

Chemical and microbiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* creams, obtained from different Cuban distilleries

Caracterización química y microbiológica de cremas de *Saccharomyces cerevisiae*, obtenidas en diferentes destilerías cubanas

Marlen Rodríguez¹, Grethel Milián¹, Ana J. Rondón¹, R. Bocourt^{†2}, Lucía Sarduy² and A. Beruvides¹

¹Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero, km 3 ½, Matanzas, Cuba

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: marlen.rodriguez@umcc.cu

Marlen Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>

Ana J. Rondón: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Grethel Milián: <https://orcid.org/0000-0001-6074-7964>

Agustín Beruvides: <https://orcid.org/0000-0002-8525-6595>

PROBIOLEV® symbiotic additive includes yeast cream from distillery in its formulation. It is characterized by improving the productive performance and health of animals of zootechnical interest. The objective of this study was to characterize the chemical and microbiological composition of five creams of *Saccharomyces cerevisiae*, obtained from different Cuban distilleries with the purpose of elaborating PROBIOLEV®. For the chemical characterization of creams, descriptive statistics was carried out on dry matter, ashes, crude and true protein, as well as reducing sugars, total carbohydrates and pH. From the microbiological point of view, a count of contaminating microorganisms was performed and organoleptic characteristics were analyzed. The bromatological evaluation showed values between 15-20 % of dry matter, 16-18 % of ash, 80-85 % of organic matter, 35-40 % of crude protein, 32-36 % of true protein, 4-6 % of total carbohydrates and 2-4% reducing sugars. Creams were found not to contain contaminating microorganisms such as coliforms, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Salmonella and *Bacillus cereus*. From these results, it is concluded that the different creams of *S. cerevisiae*, without considering their distillery of origin, have adequate chemical and microbiological characteristics for their use in the production of PROBIOLEV®.

Keywords: Cuban distilleries, *Saccharomyces cerevisiae*, symbiotic additive

Saccharomyces cerevisiae creams are made from residues generated by industry, by distilling the product of alcoholic fermentation. They are a highly harmful for the environment. These creams are mainly composed by enzymes, peptides, amino acids, organic acids and B vitamins. Hence, their use in the formation of symbiotic biopreparations, in addition to having highly useful natural additives, prevents ecological damage and guarantees balance between industrial processes and their environment (Pérez *et al.* 2016 and Rodríguez 2017).

S. cerevisiae yeast is closely associated to progress and well-being of humanity. It is one of the most used and is widely marketed for its high biological value. It is placed among the most used fungal cultures for animal feeding as a stabilizer of the intestinal microbiota, and is intended for young and adult animals as adults

El aditivo simbiótico PROBIOLEV® incluye en su formulación crema de levadura procedente de destilería. Se caracteriza por mejorar el comportamiento productivo y la salud de los animales de interés zootécnico. El objetivo de este estudio fue caracterizar la composición química y microbiológica de cinco cremas de *Saccharomyces cerevisiae*, obtenidas de diferentes destilerías cubanas con el propósito de elaborar PROBIOLEV®. Para la caracterización química de las cremas se realizó estadística descriptiva a la materia seca, cenizas, proteína bruta y verdadera, así como a los azúcares reductores, carbohidratos totales y pH. Desde el punto de vista microbiológico, se realizó el conteo de microorganismos contaminantes y se analizaron las características organolépticas. La evaluación bromatológica mostró valores entre 15-20 % de materia seca, 16-18 % de ceniza, 80-85 % de materia orgánica, 35-40 % de proteína bruta, 32-36 % de proteína verdadera, 4-6 % de carbohidratos totales y 2-4 % de azúcares reductores. Se comprobó que las cremas no presentan microorganismos contaminantes como coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Salmonella y *Bacillus cereus*. A partir de estos resultados se concluye que las diferentes cremas de *S. cerevisiae*, sin tener en cuenta la destilería de origen, presentan características químicas y microbiológicas adecuadas para su utilización en la elaboración de PROBIOLEV®.

Palabras clave: destilerías cubanas, *Saccharomyces cerevisiae*, aditivo simbiótico

Las cremas de *Saccharomyces cerevisiae* se elaboran a partir de residuos que se generan en la industria, al destilar el producto de la fermentación alcohólica. Son un subproducto contaminante de alta agresividad para el medio ambiente. En su composición, estas cremas poseen enzimas, péptidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y vitaminas del complejo B, fundamentalmente. De ahí que su uso en la conformación de biopreparados simbióticos, además de disponer de aditivos naturales de gran utilidad, evita daños ecológicos y garantiza el equilibrio entre los procesos industriales y su entorno (Pérez *et al.* 2016 y Rodríguez 2017).

