

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS EN DOS CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUB. *BOULARDII*

Ana Ibis Cabrera* y Tatiana Beldarrain Iznaga

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, Carretera al Guatao km 3½,

La Habana, Cuba. E-mail: ibis@iiaa.edu.cu

Resumen

En cuanto a la caracterización de las cepas P1 y P2 de *Saccharomyces cerevisiae* desde el punto de vista fisiológico y sus aptitudes probióticas se obtuvo una gran capacidad de crecimiento en los carbohidratos ensayados (glucosa, lactosa, maltosa, galactosa, melizitosa, trealosa, rafinosa, ramnosa, sorbosa y manitol). Se comprobó la capacidad de crecimiento en etanol como única fuente de carbono y la asimilación del nitrato, que resultó negativa para ambas cepas, un activo crecimiento de ambos microorganismos en valores de pH entre 2,5 y 7 y se desarrolló satisfactoriamente a 37 °C, con capacidad de crecer a varias concentraciones de bilis e inhibir el crecimiento de bacterias antes de 4 y 16 h, respectivamente. Se determinó que ambas cepas pueden ser utilizadas como microorganismos probióticos, obteniéndose que P1 fue la más promisoría para su empleo en el desarrollo de un producto alimenticio con propiedades probióticas.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, probióticos, levaduras.

ABSTRACT

Physiological characterization and evaluation of probiotic properties of two matrixes of *Saccharomyces cerevisiae* sub. *Boulardii*.

In terms of the characterization of the strains P1 and P2 of *Saccharomyces cerevisiae* from the physiological point of view and their probiotic skills was obtained, a great capacity for growth in the tested carbohydrates (glucose, lactose, maltose, galactose, melizitose, trehalose, raffinose, rhamnase, sorbose and mannitol). It was found the growth in ethanol capacity as sole source of carbon and the assimilation of nitrate, which was negative for both strains, an active growth of both microorganisms at pH 2.5-7 and developed successfully at 37°C, with ability to grow to several concentrations of bile and inhibit the growth of bacteria before 4 and 16 h, respectively. It was determined that both strains can be used as probiotic microorganisms, obtaining that P1 was the most promising for use in the development of a food product with probiotic properties

Keywords: *S. cerevisiae*, probiotics, yeast.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de los microorganismos con fines bioterapéuticos está cobrando auge. Una de las terapias más extendidas es el empleo de microorganismos para el tratamiento de patologías del tracto digestivo y se destaca, entre ellos, los microorganismos con acción probiótica. Aunque los más utilizados son las bacterias lácticas, también se le reconocen propiedades probióticas, a determinadas especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* sub. *Boulardii* (1). Para que un microorganismo pueda ejercer su efecto probiótico, debe atravesar las ba-

* *Ana Ibis Cabrera*: Licenciada en ciencias alimentarias (IFAL, 2013). Especialista de formulaciones de la Planta de Aromas. Sus principales líneas de trabajo han sido el análisis microbiológico de alimentos y la evaluación físico-química y sensorial de alimentos.

reras del organismo, tener la capacidad de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal. Este hecho implica que debe soportar la acción del bajo pH del estómago y tolerar la presencia de bilis (2). Todo microorganismo probiótico debe multiplicarse de forma tal que alcance la concentración necesaria para que tenga lugar su efecto. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fisiológicamente y evaluar las propiedades probióticas de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sub. *boulardii* P1 y P2, informadas por otros autores sus características probióticas (3). Las mismas fueron caracterizadas fisiológicamente (asimilación y fermentación de compuestos carbonados y crecimiento en etanol como única fuente de carbono) y evaluadas según sus aptitudes probióticas (capacidad de proliferar a diferentes pH, en presencia de bilis y multiplicarse a las condiciones del organismo humano, efecto antagónico de *S. cerevisiae* sub. *boulardii* sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (4).

