleada como potenciador de sabor o bien para especies que no toleran fácilmente consumir alimentos de origen vegetal;

3) Levadura Inactiva Enriquecida, se adiciona algún mineral traza para obtener su incorporación orgánica y generar biodisponibilidad de éste;

4) Levadura inactiva enriquecida con selenio, con gran demanda por estar ligada orgánicamente a la célula y contribuir a la ingesta diaria recomendada.

2.-JUSTIFICACIÓN

El empleo de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido principalmente en la industria de la panificación, contribuyendo a generar las características organolépticas en el pan y es el campo de mayor aplicación. Existe un gran interés en comercializarla por los beneficios que aporta a la salud del hombre, al ser una fuente importante de vitaminas del complejo B, aminoácidos teniendo alto contenido de lisina, minerales, proteínas de alto valor biológico. Con el presente estudio se contribuirá a la documentación que demuestre los beneficios que aportará la levadura cuando es consumida por el ser humano, permitiendo la comercialización de éste producto por la empresa “La Florida” y demostrar su potencial como probiótico.

3.- OBJETIVO

- Establecer el potencial de la cepa La Florida 2 de *S. cerevisiae* como posible probiótico para consumo humano.

4.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de diferentes pHs (2.9 a 5.86) en el crecimiento de *S. cerevisiae* Florida 2 y ATCC 9763.
- Estudiar la influencia de diferentes concentraciones (0.05 a 0.2%.) del ácido taurodeoxicólico en el crecimiento de *S. cerevisiae* Florida 2 y ATCC 9763
- Observar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *S. cerevisiae* Florida 2 y ATCC 9763 sobre *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella* Typhi ATCC 6539 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19114.

5.- METODOLOGÍA

Las cepas utilizadas para este trabajo fueron: ***Saccharomyces cerevisiae*** proporcionada por la empresa Ácidos Orgánicos S.A de C.V., nombrada **Florida 2**. Para el estudio de actividad antimicrobiana y adherencia se utilizaron los siguientes microorganismos:

- *Lactobacillus casei* (muestra aislada de queso)
- *E. coli* O157:H7 ATCC 35150
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- *Salmonella* spp ATCC 6539

5.1 Efecto de diferentes pHs en el crecimiento de *S. cerevisiae*, cepa Florida 2 y ATCC (Modificado de Collins, 1989, Yépez, 1995).

5.1.1 Evaluación de la sensibilidad de *S. cerevisiae* en diferentes concentraciones de pH en medio YPG

Cada cepa se sembró en caldo YPG (Yeast Peptone Glucose), posteriormente cada cepa fue resembrada en agar YPG ajustado a diferentes pHs: 2.92, 3.12, 3.3, 4.17, 4.86, 5.5, 5.86. Se incubó a 37 °C durante 48 horas y se registró el crecimiento en cada uno de los medios.

5.1.2 Evaluación de la sobrevivencia de las cepas *S. cerevisiae* en YPG a diferentes pHs mediante cuenta viable.

- Cada cepa de *S. cerevisiae* (Florida 2 y ATCC 9763), se ajustó a una concentración 1.5×10^6 UFC/mL usando el nefelómetro de McFarland No. 5. Para cada cepa se diluyó de 10^{-1} a 10^{-6} , se sembró cada concentración en medio YPG con pH ajustado (2.97, 3.11, 3.64 y 5.86). Se incubó a 35 °C durante 48 horas. El ensayo se hizo por triplicado.
- Para cada cepa se llevo a cabo una prueba de viabilidad, en cada dilución, se consideraron las placas que presentaron entre 10 y 150 UFC/mL, en medio YPG, sin ajuste de pH (NOM-111-SSA1-1994).

5.2 Tolerancia de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de bilis (Modificado de Pérez, 2005).

5.2.1 Evaluación de la sensibilidad de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de bilis.

Cada cepa se sembró en medio de YPG (Yeast Peptone Glucose) ajustado a diferentes concentraciones de ácido taurodeoxicólico (TDCA) Sales biliares No. 3 (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1 y 2%).

Se incubó a 35 °C durante 48 horas, se observó crecimiento en cada placa.

5.2.2 2 Evaluación de la sobre vivencia de las cepas *S. cerevisiae* en YPG a diferentes concentraciones de bilis (0.05, 0.1, 0.2, 0.25% de ácido taurodeoxicólico).

Las cepas de *S. cerevisiae* Florida 2 y ATCC 9763, fueron ajustadas al tubo 5 del nefelómetro de McFarland. Se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} y se sembraron en placas con medio YPG ajustando a diferentes concentraciones de TDCA (0.05, 0.1, 0.2, y 0.25%) (Sales biliares No. 3). Se incubó a 35°C durante 48 horas. Al final se hizo la cuenta de placas en donde se obtuvo la cuenta viable entre 20 y 150 UFC/ml. El ensayo se realizó por triplicado.

- A cada cepa se le hizo una prueba de viabilidad, en cada dilución, se consideraron las placas que presenten entre 10 y 150 UFC/mL, en medio YPG, sin sales biliares.

