

Evaluación *in vitro* de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos

In vitro evaluation of prebiotics in hydrolysates of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) prepared by different methods

Manuel Pérez Quintana^{*1}, Grethel Milian Florido², Ramón Bocourt Salabarría³, Reinaldo Alemán Pérez¹

¹ Departamento de Ciencias de la Tierra, Universidad Estatal Amazónica. Puyo, Pastaza, Ecuador.

² Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas, Cuba.

³ Departamento de Fisiología del Instituto de Ciencia Animal. San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

* **Correspondencia para el autor:** mpquintana1960@gmail.com

Resumen

Se compararon los contenidos en sustancias prebióticas *in vitro* (oligosacáridos totales y de glucanos y mananos) en hidrólisis de *Saccharomyces cerevisiae* de destilería de alcohol y de sus paredes celulares ante diferentes hidrólisis: enzimática con un crudo de *Bacillus subtilis* E-44, básica, ácida, autolítica y tratamiento térmico. Cada hidrolizado se centrifugó para determinar oligosacáridos totales, los que mostraron valores de 4.52 mg/ml para la hidrólisis enzimática y de 3.98 mg/ml para básica. Similar comportamiento se mostró en glucosa y manosa para la fracción de oligosacáridos totales. Oligosacáridos de glucanos y mananos, de la hidrólisis de levadura y sus paredes celulares, fueron superiores en la hidrólisis enzimática. El comportamiento en el tiempo de los oligosacáridos y los azúcares reductores, durante la hidrólisis enzimática, mostró una relación de $R=0.98$, lo que posibilita usar el contenido de azúcares reductores como control durante el proceso de hidrólisis. Se realizó un estudio microbiológico al hidrolizado enzimático con un comportamiento favorable. Este fue estable en seis meses a temperaturas ambiente y de refrigeración.

Palabras clave: Hidrólisis, oligosacáridos de glucanos y mananos, *S. cerevisiae*.

Abstract

Comparison was made of the contents in *in vitro* prebiotic substances (total oligosaccharides and glucan and mannan oligosaccharides) in hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* distilling alcohol and its cell walls using different hydrolysis techniques: enzymatic with a raw *Bacillus subtilis* E-44, basic, acid, autolytic and heat treatment. Each hydrolyzate was centrifuged to determine total oligosaccharides, which showed values of 4.52 mg / ml for enzymatic hydrolysis and 3.98 mg/ml for basic hydrolysis. Similar behavior was shown in glucose and mannose for the total oligosaccharides fraction. Glucan and mannan oligosaccharides from yeast cell wall hydrolysis were superior in the enzyme hydrolysis. Behavior over time of the oligosaccharides and reducing sugars during enzymatic hydrolysis showed a ratio of $R=0.98$, which makes it possible to use reducing sugar content as control during the hydrolysis process. A microbiological study was conducted of enzymatic hydrolyzate with a favorable behaviour. This was stable in six months at ambient and refrigerated temperatures.

Key words: Hydrolysis, glucan and mannan oligosaccharides, *S. cerevisiae*.



Recibido: 3 de marzo, 2016
Aceptado: 31 de mayo, 2016

Introducción

El hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* está constituido fundamentalmente por oligosacáridos de glucanos y mananos, péptidos de bajo peso molecular, vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos, entre otros componentes (Ngyuen, Fleet & Rogers, 1998; Barton, Delneri, Oliver, Rattray & Bergman, 2010). Este producto es conocido comercialmente como extracto de levadura, hidrolizado de proteínas o polvo saborizante (Couto *et al.*, 2014).

La pared celular de *S. cerevisiae* puede constituir aproximadamente el 30 % de su peso seco y es responsable del sostén mecánico de la célula. Aproximadamente el 90 % de la pared está compuesta por polisacáridos de glucanos y mananos, de 5 a 10 % de proteínas y menos del 1 % de lípidos (Tanaka & Watanabe, 1995; Faria *et al.*, 2014). Los principales componentes de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* son manano-proteínas y glucanos en proporciones más o menos iguales y pequeñas cantidades de N-acetilglucosamina (Orlean, 2012). La pared de *S. cerevisiae* posee dos fracciones de manoproteínas, una puede ser extraída con dodecilsulfato de sodio y otra aislada por digestión enzimática con β (1.3) glucanasa; la fracción de glucano también es extraíble por métodos químicos y por digestión enzimática (Luna *et al.*, 2013). Cuando la célula de levadura es sometida a un proceso de hidrólisis física, química o enzimática, se liberan los oligosacáridos de mananos y glucanos, que son dos importantes sustancias con acción biológica prebiótica (Alltech, 1996; Arce, Ávila & López, 2008; Sánchez, 1997; Badia *et al.*, 2012).

La levadura hidrolizada para el presente trabajo se obtuvo a partir de un desecho de la industria de producción de alcohol y derivados, con elevado contenido en *Saccharomyces cerevisiae*, que en su mayoría constituye un elemento contaminante del medio ambiente (Steensels *et al.*, 2014). Las levaduras son utilizadas durante muchos años como fuente primaria para la alimentación de los

animales de granja, su uso principal, por esta vía, ha sido la suplementación proteica y vitamínica del complejo B en los concentrados (Herrera, Murillo, Berumen, Páez & Villarreal, 2014). En las últimas décadas, los cultivos de levaduras se han usado por los efectos prebióticos sobre la digestibilidad de nutrientes, la mejora en el balance de la microflora intestinal y del crecimiento animal (Galindo *et al.*, 2010; Bazay *et al.*, 2014).