Para evaluar la capacidad de asimilación y fermentación de carbohidratos con producción de CO₂, se prepararon soluciones al 2 % de glucosa, lactosa, maltosa, galactosa, melizitosa, D-(+)-trealosa, rafinosa, L-(+)-ramnosa, L-(-)-sorbosa y D-(-)-manitol (5). Se adicionaron 10 mL de cada solución a tubos Durham, se añadieron 0,5 mL de cada cultivo de levadura con una concentración de 10⁹ UFC/mL y se mantuvieron a 37 °C durante 21 días. La fermentación de carbohidratos se interpretó como positiva si aparecía producción de CO₂ y la asimilación cuando solamente apareció turbidez. Se tomó como control negativo del crecimiento a la solución de azúcar al 2 % sin inocular (6). Se hicieron cinco réplicas en cada caso.

La asimilación del etanol como fuente de carbono se llevó a cabo mediante la activación de las levaduras en caldo nutriente e inoculadas 0,1 mL en la solución de etanol al 3 %, se utilizó como control un tubo sin inocular. Se incubó por tres semanas a 37 °C. Se interpretó como positivo a la prueba, mediante la aparición de turbidez en los tubos (6).

Para determinar la capacidad de las cepas de levadura de proliferar a diferentes pH, se evaluaron valores de pH de 2,5 a 3,5 por ser el intervalo de pH del estómago. Además, se determinó el crecimiento de la cepa a pH 7 que es el valor del intestino delgado y el colon, donde prolifera y ejerce su acción mayoritariamente este microorganismo. Se tomó como referencia el pH óptimo de crecimiento (4,7) del género *Saccharomyces*. Se partió de un cultivo incubado durante 24 h para garantizar que estuvieran en fase de crecimiento exponencial. Se tomó 1 mL de cada una y se inoculó a 10 mL de caldo extracto de malta ajustado a los diferentes valores de pH. Para ajustar el pH de cada variante, se empleó ácido láctico 0,1 N y NaOH 0,1 N. Las variantes se incubaron a 30 °C durante 24 h. Se determinó a cada variante la concentración celular/mL mediante conteo directo en cámara de Neubauer (7). En cada caso se realizaron tres réplicas por cada valor de pH ensayado.

La capacidad de proliferación en presencia de bilis se determinó mediante el crecimiento a diferentes concentraciones de la misma (2). Se inoculó cada cepa en erlenmeyers que contenían 10 mL de caldo extracto de malta; a partir de este cultivo se incubaron al 1 % en frascos Erlenmeyer con 250 mL de caldo extracto de malta con diferentes concentraciones de bilis fresca (0,5; 1 y 2 %). Como referencia se tomó el medio sin la adición de bilis y tanto el control como los tratamientos se incubaron a 37 °C durante 16 h (2). Posteriormente se determinó a cada variante la concentración de células/mL de medio de cultivo y conteos en cámara de Neubauer. Se realizaron tres replicas por cada concentración de bilis ensayada.

Para la multiplicación a las condiciones del organismo humano se inoculó primeramente las cepas de levaduras en Erlenmeyers con 10 mL de caldo extracto de malta y se incubaron durante 24 h a 37 °C. A partir de este cultivo se inoculó al 1 % en erlenmeyers que contenían 250 mL de este mismo medio ajustado a pH 7. Se incubaron a 37 °C durante 24 h y cada 2 h se extrajeron alícuotas de 5 mL de cada frasco y se determinó la concentración celular por conteo directo en cámara de Neubauer. Se hicieron tres réplicas y los resultados se procesaron mediante un ANOVA de clasificación simple y prueba de rangos múltiples de Duncan mediante el programa SPSS 18 para Windows.

Tabla 1. Comportamiento de las cepas P1 y P2 frente a carbohidratos

Azúcares	P1		P2	
	Asimilación	Fermentación	Asimilación	Fermentación
Glucosa	+	+	+	+
Lactosa	+	-	-	-
Maltosa	+	-	-	-
Galactosa	+	+	+	-
Melizitosa	+	-	+	-
D-(+)-Trealosa	+	-	-	-
Rafinosa	+	+	+	-
L-(-)-Sorbosa	+	-	-	-
D-(-)-Manitol	+	-	-	-

Para evaluar el efecto antagónico de *S. cerevisiae* sub. *boulardii* sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* in vitro, se empleó el método de dilución en caldo. Para ello se inoculó la levadura al 1 % en caldo extracto de malta, se adicionó 1mL de cada cultivo diana por separado y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se midió la concentración de cada patógeno cada 4 h, mediante método de placa vertida, y conteo en cámara de Neubauer. Se realizaron tres réplicas experimentales de esta prueba y los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$) mediante el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento fermentativo de la cepa P1 y P2 con distintos azúcares (Tabla 1) mostró que P1 fue capaz de asimilar todos los azúcares ensayados durante el experimento y fermentar completamente, tres de los azúcares propuestos (glucosa, galactosa y rafinosa).