5.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SOBRENADANTES DE *S. cerevisiae* SOBRE PATÓGENOS (Modificado de Texeira, 2007).

5.3.1 OBTENCIÓN DE LOS SOBRENADANTES

Se sembraron las cepas de *S. cerevisiae* Florida 2 y ATCC 9763 en caldo YPG, se incubaron 35°C durante 24 horas. Los tubos que presentaron crecimiento, se

centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, obteniéndose el sobrenadante. Los sobrenadantes libres de células se esterilizaron mediante la técnica de microfiltración (con jeringa acoplada a portafiltros con membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 μm estéril). El sobrenadante estéril se colectó en viales estériles.

5.3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Una vez obtenidos los sobrenadantes, se hizo una evaluación de la inhibición de crecimiento en agar. En cajas Petri se vaciaron 20 ml de agar BHI y se colocó cada una de las cepas testigo a una concentración ajustada al tubo no.5 del nefelómetro de MCFarland (se adicionó de tal forma que se formara un césped) y se dejó solidificar. Posteriormente, con ayuda de pinzas estériles se colocaron sobre el césped de agar solidificado, uno por uno los penicilindros a una distancia equidistante. Con ayuda de un micropipeta se colocaron 200 μl del sobrenadante de la cepa ATCC y Florida 2, 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.

5.4 ENSAYO DE ADHERENCIA (Modificado de Pérez, 2005).

Para la prueba de aglutinación se creció el cultivo de s. C. en caldo YPG, durante 48 horas a 35 °C. Los patógenos se crecieron en caldo BHI durante 48 horas a 35 °C. Se ajustó el crecimiento de las cepas al Nefelómetro de 5 (cepas

prueba y patógenos) se realizó la mezcla de Florida 2 con cada patógeno y de la misma manera para el aTCC, se incubó a 35°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo, en un portaobjetos se colocó una gota de patógenos y una de *S. cerevisiae*, esto se llevó a cabo para cada cepa en estudio (ATCC y Florida 2). Posteriormente se observó al microscopio, objetivo 40 x.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se decidió utilizar el medio YPG (Yeast Peptone Glucose) para el crecimiento de *S. cerevisiae*, debido que el agar papa dextrosa (PDA) no gelificaba a pHs 2.92 a 5.86 y en presencia de sales biliares generaba precipitación de éstas al momento de adicionarlas al medio. Se decidió utilizar YPG debido a que las cepas en estudio presentaron buen crecimiento. Yépez (1995) y Pérez (2005) reportan que es un medio de cultivo empleado como control para cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en melazas de caña y que además aporta las fuentes de carbono que auxilian a la rápida recuperación de la levadura.

6.1 Efecto de diferentes pHs en el crecimiento de *S. cerevisiae*, cepa Florida 2 y ATCC (Modificado de Collins, 1989, Yépez, 1995).

6.1.1 Evaluación de la sensibilidad de *S. cerevisiae* en diferentes concentraciones de pH en medio YPG

En el Cuadro 5 se observan las UFC/mL obtenidas en la prueba de viabilidad de la levadura en condiciones óptimas para su crecimiento. Tomando en cuenta lo establecido por la NOM-111-SSA1-1994, la cual establece considerar la cuenta de placas con 10 a 150 colonias, sólo se realiza el conteo de la dilución 1×10^6 ,

por lo que observamos que el ATCC presenta mejor crecimiento frente a la cepa Florida 2.

Cuadro 5. Crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* (Florida 2 y ATCC 9763) en medio YPG

Viabilidad	
Concentración	1.00E+02
Dilución	1.00E+06
FLORIDA 2	42 UFC/mL
ATCC	59 UFC/mL

Las UFC crecidas en medio YPG tanto de la cepa Florida 2 y la ATCC, presentaron características típicas de *S. cerevisiae*: brillantes, lisas, convexas, de bordes bien definidos. En cuanto a la morfología microscópica se observó: forma ovalada, de 8 a 14 μm y gemación (Figura 1).

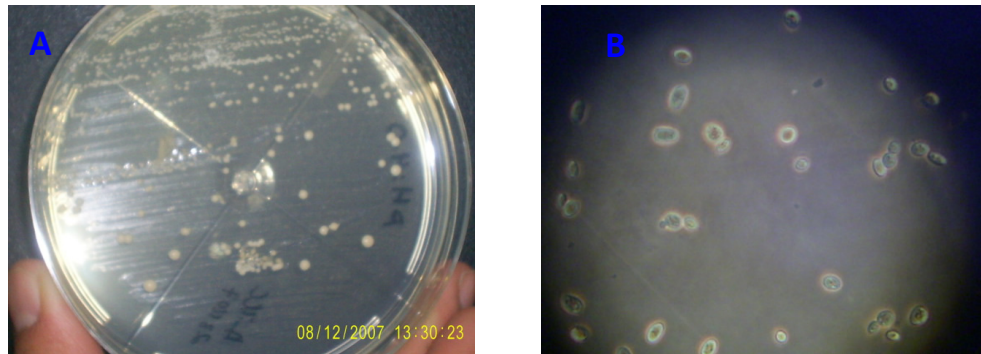


Figura 1. A. Morfología colonial; B microscópica de la cepa Florida 2 y ATCC de *Saccharomyces cerevisiae*