Según Bertsch *et al.* (2010) y Pizarro, Ronco y Gotteland (2014), en la hidrólisis de los polisacáridos de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*, cuando sus productos de hidrólisis se van a emplear como aditivos nutricionales, es preferible utilizar la hidrólisis enzimática, que tiene lugar en condiciones biológicas suaves de pH, temperatura y presión. Las hidrólisis química y física, por su parte, destruyen en alguna medida sustancias de interés biológico a diferencia de la selectividad de la hidrólisis enzimática (Flores, Caballero & Moreira, 2008). No obstante, es necesario que los resultados de la hidrólisis enzimática, en cuanto a contenidos en oligosacáridos de glucanos y mananos, sean similares a los obtenidos mediante otros tipos de hidrólisis. En el presente trabajo se establece una comparación *in vitro* de oligosacáridos totales, así como de oligosacáridos de glucanos y mananos, de la hidrólisis total y de las paredes celulares de levadura residual de destilería de alcohol, ante diferentes hidrólisis.

Brasil, México y Colombia, entre otros países, investigan el uso de energías renovables a partir del azúcar y el etanol, cuyos procesos generan levadura residual que puede convertirse en elemento contaminante (Aguilar, 2007).

En la última década han surgido investigaciones a partir de la hidrólisis de los polisacáridos de paredes celulares de *S. cerevisiae* (Pizarro, Sebastián & Martín, 2014), sin embargo, son escasos los informes en la literatura sobre los resultados de levadura residual hidrolizada proveniente de la producción de alcoholes con fines prebióticos, a partir de la composición en

sustancias prebióticas in vitro (oligosacáridos totales y en oligosacáridos de glucanos y mananos), de la hidrólisis de sus paredes celulares, ante diferentes hidrólisis.

Materiales y métodos

Metodología experimental

Crema de levadura utilizada: Se empleó una crema de levadura con un 85 % de células no viables. Se eliminó el exceso de humedad por sedimentación y fue lavada tres veces con agua destilada para eliminar impurezas. La crema final contenía un 60 % de humedad.

Cultivo de *Bacillus subtilis* E-44: El cultivo de *Bacillus subtilis* E-44 fue obtenido por Pérez *et al.* (2000). Fue crecido en el medio de cultivo de Pérez, *et al.* (2007). Al cabo de 32 horas de cultivo fue obtenido el crudo enzimático utilizado posteriormente en la hidrólisis de la levadura.

Hidrólisis utilizadas: Enzimática, con un crudo de la cepa de *Bacillus subtilis* E-44, de acuerdo con Pérez *et al.* (2000); básica y ácida (Otero & Cabello, 2007; Mejía, Albán, Murcia, Cuervo & Durán, 2009); tratamiento térmico de la levadura a 95 °C durante 30 minutos (Mejía *et al.*, 2009), y auto hidrólisis (Otero *et al.*, 2007). Finalizado este proceso, cada hidrolizado fue centrifugado a 1 500 g durante 15 minutos. El sobrenadante se conservó a -20 °C hasta su análisis posterior.

Cuantificación de oligosacáridos

La cuantificación de oligosacáridos totales se hizo a la crema de levadura íntegra, lavada para eliminar impurezas. Se realizó una extracción con disolventes orgánicos por el método de Folch (1957) que consiste en una mezcla de cloroformo/metanol a razón 2/1, para eliminar lípidos y algunas proteínas presentes, seguido por una precipitación con etanol al 75 %, para remover polisacáridos y algunas proteínas aún en solución (Rincón & Albarracín, 2013).

Finalmente se pasó la muestra a través de una columna C18 (fase reversa) para eliminar péptidos y otros materiales hidrofóbicos (Ramírez, Sierra & López, 2006). A esta muestra se le determinó oligosacáridos totales por el método del fenol sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956) y se realizó la hidrólisis de la levadura hasta monosacáridos para cuantificar glucosa y manosa por cromatografía gaseosa, previa derivatización como TMS-oxima (Blagoeva, Stoev & Venov, 1991).

Oligosacáridos de pared celular de *S. cerevisiae*

El aislamiento de paredes celulares de *S. cerevisiae* se realizó según el protocolo de Rinsum, Frans y Herman (1991). Para ello se colectaron las células de levaduras por centrifugación a 1 000 rpm durante 20 minutos, se lavaron tres veces con solución amortiguadora 10 mM tris-HCL, pH 7.4, conteniendo 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Se suspendieron 0.1 g de masa celular fresca en 1 ml de solución amortiguadora tris-HCL, pH 7.4, conteniendo 1 mM-PMSF y se agitaron en agitador vortex con perlas de vidrio a 0 °C por 1 minuto. Las paredes celulares fueron centrifugadas y lavadas tres veces con 1 moles/litro de NaCL, conteniendo 1 mM-PMSF y tres veces con 1 mM-PMSF y conservadas a 4 °C hasta la hidrólisis. La hidrólisis de pared se hizo con un crudo enzimático de *Bacillus subtilis* E-44 (Pérez *et al.*, 2009).