La levadura *S. cerevisiae* está íntimamente asociada al progreso y bienestar de la humanidad. Es una de las más usadas y se comercializa ampliamente por su alto valor biológico. Se ubica entre los cultivos fúngicos que más se utilizan en la alimentación animal como estabilizador de la microbiota intestinal, y se destina a animales jóvenes

(Carro *et al.* 2014 and Neeraj 2016). Health benefits and productivity of individuals consuming this yeast are documented (Rodríguez *et al.* 2015 and Hahn-Didde and Purdum 2016).

In Cuba, this residue from agro-industry is reused as a protein source to prepare diets that constitute an alternative to the use of conventional concentrates (Lezcano *et al.* 2010 and Solano *et al.* 2012). However, its treatment as raw material to make additives is a biotechnology option in Cuba, which is of interest for animal production. As reported, productive benefits of its use could be efficient (Machín *et al.* 2016, Pérez *et al.* 2016 and Rodríguez 2017).

Pérez (2000) characterized ten batches of cream from the José A. Echeverría distillery in Cárdenas, Matanzas. This study demonstrated the bromatological and microbiological stability of this product. However, it is not known whether there are differences with respect to creams from other distilleries, which may interfere with the quality of the symbiotic additive. Therefore, the objective of the current research was to characterize the chemical and microbiological composition of *S. cerevisiae* creams from different Cuban distilleries, in order to use them as main raw material in the production of PROBIOLEV®.

Materials and Methods

Origin of S. cerevisiae creams. Five yeast creams were used, coming from different enterprises producing alcohol and derivatives (figure 1). These plants use a lyophilized strain of *S. cerevisiae*, imported by the Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Single samples (15 L) were taken out of an industrial batch of cream from each distillery. The procedure was homogeneous, stirring the cream in the fermentation vat for five minutes. Creams were poured into plastic tanks with lids and transferred to the microbiology laboratory of the University of Matanzas (UM), where they were stored (4 and 8 °C) and processed by triplicate.

como adultos (Carro *et al.* 2014 y Neeraj 2016). Los beneficios en la salud y la productividad de los individuos que consumen esta levadura están documentados (Rodríguez *et al.* 2015 y Hahn-Didde y Purdum 2016).

En Cuba, este residuo de la agroindustria se reutiliza como fuente proteica para elaborar dietas que constituyen una alternativa ante el empleo de concentrados convencionales (Lezcano *et al.* 2010 y Solano *et al.* 2012). Sin embargo, su tratamiento como materia prima para elaborar aditivos constituye una opción de la biotecnología en Cuba, que resulta de interés para la producción animal. Según se ha informado, los beneficios productivos de su uso podrían ser eficientes (Machín *et al.* 2016, Pérez *et al.* 2016 y Rodríguez 2017).

Pérez (2000) caracterizó diez lotes de crema procedentes de la destilería José A. Echeverría, de Cárdenas, Matanzas. En su estudio demostró la estabilidad bromatológica y microbiológica de este producto. Sin embargo, no se conoce si existen diferencias con respecto a las cremas que provienen de otras destilerías, que puedan interferir en la calidad del aditivo simbiótico. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la composición química y microbiológica de las cremas de *S. cerevisiae* procedentes de diferentes destilerías cubanas, con el propósito de su uso como materia prima fundamental en la elaboración de PROBIOLEV®.

Materiales y Métodos

Origen de las cremas de S. cerevisiae. Se utilizaron cinco cremas de levadura, procedentes de diferentes empresas productoras de alcohol y derivados (figura 1). Estas plantas usan una cepa liofilizada de *S. cerevisiae*, importada por el Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

De cada destilería se tomaron muestras únicas (15 L) de un lote industrial de crema. Se procedió de forma homogénea, removiendo la crema en la cuba de fermentación durante cinco minutos. Las cremas se envasaron en tanques plásticos con tapas y se trasladaron hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad de Matanzas (UM), donde se almacenaron (4 y 8 °C) y