En el cuadro 6 observamos que ambas cepas crecieron en el intervalo de pHs de trabajo (2.92 a 5.86), la cepa ATCC presenta crecimiento abundante a partir del pH 3.3 y mantiene ése comportamiento hasta pH 5.86. Para la cepa Florida 2 observamos el umbral de crecimiento a pH 4.17, antes y después de éste valor, el crecimiento es moderado. En la figura 1 observamos el crecimiento en placa que se obtuvo para el pH 3.3 y 4.17.

Cuadro 6. Registro de crecimiento en placa a diferentes pH's

pH	ATCC 9763	Florida 2
2.92	+	+
3.12	++	++
3.3	+++	++
4.17	+++	+++
4.86	+++	++
5.5	+++	++
5.86	+++	++

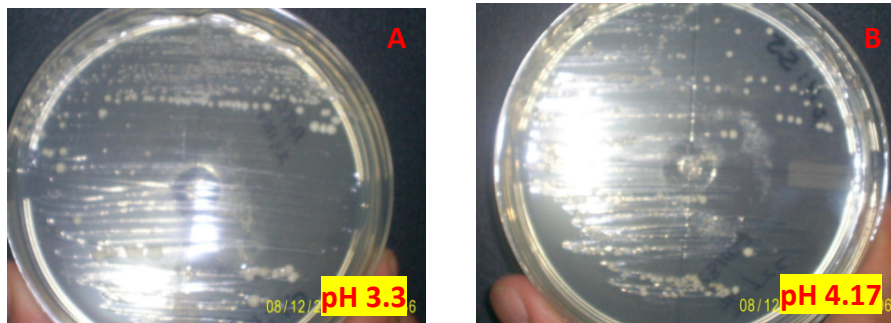


Figura 2. A. Crecimiento de ATCC en pH 3.3 B. Crecimiento de Florida 2 a pH 4.17

Los resultados obtenidos en éste ensayo, confirman lo reportado en bibliografía, las levaduras crecen en intervalos de 3.5 a 5.0, debido a la actividad de las proteínas plasmáticas que se encuentran en los límites de la membrana y contribuyen a tolerar éstos pHs (Rose, 1987; Reynolds *et al.*, 2008). Lo que menciona Narendranath (2001), es que *S. cerevisiae* es resistente a la adición de ciertos ácidos, posiblemente por la contribución del medio de cultivo utilizado, ya que puede conferirle cierta protección a la levadura bajo condiciones de estrés.

Las cepas en estudio crecieron en pH 2.92, el mínimo obtenido durante el ajuste del medio, esto indica que puede atravesar la primera barrera a la que se enfrentaría al ser ingerido, ya que el pH durante la digestión gastrointestinal es extremadamente ácido. El crecimiento en pH bajo es requisito para ser considerado como probiótico, ésto por las condiciones a las que enfrenta en tracto intestinal. (Jin et al 1998).

6.1.2 Evaluación de la sobrevivencia de las cepas *S. cerevisiae* en YPG a diferentes pHs mediante cuenta viable.

En el Cuadro 7 se muestra las UFC/mL de la cepa Florida 2 y ATCC que sobrevivieron en medio YPG ajustado a diferentes pHs. Tomando en cuenta lo establecido por la NOM-111-SSA1-1994, sólo se consideraron aquellas diluciones donde se cumple el recuento de UFC, por lo que consideramos la dilución 1×10^6 ,

por lo que observamos que el ATCC presenta mayor cantidad de UFC/mL que la cepa Florida 2, es decir, presentó mayor tolerancia ante tal condición. Es importante mencionar que el crecimiento óptimo fue a pH 3.11 en ambas cepas, pero que pueden tolerar los pHs de trabajo (2.92 a 5.86) sin que la pérdida de viabilidad sea drástica.

Cuadro 7. Sobrevivencia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en medio ajustado a diferentes pHs

pH		
	ATCC	A2
Concentración	1.00E+02	1.00E+02
Dilución	1.00E+06	1.00E+06
2.97	69	44
3.11	71	62
3.64	56	17
5.86	86	59

De acuerdo a Casal (1996), microorganismos como *S. cerevisiae* bajo condiciones aeróbicas, pueden usar como fuentes de carbono ácidos orgánicos de cadena corta como acético y láctico, por lo que en el interior de la célula, estos compuestos generan una acidificación del citoplasma, y aunque por el hecho de ser eucarióticas, deben mantener su pH intracelular a pesar de las variaciones de pH extracelular, se realiza la expulsión de protones sin requerimiento de ATP, generándose un aumento del pH intracelular, permitiéndole a la levadura resistir rangos amplios (2.4 a 8.6) de pH ácidos (Rose, 1987).