Separación de oligosacáridos de la hidrólisis de *S. cerevisiae* residual de la producción de alcoholes

Para la separación de los oligosacáridos de manosa y glucosa se procedió según las recomendaciones de Rinsum *et al.* (1991), quienes utilizaron la cromatografía de afinidad con el empleo de sepharosa 6B unida a concanavalina A (Farmacia, Uppsala, Sweden). Se empleó una columna equilibrada con el tampón 50 mM-Tris-HCL, pH 7.4, conteniendo 0.5 mol.L⁻¹ de NaCl con una velocidad de elución de 0.2 ml por minuto. La manosa y glucosa

fueron cuantificadas por el método colorimétrico de Dubois *et al.* (1956) en soluciones de manosa y glucosa puras como patrones.

Posteriormente se realizó un estudio de comportamiento en el tiempo de los contenidos de oligosacáridos de glucanos y mananos durante el proceso de hidrólisis, para lo cual fueron tomadas las muestras cada seis horas.

Estudio microbiológico al hidrolizado enzimático

Se determinó conteo de totales, *Lactobacillus*, levaduras y coliformes.

Estudio de estabilidad al hidrolizado enzimático

Durante un periodo de seis meses, a temperatura ambiente y refrigeración (4-8 °C), se evaluó la estabilidad del producto hidrolizado enzimático, se le determinaron contenidos de azúcares reductores, nitrógeno amínico, aeróbicos totales y pH.

Tratamiento estadístico

Para el análisis de los resultados se empleó el programa estadístico INFOSTAT versión 1 (Belzarini, Casanoves, Di Rienzo, González & Robledo, 2001). Para el tratamiento estadístico de los datos se realizaron análisis de varianza con diseño completamente aleatorizado y, para verificar diferencias significativas, se utilizó la Prueba de comparación de Duncan (1955).

Resultados

Oligosacáridos totales de levadura *S. cerevisiae* hidrolizada

En la figura 1 se observan los valores promedios de oligosacáridos totales obtenidos a partir de los diferentes tipos de hidrólisis utilizados. El mejor comportamiento se muestra en el tipo de hidrólisis enzimática con *B. subtilis* E-44 con 4.52 mg/ml. A continuación la hidrólisis básica con 3.98 mg/ml, pero difiriendo de la primera (P<0.01). Las restantes hidrólisis mostraron niveles de oligosacáridos totales mucho más bajos.

Los contenidos de oligosacáridos de glucanos y mananos, de la crema de levaduras *S. cerevisiae* ante estas hidrólisis se presentan en la figura 2. Se evidencian los mayores niveles (P<0,01) para el tipo de hidrólisis enzimática con *B. subtilis* E-44 con 3.08 mg/ml de oligosacáridos de glucanos y 1.55 mg/ml de oligosacáridos de mananos. La hidrólisis básica mostró 2.85 mg/ml de oligosacáridos de glucanos y 1.40 mg/ml de mananos, pero difiriendo de la primera.

En la figura 3 se aprecian los contenidos de los monosacáridos de glucosa y manosa para cada fracción de oligosacárido total. En ella se muestran los mayores niveles (P<0.01) de glucosa y manosa para la hidrólisis enzimática con *Bacillus subtilis* E-44.

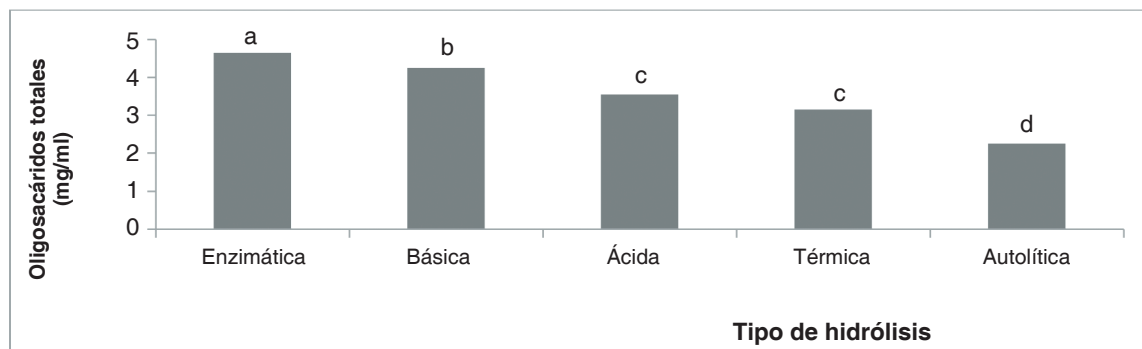


Figura 1. Valores promedios de oligosacáridos totales obtenidos de diferentes tipos de hidrólisis. ^{a,b,c,d} Letras diferentes entre tipos de hidrólisis difieren para P<0.05 (Duncan, 1955) P<0.01