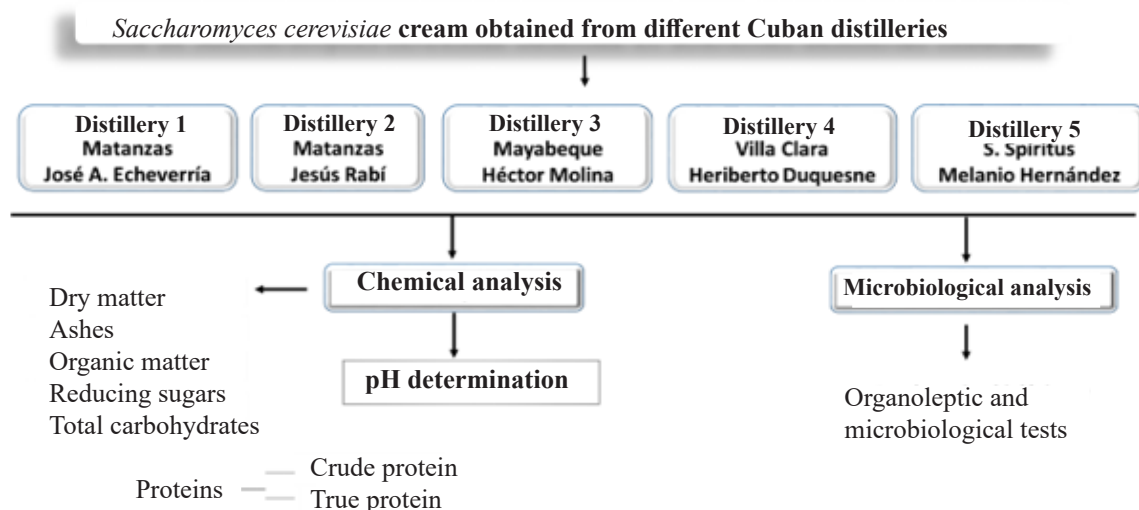


Figure 1. Origin and experimental sequence used to determine chemical and microbiological indicators of the different distillery creams

pH determination. A digital pH meter (Sartorius Meter PP-25) was used for measuring pH of creams.

Analytical techniques for chemical characterization. Content of dry matter (DM), ash, organic matter (OM) and crude protein was determined for each cream batch using Kjeldahl method, according to the methodology described by AOAC (1995). For true protein, Berstein method, cited by Meir (1986), was used. The determination of total reducing sugars was performed according to the 3.5-dinitrosalicylic colorimetric technique, in which glucose was used as standard sugar (Bernfeld 1955). For measuring total carbohydrates, phenol-sulfuric acid colorimetric method was applied (Dubois *et al.* 1956).

Microbiological determination of S. cerevisiae creams. The count of polluting microorganisms was carried out in accordance with the current standards, described for studies of microbiological quality of food for NC-ISO human and animal intake, according to Bennett and Lancette (2007) (table 1). For this, serial dilutions of samples (NC ISO 6887-1: 2002) were carried out and the techniques for the determination of polluting microorganisms were applied.

se procesaron por triplicado.

Determinación del pH. Se utilizó para medir el pH de las cremas un pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

Técnicas analíticas para la caracterización química. A cada lote de crema se le determinó el contenido de materia seca (MS), cenizas, materia orgánica (MO) y proteína bruta mediante el método de Kjeldahl, según la metodología descrita por la AOAC (1995). Para la proteína verdadera se utilizó el método de Berstein, citado por Meir (1986). La determinación de azúcares reductores totales se realizó según la técnica colorimétrica del 3.5-dinitro salicílico, en la que se utilizó la glucosa como azúcar patrón (Bernfeld 1955). Para la medida de los carbohidratos totales se aplicó la colorimétrica del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956).

Determinación microbiológica de las cremas de S. cerevisiae. El conteo de microorganismos contaminantes se realizó de acuerdo con las normas vigentes, descritas para los estudios de calidad microbiológica de los alimentos de consumo humano y animal NC-ISO, según Bennett y Lancette (2007) (tabla 1). Para ello se realizaron diluciones seriadas de las muestras (NC ISO 6887-1: 2002) y se ejecutaron las técnicas de

Table 1. Microbiological tests for determining polluting microorganisms

Microbiological tests	NC- ISO references
Recounting of total and fecal coliforms	4832: 2010
Recounting of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4833-1: 2014
Recounting of <i>Staphylococcus aureus</i>	6888-1: 2003
Recounting of <i>Bacillus cereus</i>	4833-1: 2014
Counting of Salmonella in 25 mL	6579: 2008
Counting of enterobacteria	4832: 2010

Organoleptic analysis. To determine organoleptic characteristics of each cream under study, a systematic control of its odor, color and appearance was carried out.

Statistical analysis. Descriptive statistics was performed on chemical data, for which mean, standard deviation and coefficient of variation (%) were determined. INFOSAT statistical package, version 2012, was used (Di Rienzo *et al.* 2012)

Results and Discussion

Table 2 shows the descriptive analysis of each cream under study. Chemical characterization showed that mean values of each indicator are in correspondence with that reported by a group of authors (Álvarez 1995, Esperanza and Constanza 2007, Arratia 2009, Solano *et al.* 2010 and Solano *et al.* 2012).