Podemos comparar los resultados obtenidos con los reportados por Membre et al (1999) , quienes encontraron que el pH óptimo entre 3.5 y 5.0 ± 0.2 y que a 2.5 ± 0.2 se observa una disminución del 30% en la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae*.

Debido a que estos microorganismos deben tolerar la presencia de los jugos gástricos, es importante mencionar que éstos son secretados en el estómago, como una sustancia muy ácida cuya función es degradar el alimento, que posee un pH de aproximadamente 2.0. La resistencia de las cepas de *S. cerevisiae* a un pH bajo puede deberse a la presencia de antiportadores que ayudan al intercambio de cationes monovalentes a través de las membranas, regulando el pH a nivel citoplasmático (Thomas, 2002). Los dos tipos de anti-transportadores de Na^+/H^+ que posee la levadura son: ha1p, en membrana plasmática y Nhx1p, en compartimiento endosomal prevacuolar. Estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) e H^+ a través de las membranas, de tal modo que regulan las concentraciones de cationes y pH a nivel citoplasmático y de organelos (Sychrovae H, 1999, Ohgaki, 2005)

Para mejorar la resistencia al paso por el estómago y primera parte del intestino de los probióticos, Stanton y cols., recomiendan someterlos a condiciones de

estrés subletal, como tratamiento con ácidos o calor, que les provoca la expresión de genes de respuesta adaptativa al estrés que los hacen más resistentes.

6.2 Tolerancia de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de bilis

6.2.1 Evaluación de la sensibilidad de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de bilis.

En el cuadro 8 se registran los resultados obtenidos para las cepas probadas, éstas toleraron la presencia de diferentes concentraciones de sales biliares (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1 y 2%), encontrando que la cepa ATCC 7369 sobrevivió hasta la concentración de 0.3 de bilis, en tanto que la cepa Florida 2 solo toleró 0.2

Cuadro 8. Tolerancia a bilis de cepas en estudio.

% TDCA	ATCC 9763	LA FLORIDA 2
0.05	+	+
0.1	+	+
0.2	+	+
0.3	+	-
0.5	-	-
1.0	-	-
2.0	-	-

Ambas cepas, presentan disminución del crecimiento a partir de la concentración de 0.3% de bilis. La literatura menciona que las levaduras activan mecanismos de resistencia a este tipo de compuestos, produciendo metabolitos para sobrevivir las condiciones de estrés (Rose, 1987). Gilliland y colaboradores (2004), reportan que la concentración que debe resistir un microorganismo probiótico es de 0.3% de bilis, aunque menciona que la mayoría de las especies de levadura crecen incluso hasta 0.75% en presencia de sales biliares.

La bilis actúa como detergente biológico que emulsiona y solubiliza los ácidos grasos de cadena larga, además le confiere actividad antimicrobiana, al generar la disolución de las membranas bacterianas (Beagley, 2006).

6. 2 Evaluación de la sobrevivencia de las cepas *S. cerevisiae* en YPG a diferentes concentraciones de bilis (0.05, 0.1, 0.2, 0.25% de ácido taurodeoxicólico)

Para evaluar la sobrevivencia de las cepas crecidas en YPG adicionado con sales biliares, nos apegamos a lo establecido por la NOM-111-SSA1-1994, sólo se consideraron aquellas diluciones donde se cumple el recuento de UFC, por lo que consideramos la dilución 1×10^5 . Observamos que la cepa Florida 2 presenta mayor cantidad de UFC/mL que la cepa ATCC hasta 0.2% de bilis. En 0.25 % de sales biliares la cepa Florida 2 no presenta crecimiento, en tanto

que para ésta concentración, la cepa ATCC registra el mayor crecimiento. De forma general, se puede decir que ambas cepas fueron tolerantes a la presencia de bilis.

Cuadro 9. Tolerancia de cepas a diferentes concentraciones de bilis

0.05 % bilis	
concentración	1.00E+03
diluciones	1.00E+05
FLORIDA 2	35 UFC/mL
ATCC	11 UFC/mL
0.1 % bilis	
concentración	1.00E+03
diluciones	1.00E+05
FLORIDA 2	38 UFC/mL
ATCC	19 UFC/mL
0.2 % bilis	
concentración	1.00E+03
diluciones	1.00E+05
FLORIDA 2	63 UFC/mL
ATCC	13 UFC/mL
0.25 % bilis	
concentración	1.00E+03
diluciones	1.00E+05
FLORIDA 2	0 UFC/mL
ATCC	13 UFC/mL

Al comparar lo obtenido con lo reportado en literatura, encontramos relación con lo mencionado por Rose (1987), que dice que las levaduras activan mecanismos de resistencia a sales biliares, y a valores muy altos como 0.75%,

tienden a retardar su metabolismo. Se observa que a 0.3% el crecimiento disminuye para la cepa Florida 2.