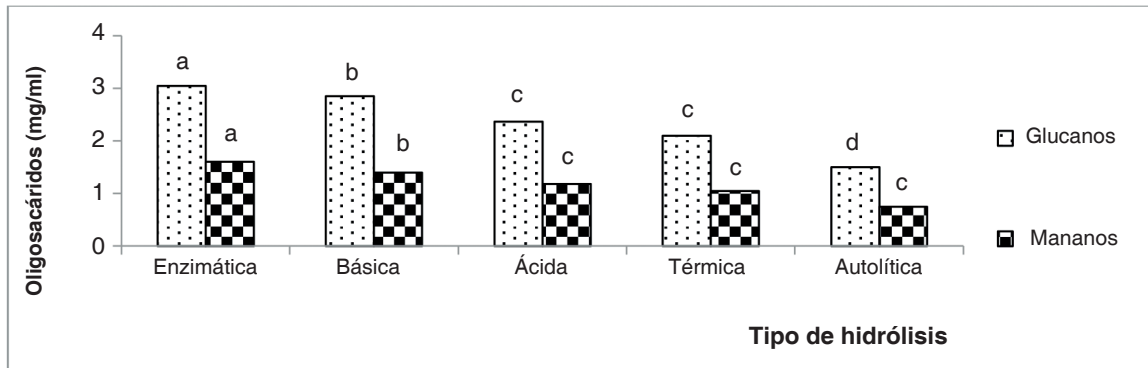


Figura 2. Contenidos de glucanos y mananos según la hidrólisis utilizada. ^{a,b,c,d} Letras diferentes entre tipos de hidrólisis difieren para $P < 0.01$ (Duncan, 1955)

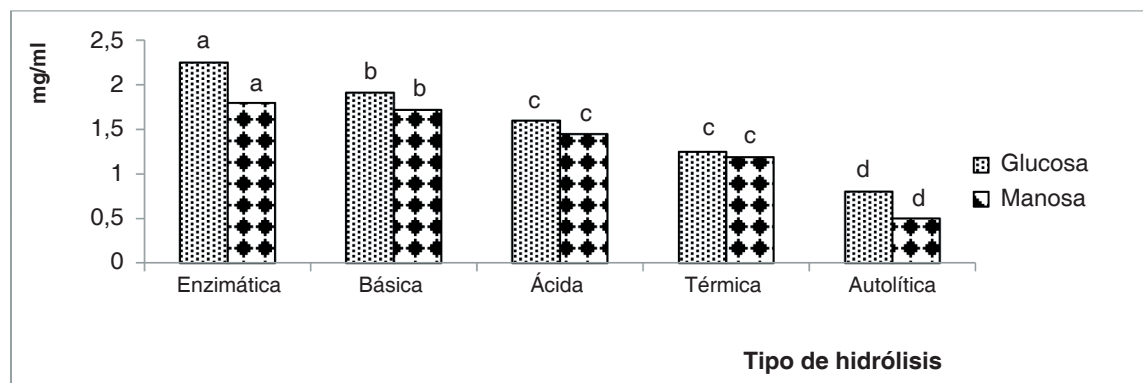


Figura 3. Contenidos de glucosa y manosa en mg/ml según tipos de hidrólisis. ^{a,b,c,d} Letras diferentes entre tipos de hidrólisis difieren para $P < 0.01$ (Duncan, 1955).

Oligosacáridos de pared de levadura *S. cerevisiae* hidrolizada

En la figura 4 se observa el contenido de oligosacáridos de glucanos y mananos en los hidrolizados enzimáticos y básicos para paredes

celulares de *S. cerevisiae*. El contenido de oligosacárido de glucanos y mananos para la hidrólisis enzimática fue de 1.76 y 1.52 mg/ml, respectivamente. Estos valores difieren ($P < 0.001$) de los obtenidos para la hidrólisis básica (0.62 y 0.06 mg/ml).

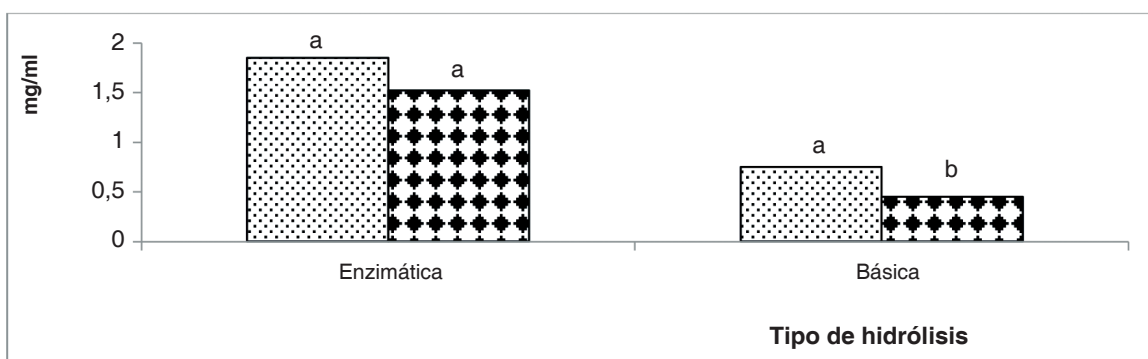


Figura 4. Contenidos oligosacáridos de glucanos y mananos de la hidrólisis enzimática y básica de paredes celulares aisladas de *Saccharomyces cerevisiae*. ^{a,b} Letras diferentes entre tipos de hidrólisis difieren para $P < 0.001$ (Duncan, 1955).

Comportamiento en el tiempo de los contenidos de oligosacáridos de glucanos y de mananos de hidrólisis enzimática de pared de *S. cerevisiae*

El comportamiento en el tiempo de los contenidos de oligosacáridos de glucanos y de mananos con la hidrólisis enzimática de pared de *S. cerevisiae* se muestra en la figura 5. Se observa un incremento en los contenidos de ambas con un máximo a las 16 horas de hidrólisis.