Studies carried out by Álvarez (1995), Pérez (2000) and Solano *et al.* (2010) in the bromatological evaluation of different *S. cerevisiae* creams showed ranges between 15-20 % of DM, 16-18 % of ash, 80-

determinación de los microorganismos contaminantes.

Análisis organoléptico. Para determinar las características organolépticas de cada crema en estudio se realizó un control sistemático de su olor, color y aspecto.

Análisis estadístico. A los datos químicos se les realizó estadística descriptiva, para lo que se determinó media, desviación estándar y coeficiente de variación (%). Se utilizó el paquete estadístico INFOSAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

Resultados y Discusión

La tabla 2 muestra el análisis descriptivo de cada crema en estudio. La caracterización química demostró que los valores medios de cada indicador se encuentran en correspondencia con lo informado por un colectivo de autores (Álvarez 1995, Esperanza y Constanza 2007, Arratia 2009, Solano *et al.* 2010 y Solano *et al.* 2012).

Los resultados son el promedio de tres determinaciones: desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV)

Los estudios desarrollados por Álvarez (1995), Pérez (2000) y Solano *et al.* (2010) en la evaluación

Table 2. Chemical composition of the different *Saccharomyces cerevisiae* creams

Indicators		Cuban distilleries				
		José A. Echeverría	Jesús Rabí	Héctor Molina	Heriberto Duquesne	Melanio Hernández
Dry matter, %	Mean	16.78	17.29	18.12	17.40	15.71
	SD	0.09	0.10	0.06	0.07	0.17
	CV, %	0.54	0.60	0.30	0.40	1.08
Ash, %	Mean	18.14	18.25	17.35	16.75	17.08
	SD	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04
	CV, %	0.23	0.23	0.17	0.18	0.29
Organic matter, %	Mean	81.86	81.75	82.65	83.25	82.92
	SD	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04
	CV, %	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05
Crude protein, %	Mean	38.95	39.20	40.27	39.77	38.16
	SD	0.04	0.03	0.05	0.05	0.05
	CV, %	0.09	0.06	0.12	0.12	0.13
True protein, %	Mean	36.92	37.18	36.52	35.87	32.52
	SD	0.04	0.07	0.09	0.04	0.08
	CV, %	0.11	0.19	0.25	0.12	0.25
Reducing sugars, %	Mean	4.12	3.96	4.52	4.86	4.23
	SD	0.03	0.02	0.02	0.01	0.04
	CV, %	0.61	0.53	0.34	0.21	0.85
Total carbohydrates, %	Mean	5.25	4.94	6.32	5.97	5.06
	SD	0.02	0.02	0.04	0.01	0.04
	CV, %	0.29	0.42	0.64	0.19	0.69
pH	Mean	3.83	3.44	4.78	3.52	4.81
	SD	0.02	0.02	0.01	0.006	0.01
	CV, %	0.45	0.60	0.24	0.16	0.21

Results are the average of three determinations

SD:standard deviation

CV:coefficient of variation

85 % of OM, 35-40 % of crude protein, 32-36 % of true protein, 4-6 % of total carbohydrates and 2-4 % of reducing sugars. Minimum and maximum values for each indicator analyzed in this study correspond to the previously described intervals.

Pérez (2000) showed that *S. cerevisiae* cream, obtained from fermentation process in the alcohol industry, shows stability in its percentage values. According to Guevara *et al.* (2014), the success of a good fermentation depends on the effectiveness of several factors: sugar concentration, pH, optimal temperature, contamination by other microorganisms, use of an organism resistant to high concentrations of alcohol, maintenance anaerobic conditions and immediate distillation of the fermented product.

Studies carried out by Aguilar *et al.* (2015) showed that nutritional value of *S. cerevisiae* varies depending on the substrate used for its growth and the industrial technology to which this yeast is subjected. Once *S. cerevisiae* is recovered in the distilleries, its composition depends on the type and quality of final

bromatológica de diferentes cremas de *S. cerevisiae* mostraron rangos entre 15-20 % de MS, 16-18 % de ceniza, 80-85 % de MO, 35-40 % de proteína bruta, 32-36 % de proteína verdadera, 4-6 % de carbohidratos totales y 2-4 % de azúcares reductores. Los valores mínimos y máximos por cada indicador analizado en este estudio se corresponden con los intervalos antes descritos.