Para *S. cerevisiae*, se ha reportado que los ácidos grasos insaturados (en membrana celular) confieren la resistencia a las sales biliares (Begley, 2006).

Según Ortiz y colaboradores *S. cerevisiae* posee proteínas integrales de membrana unidas a ATP (proteínas ABC), responsables de la translocación de las sales biliares y pueden transportar eficientemente ácidos biliares conjugados. Se ha encontrado la presencia de vesículas similares a las encontradas en mamíferos en las levaduras, que pueden internalizar las sales para su posterior degradación (St. Pierre *et al.* 1994).

Otro mecanismo por el cual la levadura es resistente a altas concentraciones de sales biliares, se centra en la acumulación de polioles y glicerol, como mecanismo para regular la presión osmótica de la célula. Moser y Savage (2001), indicaron que las especies de levaduras que toleran sales biliares contribuyen a la función de los microorganismos en el tracto gastrointestinal (Duncan, 2003).

En esta sección podemos mencionar que al igual que Psomas (2001) las cepas de estudio presentan tolerancia a intervalos de pH (principalmente ácidos) y concentraciones de sales biliares, además de un desarrollo a 35 °C, por lo que se

puede asegurar que cumplen con los criterios de selección para considerar su potencial probiótico.

6.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SOBRENADANTES DE *S. cerevisiae* SOBRE PATÓGENOS

6.3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En el cuadro 10, observamos que ambas cepas permitieron el crecimiento de los patógenos, sin producir halo de inhibición. Se empleó un testigo positivo *L. casei*, con la generación de compuestos antimicrobianos que logran la inhibición de patógenos, como *E.coli* y *Salmonella spp.*

Cuadro 10 Efecto de sobrenadantes sobre el crecimiento de patógenos

Cepa	FLORIDA 2	ATCC 9763	L. casei
L. monocytogenes	+	+	+
E.coli	+	+	diam: 1.4 cm/ halo 3 cm
Salmonella spp.	+	+	diam: 1.84 cm/ halo 4 cm
S. aureus	+	+	+

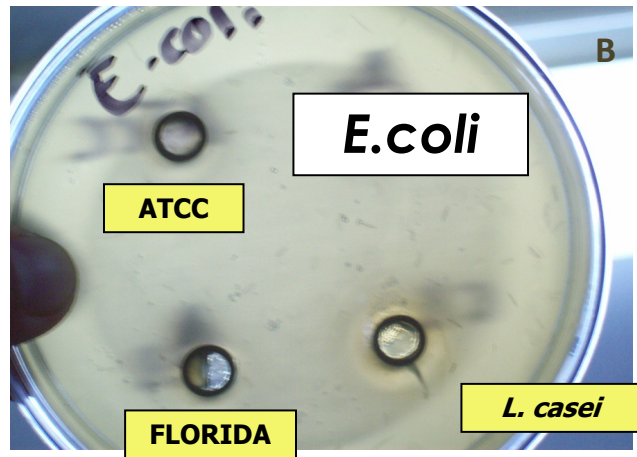
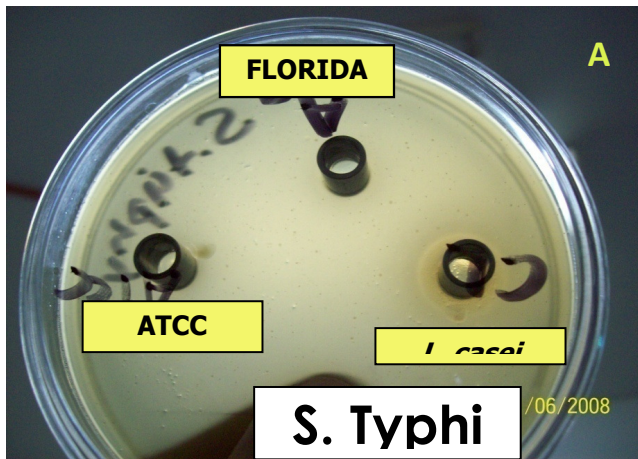


Figura 3 A. Efecto de los sobrenadantes a *S. Typhi*. B. Efecto de sobrenadantes en *E. coli*