Caracterización del hidrolizado enzimático

En la tabla 1 se muestra una relación alta ($R=0.97^{***}$) que existe entre los contenidos

de azúcares reductores y los valores de oligosacáridos de glucanos y mananos durante el tiempo de obtención del hidrolizado enzimático. Ello posibilita usar el contenido de azúcares reductores como control durante el proceso de hidrólisis.

El análisis microbiológico del hidrolizado enzimático se presenta en las tablas 2 y 3. En ellas se observan los valores de conteo de aeróbicos, anaerobios mesófilos, esporas termófilas, esporas fúngicas viables y levaduras viables. No se muestran diferencias para estos conteos entre los meses en estudio. Por otro lado, no hubo presencia de anaerobios mesófilos ni termófilos, coliformes totales ni fecales, *staphylococos*, *salmonellas* y *pseudomonas aeruginosa*.

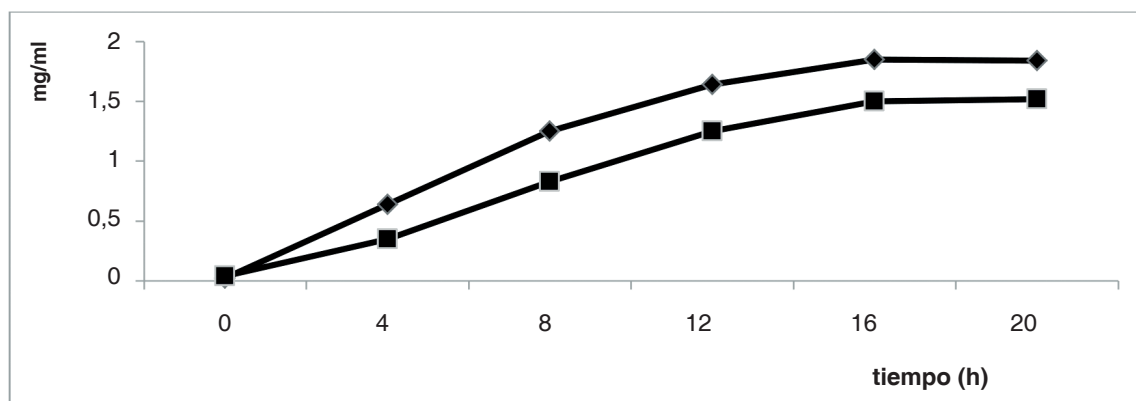


Figura 5. Comportamiento en el tiempo de los contenidos de oligosacáridos de glucanos y de mananos de hidrólisis enzimática de pared de *S. cerevisiae*.

Tabla 1. Relación entre los valores de azúcares reductores totales y los contenidos de oligosacáridos de glucanos y de mananos.

Tiempo (h)	Azúcares reductores totales (mg/ml)	Oligosacáridos de glucanos (mg/ml)	Oligosacáridos de mananos (mg/ml)	Azúcares reductores totales (mg/ml)
0	0.05	0.02	0.01	
4	4.50	0.43	0.15	
8	5.64	0.85	0.35	
12	11.55	1.09	0.66	0.3457***
16	14.67	1.30	0.86	R=0.97
20	14.73	1.29	0.84	
24	14.65	1.31	0.81	
28	14.61	1.30	0.83	
32	14.83	1.28	0.83	

*** $P < 0.001$

Tabla 2. Análisis microbiológico a cinco muestras procedentes de hidrólisis enzimática de *S. cerevisiae*.

Examen bacteriológico (ufc/ml)	Muestras de cinco hidrólisis enzimáticas				
	1	2	3	4	5
Aerobios mesófilos totales	>3x10 ⁵	>3x10 ⁵	>3x10 ⁵	>3x10 ⁵	>3x10 ⁵
Recuento de esporas termófilas	90	110	20	110	100

Tabla 3. Análisis de microorganismos patógenos a cinco lotes de hidrolizado enzimático.

Microorganismos patógenos (ufc/ml)	Muestras de cinco hidrólisis enzimáticas				
	1	2	3	4	5
Conteo de esporos fúngicos viables	10	20	10	10	18
Conteo de levaduras viables	<10	<10	<10	<10	<10

Estabilidad en el tiempo del hidrolizado enzimático (enero a junio)

Se realizó un estudio de estabilidad por un periodo de seis meses (tablas 4 y 5), tanto a

temperatura ambiente (24±4 °C) lo mismo que en refrigeración (4-8 °C). Al producto hidrolizado enzimático se le determinaron los contenidos de azúcares reductores, nitrógeno amínico, aeróbicos totales y pH.

Tabla 4. Estabilidad del hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* durante seis meses a temperaturas entre 4 y 8 °C.

Tiempo (meses)	Azúcares reductores (mg/ml)	ES±	Nitrógeno amínico (mg/ml)	ES±	Aerobios totales U.F.C.ml ⁻¹	ES±	pH	ES±
Septiembre	16.0		36.0		3.0x10 ³		5.52	
Octubre	16.0		36.0		3.2x10 ³		5.52	
Noviembre	16.0	0.010	36.0	0.011	3.1x10 ³	125	5.50	0.012
Diciembre	15.9		36.0		3.0x10 ³		5.50	
Enero	16.0		36.0		3.4x10 ³		5.50	
Febrero	16.0		35.7		3.4x10 ³		5.50	

Tabla 5. Estabilidad del hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* durante seis meses a temperatura ambiente (24 ± 4 °C).