La cepa P2 fue capaz de asimilar solamente cuatro de los azúcares ensayados durante el experimento (glucosa, galactosa, melizitosa y rafinosa) y de fermentar completamente solo a la glucosa. Las levaduras a partir de diferentes fuentes de carbono pueden realizar la fermentación o respiración, lo cual es utilizado como un criterio taxonómico (8).

La cepa P1 fue capaz de utilizar más activamente el etanol como única fuente de carbono para su crecimiento que la cepa P2 debido a que esta última presen-

tó mayores dificultades para la asimilación y empleo del etanol como única fuente de carbono donde se apreció menor turbidez en el medio. Las levaduras del género *Saccharomyces*, se caracterizan por una elevada tolerancia al etanol, destacándose dentro del mismo las cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (9).

Las cepas P1 y P2 fueron capaces de crecer en todos los valores de pH ensayados (Tabla 2). Al realizar el análisis estadístico se demostró que no existieron diferencias significativas entre los valores de concentración celular obtenidos (para $p \leq 0,05$). Las levaduras, como grupo microbiano, tienen la capacidad de crecer a pH ácidos (10).

S. cerevisiae sub. *boulardii* es capaz de sobrevivir durante el paso del tracto gastrointestinal y establecerse en él, pueden resistir y proliferar durante su tránsito

Tabla 2. Influencia del pH sobre la concentración celular de las cepas P1 y P2 (log UFC/mL)

pH	P1	P2
2,5	7,58 (a)	7,53 (a)
3,5	7,62 (a)	7,56 (a)
4,7	7,63 (a)	7,54 (a)
7	7,65 (a)	7,56 (a)

(n=3) Letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA ($p \leq 0,05$).

por el medio ácido del estómago y establecerse finalmente en diferentes áreas del intestino delgado y el colon (11). Las mismas ayudan con la absorción de nutrientes y evitan la adhesión y crecimiento de microorganismos patógenos que causan cuadros de disentería como *E. coli*, Salmonella, Shigella y otras bacterias enteropatógenas (10).

Las cepas P1 y P2 son capaces de resistir el ataque de las sales y las enzimas presentes en la bilis, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos con las bilis y el control sin estas (Tabla 3). La resistencia a la acción de las sales biliares y otras enzimas presentes en las secreciones biliares se debe principalmente a la presencia en la pared celular de las levaduras de numerosos polisacáridos y oligosacáridos. Estos complejos impiden la acción de levaduras sobre la membrana citoplasmática que es más rica en lípidos y proteínas y por tanto, susceptible a la degradación (11).

Tabla 3. Crecimiento de las cepas P1 y P2 a diferentes concentraciones de bilis fresca (log UFC/mL)

Concentración de bilis fresca (%)	P1	P2
0	7,60 (a)	7,54 (a)
0,5	7,53 (a)	7,51 (a)
1,0	7,51 (a)	7,53 (a)
2,0	7,49 (a)	7,54 (a)

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

El efecto de la bilis sobre la supervivencia de los microorganismos depende de la concentración de la bilis y de las propiedades específicas de cada cepa. La resistencia a la acción de la bilis por las levaduras está relacionada con la actividad de una enzima denominada sal-biliar hidrolasa que contribuye a hidrolizar la bilis conjugada, reduciendo su efecto tóxico (12).