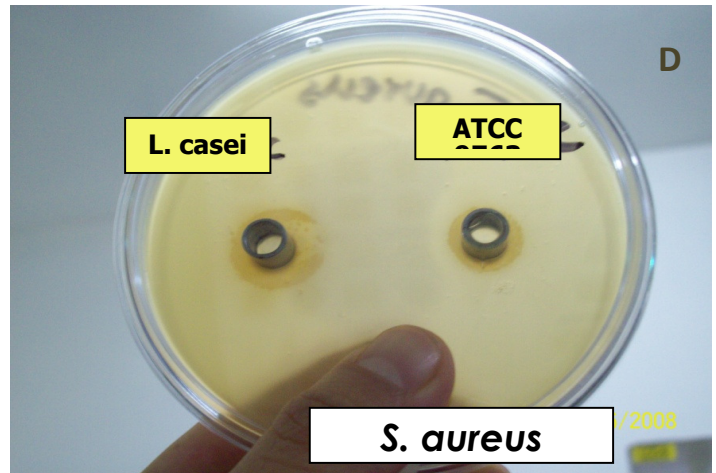
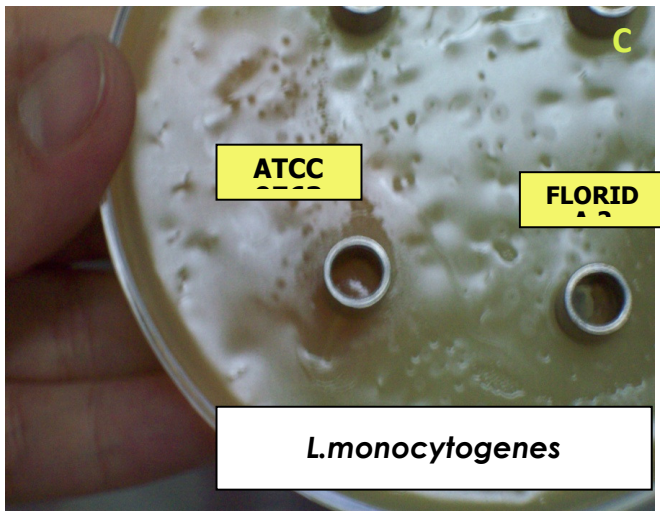


Figura 4 C. Efecto de los sobrenadantes a *L. monocytogenes* D. Efecto de sobrenadantes en *S. aureus*

De lo anterior podemos establecer que *S. cerevisiae* no posee actividad antimicrobiana o genera compuestos que contribuyan a la inhibición de los patógenos presentes en éste estudio. Por el contrario, en patógenos como *S. aureus*, las sustancias producidas en el sobrenadante, contribuyen a la propagación de éste.

Este ensayo de antagonismo frente a patógenos demostró que ninguna de las cepas de levaduras produce sustancias antimicrobianas que puedan difundirse al medio y sean capaces de contrarrestar in vitro el crecimiento de los patógenos evaluados, lo que confirma que el mecanismo de acción de las levaduras es diferente al de bacterias como *Lactobacillus* spp., o *Bifidobacterium* spp., que producen bacterioriocinas y ácido láctico. Las levaduras compiten por los sitios de adherencia y por la exclusión competitiva; lo que hace pensar que estas son más resistentes al ambiente gastrointestinal siendo su colonización y multiplicación más fructífera en comparación con los patógenos.

Dawson y colaboradores (1987), sólo reportan que *S. cerevisiae* puede aportar factores de crecimiento e incluso compuestos para la inhibición de toxinas. Sin embargo existe, *S. boulardii*, la cual puede convertir diferentes compuestos tóxicos en agentes mutágenicos.

Aunque no genere compuesto antimicrobianos puede realizar otro tipo de mecanismos que le permitan actuar como probiótico. *S. cerevisiae* contiene grandes cantidades de β -glucanos en su pared celular, que actúan como promotores de la activación inespecífica del sistema inmune. Estos compuestos, son polímeros de glucosa con uniones beta-(1-3) que se pueden encontrar en forma de partículas o en forma soluble y tienen capacidad inmunoestimulante, mediante la estimulación de macrófagos y neutrófilos y de esta forma protegen al huésped de infecciones. Probablemente lo que observamos en el ensayo pueda relacionarse con situaciones de estrés de la cepa donde se producen y liberan corticoides endógenos, que deprimen la respuesta inmune y se genera un desequilibrio en la flora intestinal, situación propicia para la colonización por patógenos (Pelizon et al, 2003).

6.4 ENSAYO DE ADHERENCIA

En este ensayo se expusieron ambas cepas a los patógenos empleados en éste estudio. Se verificó mediante la observación al microscopio el comportamiento tanto de las levaduras como de los patógenos. De acuerdo a la observación en microscopio, se observa que los microorganismos patógenos no se adhieren a la pared celular de la levadura, lo que se alcanza a

percibir es que pueden sobrevivir en el mismo medio, pero no interactúan entre sí (Ver Cuadro 11).

Cuadro 11. Adherencia de patógenos a *S. cerevisiae*

Cepa patógeno	Florida 2
<i>E.coli</i>	-
<i>Salmonella spp</i>	-
<i>S. aureus</i>	-
<i>L. monocytogenes</i>	-

Se reporta en la bibliografía que en estudios in vitro, la inhibición de la adherencia de patógenos como *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Enterococcus faecalis*, por bacterias ácido lácticas (Todokiri et al, 2001). McFarland (1994) reportó la disminución en la incidencia de diarrea causada por *Clostridium sp.* al administrar levaduras *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, sin embargo no se ha dilucidado si el mecanismo de adhesión y por lo tanto exclusión era usado por el probiótico para evitar la colonización del patógeno.