Tiempo (meses)	Azúcares reductores (mg/ml)	ES±	Nitrógeno amínico (mg/ml)	ES±	Aerobios totales (UFC.ml ⁻¹)	ES±	pH	ES±
Septiembre	16.0		36.0		3×10^5		5.52	
Octubre	16.0		36.0		3×10^5		5.52	
Noviembre	16.0	0.04	35.5	0.10	3×10^3	120	5.46	0.013
Diciembre	15.9		35.0		3×10^3		5.40	
Enero	15.0		34.4		3×10^3		5.37	
Febrero	15.1		34.6		3×10^3		5.42	

Discusión

Los oligosacáridos derivados de levadura son usados como prebióticos en animales y humanos, porque ayudan al balance de la microflora intestinal y contribuyen al fortalecimiento del sistema inmunológico (Domínguez, Vázquez & Ramos, 2009; Galindo *et al.*, 2010; Patel & Goyal, 2012). En el presente trabajo se obtiene un hidrolizado con niveles altos de estas sustancias prebióticas, a partir de *S. cerevisiae* por hidrólisis enzimática, lo que permite reforzar sus propiedades al ser consumidas, por cuanto fortalece el sistema inmune y propicia un adecuado balance microbiano en el intestino (Samir, *et al.*, 2012; Corzo, *et al.*, 2015).

Fue necesario la obtención del producto hidrolizado enzimático, donde se evaluó el crudo de *Bacillus subtilis* E-44, como agente hidrolítico obtenido en trabajo previo (Milian *et al.*, 2013). Aunque se trata de un hidrolizado íntegro, el enfoque principal se orienta a los componentes de la hidrólisis de la pared (oligosacáridos de mananos y glucanos) debido a los antecedentes en la literatura como promotores del crecimiento en animales (Spring, Dawson, Newman & Wenks, 1996; Stanley, Gray & Hygnius, 1996; Badia *et al.*, 2012). Este hidrolizado posee otras sustancias en su composición como células viables o endosporas de *Bacillus*, pequeñas cantidades de vitaminas, fundamentalmente del complejo B y

aminoácidos (Yoo, Chang, Lee, Charg & Moon, 1997; Barton, Delneri, Oliver, Rattray & Bergman, 2010; Quintero, Montoya & Gutiérrez, 2010). No obstante, por las pequeñas cantidades de estos componentes en el producto y en las dietas, sus efectos pudieran ser de menor importancia comparados con la posibilidad de potenciar, el efecto prebiótico con los oligosacáridos de mananos y de glucanos.

El empleo de enzimas microbianas para la obtención de los productos de hidrólisis de la pared de *S. cerevisiae* es ventajoso debido a los elevados volúmenes de estas enzimas que pueden producirse en tiempo breve a bajo costo (Tanaka & Watanabe, 1995; Niehaus, *et al.*, 2011). Las enzimas microbianas se obtienen fundamentalmente a partir de medios de cultivo con materias primas baratas (miel final, autolizado de levadura torula y CaCl_2). Esto, sumado al hecho que la levadura es un subproducto de la industria de producción alcohólica, hace que el costo de obtención de estos hidrolizados sea bajo.

Para la determinación de componentes derivados de las levaduras, ya sea el β -1-3 glucano, mananos u otros, se emplea la hidrólisis química (Sánchez, 1997). Sin embargo, en este trabajo, por tratarse de un hidrolizado íntegro, donde se precisa preservar los componentes con actividad biológica, la hidrólisis con enzimas microbianas resultó más conveniente. El crudo enzimático

empleado para la hidrólisis de la levadura tiene actividad proteasa, glucanasa y manosidasa, lo que unido a la elevada actividad en estas mismas enzimas en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* justifica, tanto los altos contenidos de oligosacáridos totales como de glucano y manano (Liu, Prokopakis y Asenjo, 1997).

Es compleja la hidrólisis de paredes celulares de levaduras, que tienen dos capas principales, una externa formada por un complejo de manoproteínas y otra interna que es un complejo de β -1-3 y β -1-6 glucanos y pequeñas cantidades de N-acetilglucosamina (Rinsum *et al.*, 1991; Aguilar, Solís Pacheco & François, 2005). Según un estudio realizado por Rinsum *et al.* (1991) la relación promedio de manosa-glucosa contenida en la pared de *Saccharomyces cerevisiae* es de 4-18, pero después de un proceso de hidrólisis y purificación esta pasa a 53-3, lo que coincide con lo presentado en este trabajo.

La conservación es muy importante es este tipo de hidrolizado. El hidrolizado enzimático fue estable en su composición, a temperatura ambiente (24 ± 4 °C) y en refrigeración (4-8 °C) durante seis meses. Los niveles de azúcares reductores, nitrógeno amínico, aeróbicos totales y pH no variaron durante este período. Las causas de esta estabilidad pudieran estar dadas por las elevadas concentraciones de ácidos orgánicos en la crema *Saccharomyces cerevisiae* empleada como principal materia prima, así como por la temperatura mantenida durante su obtención (45-50 °C), la concentración de NaCl (3%) y la utilización de fenol como agente conservante (0.3%). Este último muy común en la conservación de productos de origen biológico (Pérez *et al.*, 2009). Estas condiciones pueden haber determinado que los contenidos de microorganismos estudiados se encontraran en rangos normales durante seis meses de conservación.