Las cepas P1 y P2 se multiplican en las condiciones de pH y temperatura semejantes a las del organismo humano (Fig. 1). La curva de crecimiento de esta levadura se corresponde con el patrón de crecimiento típico de los cultivos microbianos (10). Durante las primeras 5 h se observa una fase de lento crecimiento debido a la adaptación de cada cepa a las condiciones de cultivo, siguiéndole una fase de aceleración de crecimiento durante las siguientes 5 h en las que sus siste-

mas enzimáticos se activan rápidamente y comienza la expresión de numerosas enzimas que ayudan al desarrollo del microorganismo y el aprovechamiento de los nutrientes presentes en el medio de cultivo con mayor facilidad. En las sucesivas 4 h tiene lugar la fase exponencial de crecimiento donde el cultivo muestra su máxima velocidad de crecimiento puesto que en este momento la maquinaria biosintética y enzimática se encuentra en sus máximos niveles de expresión llevándose a cabo un vertiginoso proceso de multiplicación y división celular en la población.

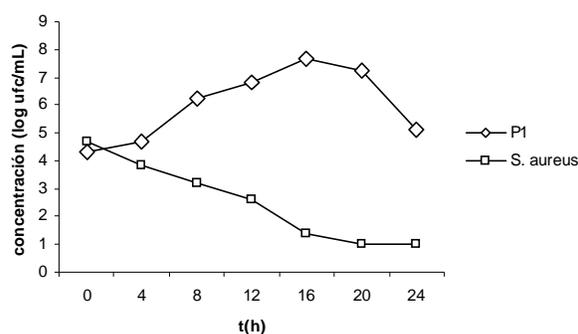


Fig. 1. Antagonismo entre *S. cerevisiae* sub. *boulardii* P1 y *S. aureus*.

En las 2 h subsiguientes a esta etapa se aprecia una desaceleración del crecimiento hasta que el cultivo alcanza su concentración máxima y a continuación se establece un equilibrio entre el número de células muertas y las nuevas que se generan alrededor de las 18 h. Pasadas las 24 h las cepas comienzan un proceso de envejecimiento en el cual el número de células que se forman no es capaz de sustituir al número de las que mueren y comienza la fase de aceleración negativa que conlleva a la muerte de la población horas después.

Ambas cepas se multiplicaron hasta una concentración máxima de ocho unidades log, por tanto, pueden ser empleadas como microorganismos probióticos puesto que para que un microorganismo pueda ejercer su efecto beneficioso en el organismo debe alcanzar una concentración celular mínima de 10^7 células/ml para lograr una colonización efectiva en el tracto gastrointestinal luego de pasar por los bajos valores de pH estomacal, así como la acción de las sales biliares y la competencia de la microbiota autóctona (13).

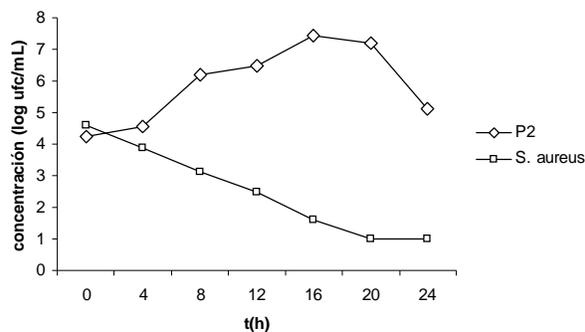


Fig. 2. Antagonismo entre *S. cerevisiae* sub. *boulardii* P2 y *S. aureus*.

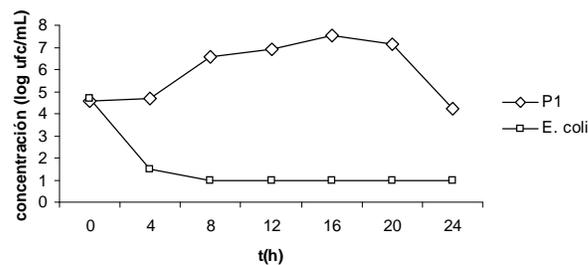


Fig. 3. Antagonismo entre *Saccharomyces cerevisiae* sub. *boulardii* P1 y *Escherichia coli*.

La capacidad antagónica de P1 contra *Staphylococcus aureus* (Fig 2). Este microorganismo no es capaz de competir contra P1 y a las 16 h no se encontró presencia de *S. aureus*. Lo mismo sucedió al medir la capacidad de P2 para inhibir *S. aureus* que a las 16 h el microorganismo patógeno no se encontró. Se sabe que las levaduras no producen sustancias antimicrobianas que pudieran difundir el medio, como hacen las BAL y de esta manera contrarrestar la acción de los patógenos (12).