Por otro lado, Gedek (1999) reportó que cepas de *E.coli* enteropatógena y *Salmonella Typhi*, se unían a *S. cerevisiae* por receptores tipo lectina

dependiente de manosas o derivados de estas presentes en la pared celular de la levadura,

Es de gran importancia la adhesión a la mucosa intestinal para la modulación de la respuesta inmune del huésped y la exclusión de patógenos tales como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp*, *Listeria sp* o *Clostridium sp*. (Alander et al, 1999).

Aunque en éste estudio no se observó la adherencia de la levadura a los patógenos, Rubio (2007) evaluó cualitativamente la formación de agregados de *S. cerevisiae*, y la disposición de los patógenos en torno a dichos agregados, lo cual evidenció que las células de levadura forman agregados que evitarían in vivo la adherencia de los patógenos al epitelio gastrointestinal. Su evaluación mostró que los patógenos empleados como *Salmonella spp.* *E.coli* y en menor proporción de *Shigella spp.* , se adhieren. Aunque los mecanismos de acción de las levaduras utilizadas como probióticos son amplios, se reconoce que su acción no solamente se debe a la exclusión competitiva disminuyendo la adherencia del patógeno al epitelio gastrointestinal o la capacidad de adherirse a las microvellosidades intestinales, sino también al antagonismo.

CONCLUSIONES

- La cepa Florida 2 de *S. cerevisiae*, proporcionada por la empresa Ácidos Orgánicos y el ATCC 9763, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas a pH 2.92 a 5.8, por lo que tienen capacidad para resistir el paso por tracto gastrointestinal.
- Las cepas en estudio toleraron la presencia de sales biliares
- La cepa ATCC sobrevivió hasta 0.3 % de bilis, "Florida 2" tolero hasta 0.2 % de TCDA.
- Se demostró que ambas cepas no producen sustancias inhibidoras con algún efecto antimicrobiano.
- En la prueba de adherencia se observó que no se produce adhesión de los patógenos a la pared celular de la levadura.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos realizados, se puede inferir que la cepa Florida 2 de *S.cerevisiae* en estudio, cumple sólo con dos puntos de los criterios para denominarla probiótico (tolerancia a pH y tolerancia a sales biliares).

BIBLIOGRAFÍA

- Agerholm, L.; Bell, M.L.; Grunwald, G.K. & Astrup, A. 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
- Adams M.R, *Progress in Industrial Microbiology*. Vol 23. Ed.. Elsevier (1986).
- 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
- Bruce M. Carlson (2004). *Human Embryology and Developmental Biology*, 3rd edition, Saint Louis: Mosby
- Collins, C.H., Lyne, P. *Mètodos microbiològics* , Editorial Acribia, Zaragoza, España, 524 pg.
- Condon, R.; Mariné, A.; Rafecas, M. 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

.DeSimone, C.; Rosati, E.; Moretti, S. 1991 Probiotics and stimulation of the immune response. Eur J Clin Nutr 45:32-4.

Drew Stephen, The practice of Biotechnology: current commodity products, Comprehensive Biotechnology. . Volume 3. Ed. Harvey W. (1985)

Duncan S, Scott K, Ramsay A, Harmsen H, Gjalt W, Colin S, et al. Effects of Alternative Dietary Substrates on Competition between Human Colonic Bacteria in an Anaerobic Fermentor System. Appl Env Microbiol 2003; 69: 1136-1142.

Farnworth, E.R., 2001. Probiotics and prebiotics. In Handbook of Nutraceutical and functional foods [RE Wildman] Ed. C.R.C. Press. 25: 407 – 422.

Ferrer, B y Dalmau, J. 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 Biotecnológicos. Instituto de Ciencia Animal e Instituto de Farmacia y Alimento. La Habana. Cuba.

Gimeno, C.J. and G.R. Fink. 1992. The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* 257: 626. . Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2100-2112.

Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles, and G.R. Fink. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090. Grenson, M., M. Mousset

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.

Hirayama, K y Rasfter, J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2 (6) 681-686.

Jin, L.Z., Ho , Y.W. Abdullah, N, and Jalaludin, S (1998). Neid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology* 27, 183-185.

- Kiebling, G.; Schneider, J. & Jahreis, G. 2002. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: 843.
- Kingsley C. Anukam Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology- 466-474
- Lim, H.; Kim, S.; Lee, W. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *Journal of Veterinary Science* 5: 391-395.
- Marteau, P.; Minekus, K.; Havenaar, R.; Huis 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.; Rodríguez, Z.; Savón, L.; Dihigo, L.; 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.
- Méndez-Vilas (Ed.) 2007 Koop-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001;101(No 2):229-238, 241.