Conclusiones

Se obtuvo un nuevo producto de la levadura residual del proceso de producción de alcoholes

con el empleo de enzimas microbianas de un cultivo de *Bacillus subtilis* E-44. Este hidrolizado tuvo mayores contenidos en sustancias prebióticas *in vitro* (oligosacáridos totales, así como en oligosacáridos de glucanos y mananos) en comparación con otros tratamientos, tanto de la hidrólisis de levadura residual, como de sus paredes celulares.

Fue efectiva la separación de oligosacáridos y la cuantificación de manosa y glucosa mediante cromatografía de afinidad. También fue favorable el estudio del comportamiento en el tiempo de los contenidos de oligosacáridos de glucanos y mananos durante el proceso de hidrólisis, la estabilidad del hidrolizado y su elevada calidad microbiológica.

Referencias bibliográficas

- Aguilar Rivera, N. (2007). Bioetanol de la caña de azúcar. Avances en investigación Agropecuaria, 11(003): 25-39.
- Aguilar, B. Solís, J. & François, J. (2005). Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Nosis.*, 3(12): 1-8.
- Alltech (1996). BIO-MOS in the Poultry Industry. Biotechnology in the feed industry. Supplement to the Proceedings of Alltech's Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 12mo. Annual Symposium (edited by Lyons T. P. Nicholasville USA).
- Arce Menocal, J., Avila Gonzalez, E. & López Coello, C. (2008). Comportamiento productivo y cambios morfológicos en vellosidades intestinales del pollo de engorda a 21 días de edad con el uso de paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae*. *Vet. Méx.* [online], 39(2): 223-228.
- Badia R, Brufau M., Guerrero-Zamora A., Lizardo R., Dobrescu I., Martín-Venegas R, Ferrer R., Salmon H., Martínez P., Brufau J. (2012). β -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against Salmonella

- enterica serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(3): 368-376.
- Badia R., Zanello Galliano, C., Lizardo Rosil, M., Martínez Paz, B. & Henri S. (2012). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and b-galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Veterinary Research.*, 43: 2-11.
- Barton M., Delneri O., Rattray, B. (2010). Evolutionary Systems Biology of Amino Acid Biosynthetic Cost in Yeast. *PLoS One*, 5(8): 1-13.
- Bazay D., Carcelén G., Jiménez M., González R. & Quevedo R. (2014). Efecto de los manano-oligosacáridos sobre los parámetros productivos de cuyes (*Cavia porcellus*) durante la fase de engorde. *Rev. Investig. Vet. Perú* [online], 25(2): 198-204.
- Belzarini, M.G., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., González L.A., & Robledo, C.W. (2001). INFOSTAT. Versión 1. Córdoba, Argentina.
- Bertsch A., Domínguez G., de Basilio A., Mazzani B., Luzón O. & Testi H. (2010). Caracterización de aditivos enzimáticos obtenidos por monocultivo (*Aspergillus niger*) y cocultivo (*Aspergillus niger*-*Saccharomyces cerevisiae*) y su efecto sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* [online], 51(1): 27-35.
- Blagoeva J., Stoev G. & Venov P. (1991). Glucan Structure in a Fragile Mutant of *S. cerevisiae*. *Yeast*, 7: 455-461.
- Corzo, N.; Alonso, J. L.; Azpiroz, F.; Calvo, M. A.; Cirici, M.; Leis, R.; Lombó, F.; Mateos-Aparicio, I.; Plou, F. J.; Ruas-Madiedo, P.; Rúperez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Sanz, M. L.; Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1): 99-118.
- Couto L., Regina C.; Ribas de Lima L., Soares de Lima L., de Souza R. & Silva A. (2014). Nutritive value of diets containing inactive dry yeast for lactating Saanen goats. *R. Bras. Zootec.*, 43(1): 36-43.
- Domínguez, A., Vázquez, L. y Ramos, G. (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *ALAN* [online]. 59(4): 358-368.
- Dubois, M. K., Gilles, A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- Duncan B. (1955). Multiple range and multiple F. test. *Biometrics*, 11:1.
- Faria-Oliveira F, Carvalho J, Belmiro C, Martínez-Gomariz M, Hernaez M, Pavão M, Gil C, Lucas C. & Ferreira C. (2014). Methodologies to generate, extract, purify and fractionate yeast ECM for analytical use in proteomics and glycomics. *BMC Microbiol.*, 14(1): 244-253.
- Flores, Julia., Caballero, C. & Moreira, M. (2008). Una interpretación aproximativa del concepto de Hidrólisis en estructuras peptídicas en un Curso de Bioquímica del IPC en el contexto de la Teoría de los Campos Conceptuales. *Revista de Investigación* [online], 32(64): 135-160.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226:497-509.
- Galindo, J., Díaz, A., González, N., Sosa, A., Marrero, Y., Aldana, A., Moreira, O., Bocourt, R.; Torres, V., Sarduy, L. & Noda, A. (2010). Efecto de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal con sustrato de *Pennisetum purpureum*, vc. Cuba CT- 115 en condiciones in vitro *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44, (3): 281-286.
- Herrera, E., Murillo M., Berumen L., Páez J. & Villarreal G. (2014). Efecto de *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromices marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero. *Ecosistemas y Recur. Agropecuarios* [online], 1(1): 33-40.
- Liu L. C., Prokopakis G. J. & Asenjo J. A. (1997). Optimization of enzymatic lysis of yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, 32(4): 1113-1127.
- Luna A. Moreno J., Campa Á., González H., Fierro J., Álvarez P. & Bueno-Ibarra Mario A. (2013). Respuesta inmune y expresión de

- genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* [online], 41(5): 898-907.
- Mejía, L., Albán, D., Murcia, N., Cuervo, R. & Durán, J. (2009). Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* spp y cepa recombinante RH 218 Revista Científica Guillermo de Ockham, 7(2): 51-64.
- Milian G., Rondón A. J., Pérez M., Bocourt R., Rodríguez Z., Ranilla M.J., Rodríguez M. & Carro M. D. (2013). Evaluation of *Bacillus subtilis* biopreparations as growth promoters in chickens. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(1): 61-67.
- Ngyuen T., Fleet G & Rogers P. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 206–212.
- Niehaus F., Gabor E., Wieland S., Siegert P., Maurer K. H. & Eck J. (2011). Enzymes for the laundry industries: tapping the vast metagenomic pool of alkaline proteases. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 767–77.
- Orlean P. (2012). Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*. 192(3): 775–818.
- Otero, M. & Cabello A. (2007). Procesamiento de levadura para la obtención de derivados. Diferentes alternativas ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLI(1): 2-11.
- Patel S. & Goyal, A. (2012). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *Biotech.*, 2(2): 115–125.
- Pérez M., Piad R., Bocourt R., Milian G., Medina E., Savón L., Sarduy L & Laurencio M. (2009). Actividad prebiótica y probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1): 42-47.
- Pérez, M., Piad, R., Bocourt, R., Milián, G., Medina, E., Savón, L., Sarduy, L. y Laurencio, M. (2009). Actividad prebiótica y probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5, 1: 42-47.
- Pérez, M.; Bocourt R.; Galindo Juana; Milian, Grethel; Alonso, Lianne; Piad R. y Alfonso G. (2000). Isolation and selection of *Bacillus* sp strains producing proteolytic enzymes. *Cuban Journal of Agri. Sci.* 33(4): 223-230.
- Pérez, M.; Piad, R.; Milián, G.; das Gracias Felipe, M.; Ferreira, A.; Maciel de Mancilha, I.; Laurencio, M.; Batista de Almeida, J. (2007). Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformes* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 452–455.
- Pizarro C., Sebastián; R. & Martín. G. (2014). β -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? β -glucans: what types exist and what are their health benefits?. *Rev. Chil. Nutr.* [online], 41(4): 439-446.
- Quintero M., Montoya, O. & Gutiérrez P. (2010). Purificación y caracterización de una α -amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1. *Dyna Rev. Fac. Nac. Minas* [online], 77(162): 31-38.
- Ramírez, A.; Sierra, L. and LOPEZ, B. (2006). Síntesis y caracterización de fases estacionarias mesoporosas mediante pruebas cromatográficas y relaciones cuantitativas estructura-retención. *Rev. Colomb. Quim.* [online]. 35(2): 147-162.
- Rincón Z., & Albarracín W. (2013). Puesta a punto de un método analítico mediante cromatografía de gases para la determinación del perfil lipídico en carnes. *Vitae*, 20(2): 111-117.
- Rinsum J., Frans M. y Herman V. (1991). Cell Wall Glucomannoproteins of *S. cerevisiae* mnn9. *Yeast*. 7: 717-726.
- Samir J., Khalid H., François M., Georges P., Pascal V., Emmanuel M., Laurent D., Thierry F., Yann G., & Daniel P. (2012). Modulation of Intestinal Inflammation by Yeasts and Cell Wall Extracts: Strain Dependence and Unexpected Anti-Inflammatory Role of Glucan Fractions. *PLoS One*, 7(7): 1-15.
- Sánchez L. (1997). Obtención, caracterización y producción a escala piloto de un

- polisacárido β -(1,3) glucano con actividad inmunomoduladora. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de la Habana. La Habana. pp. 103.
- Spring P., Dawson K., Newman K. y Wenks C. (1996). Effect of Mannan Oligosaccharide on Different Cecal Parameters and on Cecal Concentration on Enteric Bacteria in Challenged Broiler Chicks. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. pp:60.
- Stanley V., Gray C. y Hygnius C. (1996). Effect of Mannan Oligosaccharide (BIO-MOS) on Liver and Egg Cholesterol and Tissue Protein Concentration in Chickens. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. p. 61.
- Steensels J., Snoek T., Meersman E., Picca N., Martina, K. & Verstrepen K. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 38(5): 947-995.
- Tanaka R. & Watanabe T. (1995). Glucanases and chitinases of *Bacillus circulans* WL-12. *J. Of Industrial Microbiology*. 14(6): 478-483.
- Yoo I., Chang., Lee E., Chary Y. & Moon S. (1997). Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *L. casei*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(2): 172-175.