Las levaduras compiten por sitios de adherencia, lo que las hace más resistentes al ambiente gastrointestinal y de esta manera su multiplicación será más fructífera en comparación con los patógenos (13). En P1 (Fig. 3) y P2 (Fig. 4), contra *Escherichia coli*, se observa como a las 4 h la concentración del patógeno disminuyó en tres unidades log y la relación entre cada cepa de *S.*

cerevisiae sub. *boulardii* evaluada fue de 12:1 para la cepa P1 y de 10:1 para P2. Después de 24 h de incubación a 37 °C las células de *S. cerevisiae* sub. *boulardii* forman agregados que evitarían in vivo la adherencia de los patógenos al epitelio gastrointestinal (13). Tanto P1 como P2 son favorables para ser utilizados en alimentos debido a que son capaces de inhibir *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

CONCLUSIONES

Las dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sub. *boulardii* se caracterizan por asimilar los carbohidratos ensayados, pero son fisiológicamente diferentes ya que P1 fue capaz de fermentar y asimilar un mayor número de compuestos carbonados que P2, pueden ser utilizadas como probiótico porque son capaces de vencer las barreras del tracto gastrointestinal al tolerar valores de pH =2,5 son resistentes a la acción de las secreciones biliares, puede crecer y multiplicarse de manera satisfactoria en condiciones de temperatura y pH semejantes a las del interior del tracto gastrointestinal de los seres humano. Ambas cepas tienen acción antagónica contra *Staphylococcus aureus* y contra *Escherichia coli*.

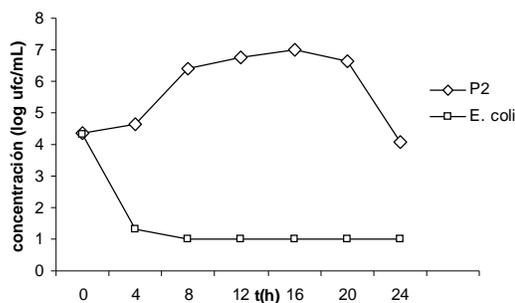


Fig. 4. Antagonismo entre *Saccharomyces cerevisiae* sub. *boulardii* P2 y *Escherichia coli*.

REFERENCIAS

1. Czerucka, D y Rampal, P. pathogens. *Microbes Infest.* 16: 521-526, 2008.
2. Fragoso, L.; Fernández, M. y Alvarez, G. *Rev. Tecnol. Hig. Alim.* 322: 59-65, 2001.
3. Champagne, C.P. y Møllgaard, H. Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. En: Farnworth E.R. (Ed.) *Handbook of Fermented Functional Foods*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2008.
4. Garcia, M.; Martinez, S.; Franco, I. y Carballo, J. *Int. Dairy J.* 16: 762-767, 2006.
5. Kurtzman, C.P. *Ferm. Yeast Res.* 4: 233-245, 2003.
6. Lodder, J. *The Yeast: a taxonomic Study*. 2ª ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London. 1971, pp. 65-107.
7. Gotcheva, V.; Heristozova, E.; Heristozova, T.; Guo, M.; Rozhkova, Z. y Agelov, A. *Food Biotechnol.* 32: 81-93, 2002.
8. Deak, T. y Beuchat, L.R. *J. Food Protection* 50: 243-264, 1987.
9. Andrade-Gracia, M. Caracterización de levaduras de interés en jamón ibérico mediante técnicas de ácidos nucleicos. (Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura) 2009.
10. Brock, M; Madigan.M.T; Martinko, J.M y Parker. *J. Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 2006.
11. Rodríguez, M; Pérez, M. y Bocourt, R. Componentes de la pared de las levaduras: actividad probiótica. En: CD-ROM de Monografías 2008, pp. 1-9. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, 2008.
12. Domitille, F.; Cédric, N.; Berger, M.; Coconnier, V.; Moal, L. y Servin, A. *Appl. Env. Microbiol.* 71(10): 6008-6013, 2005.
13. Rubio, A.; Hernández, M.; Aguirre, A. y Poutou, R.. *Rev. MV Córdoba* 13(1): 1157- 1169, 2008.