- Membré JM, Kubaczka M, Chene C. Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a Bakery Product Spoilage Yeast. *Appl Env Microbiol* 1999; 69(2): 1136-1142.
- Mitsui K, Yasui H, Nakamura N, Kanazawa H. Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1720: 125-136.
- Montiel Avendaño F., Flora bacteriana habitual , *Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.*1997; 26:133-139
- Moser SA, Savage DC. Bile Salt Hydrolase Activity And Resistance To Toxicity Of Conjugated Bile Salts Are Unrelated Properties In *Lactobacilli*. *Appl Env Microbiol* 2001; 67(8): 3476-3480.
- Mulder, R. 1991. Probiotics as a tool against salmonella contamination. *World Poultry*. 33-37.
- Nadathur, S.R.; Gould, S.J.; Bakalinsky, A.T. 1995. Antimutagenicity of an acetone extract of yoghurt. *Mutat Res*;334 (2):213-24.
- Nader de Macías, M.E.; Apella, M.C.; Romero, N.C.; González, S.N.; Oliver, G. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. *J Appl Bacteriol* 1992;73:407-411.

- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(1),13-126.
- 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.
- Oliveira Fuster, Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición hospitalaria*, Unidad de nutrición clínica, Hospital regional Universitario, España 2007.
- Orberá T., Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba, Cuba

- Otero V, E. Valenzuela, M.A. Sotomayor, y J. Rodríguez. 1999. Aspectos nutricionales e inmunoestimulación. V Congreso ecuatoriano de acuicultura, Guayaquil, Ecuador.
- Palou, A. and F. Serra. 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación Nutrición y Salud 7: 76-90.
- Pardio VT, Krzysatof N, Waliszewski KN, Robledo G. Los probióticos y su futuro. Arch Latinoam Nutr 1994;46(81):6-10.
- Perdigón, G.; Álvarez, S.; Rachid, M.; Agüero, G.; Gobbato, N. 1995b. Immune system stimulation by probiotics. Symposium: Probiotic Bacteria for Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. J Dairy Sci;78:1597-606.
- Pérez de Rozas, Ana, Roca Mercé, 2003. El estudio de la diversidad intestinal por RFLP. Departamento de Producción animal, ETSI Agrónomos de Madrid. Bellaterra Barcelona, 31-45
- Pino, A.; Dihigo, E. 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, San José de las Lajas, Habana, 176 p.

- Psomas, E., Fletouris, D. 2003, Assimilation of Cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese *Journal of Dairy Science*, 86, 3416-3442.
- Robinson, R.K.; Samona, A. 1992. Health aspects of bifidus products: a review. *Int J Food Sci Nutr* ;43:175-180.
- Saloff, C. 1995. Fermented milks: effects on the immune system. *Danone World Newsletter*; 9:2-8. 31. *Science USA*, 1994, 91, 9476-9479.
- 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.; Jones, P.J. 2000. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *Am J Clin Nutr* 71: 674-681.
- St Pierre, M., Ruetz, S., ATP-dependent transport of organics anions in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of National Academic*
- Saavedra, Jose. 2001, Clinical applications of probiotic agents, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, , 1147S-1151S

Swientek, B. Beneficial Bacteria. 2007 Prebiotics and probiotics work in tandem to stimulate a healthy microflora in the gastrointestinal tract. Food productdevelopment.

Sychrovae H, Ramirez J, Peña A. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Let* 1999; 171: 167-172.

Trapp, C.L.; Chang, C.C.; Halpern, G.M.; Kent, C.L.; Gershwin, M.E. The influence of chronic yogurt consumption in population of young and elderly adults. *Int J Immunother* 1993; IX:53-64.

Texeira A.A., Hantobani and Moroes, 2006, Inhibition of *Listeria monocitogenes* by a lactic acid bacterium disolates from italian salam food. *Microbial* 23:213-219.

Vanderhoof, J.A.; Young, R.J. 1998. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 27: 323-332.

Vesterlund, S. (2004) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* ed. Salminen, S.A., von Wright, A. and Ouwehand, A.C. pp. 375–395.

Vigliano, F. A.; Quintáns, M. L.; Bermúdez, R.; Quiroga, M.I. & Nieto, J. M. 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.

Yépez, Y., Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores nivel de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A., Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 1995.

USRL

1. <http://www.jrs.de/wSpanisch/anwend/food/prolac.shtml>
2. <http://www.fao.org/es/ESN/probio/probio.htm> (FAO, 2001)
3. http://www.mifarmacia.es/contenido/articulos/articulo_n_probioticos.htm (Fuertes, A. Los probióticos. Bacterias beneficiosas y bacterias indeseables)

4. http://www.microbiologia.org/microbiosen_linea/capitulo20. (González & Valenzuela 2003, *Saccharomyces cerevisiae* Universidad Autónoma de México).
5. http://www.preparedfood.com/archives/2001_01/0101toc.htm

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES EMPLEADAS

- Agar YPG

Composición: Dextrosa 20 g, Peptona de gelatina 10 g, Extracto de Levadura 10 g, Agar 18 g, Agua destilada 1000 mL

Mezclar los ingredientes en el agua y disolver por calentamiento. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- Caldo y agar BH Marca DIBICO
- Solución de sales biliares al 5% (TDCA ácido taurodeoxicólico, Sales biliares No. 3).
- Solución Buffer (Fosfato de potasio monobásico).
- Solución de ácido tartárico al 10%
- Solución de Hidróxido de Sodio al 10 %