Pérez (2000) demostró que la crema de *S. cerevisiae*, obtenida del proceso de fermentación en la industria del alcohol, presenta estabilidad en sus valores porcentuales. Según Guevara *et al.* (2014), el éxito de una buena fermentación depende de la eficacia de varios factores: concentración de azúcar, pH, temperatura óptima, contaminación por otros microorganismos, utilización de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias e inmediata destilación del producto fermentado.

Estudios realizados por Aguilar *et al.* (2015) demostraron que el valor nutritivo de *S. cerevisiae* varía en dependencia del sustrato utilizado para su crecimiento y de la tecnología industrial a la que se

molasses used as a substrate in the process (Estévez 2015); on the specific production conditions and the operating regime developed in each alcohol factory (Machín *et al.* 2016).

Results of this research could be a direct consequence of the production process that is carried out in each alcohol industry. Differences according to technical constructive state and equipment of each factory determine the quality of the cream obtained during the process.

Regardless of the distillery of origin, composition of creams under study was similar. An important aspect to consider is that all Cuban distilleries work with a defined technology, the same strain of *S. cerevisiae* and similar raw materials on an industrial scale (molasses). Therefore, yeast cream generated from national alcohol production practically does not vary in composition.

Fermentation process in the industry of alcohol production and its by-products constitutes one of the most important sources of *S. cerevisiae*. The main thing about these creams is the high content of yeasts (70 %) in their composition (Valdés *et al.* 2015). In Cuba, its recovery is limited to the surplus that remains in the bottom of fermenters, an issue that affects the amount of available cream. Its use would not be efficient as animal feed, since it is produced in discrete volumes (20,000 t/year) at national scale (Machín *et al.* 2016). Currently, several distilleries are in operation in the country. However, advances in industrial biotechnology offer potential opportunities for the use of these agro-industrial residues with aggregated value from a nutritional point of view and a better effect on animal health and physiology.

S. cerevisiae creams, after being treated in a biotechnological process with microbial enzymes produced by *Bacillus subtilis* (hydrolytic agent), are transformed into a valuable product (PROBIOLEV®) with prebiotic and probiotic properties (Pérez *et al.* 2006). Coming from the sugar industry, they are a low-cost national raw material, a more valid alternative to the use of antibiotic additives, and an economically profitable way to expand their use profile.

PROBIOLEV® is a complete biopreparation, which main focus is on the components of cell wall hydrolysis of *S. cerevisiae* (glucan and mannan oligosaccharides), due to its history as a growth promoter prebiotic in animals (Jahanian and Ashnagar 2015 and Lourenço *et al.* 2016), and *B. subtilis* viable cells and their endospores, a probiotic microorganism that favors the increase of beneficial intestinal biota and activates the immune response (Díaz *et al.* 2017 and Milián *et al.* 2019). Due to its composition, PROBIOLEV® is considered as an additive with a high potential for symbiotic activity.

Pérez *et al.* (2005), Piad *et al.* (2006) and Pérez *et al.* (2015) demonstrated that with the application

somete la levadura. Cuando *S. cerevisiae* se recupera en las destilerías, su composición depende del tipo y calidad de las mieles finales de caña utilizadas como sustrato en el proceso (Estévez 2015); de las condiciones específicas de producción y del régimen de operación desarrollado en cada fábrica de alcohol (Machín *et al.* 2016).

Los resultados de esta investigación podrían ser consecuencia directa del proceso productivo que se realiza en cada industria alcohólica. Las diferencias en el estado técnico constructivo y en el equipamiento de cada fábrica determinan la calidad de la crema que se obtiene durante el proceso.

Independientemente de la destilería de origen, la composición de las cremas objeto de este estudio fue similar. Un aspecto importante que se debe considerar es que todas las destilerías cubanas trabajan con una tecnología definida, una misma cepa de *S. cerevisiae* y materias primas similares a escala industrial (mieles de caña de azúcar). Por tanto, la crema de levadura que se genera de la producción nacional de alcohol no varía prácticamente en su composición.

El proceso de fermentación en la industria de producción de alcohol y sus derivados constituye una de las fuentes más importantes de *S. cerevisiae*. Lo fundamental de estas cremas es el alto contenido de levaduras (70 %) que poseen en su composición (Valdés *et al.* 2015). En Cuba, su recuperación está limitada al excedente que queda en el fondo de los fermentadores, cuestión que afecta la cantidad de crema disponible. Si se fuera a emplear como alimento animal, su uso no sería eficiente, puesto que se produce en volúmenes discretos a escala nacional (20 000 t/año) (Machín *et al.* 2016). Actualmente, en el país se encuentran en explotación varias destilerías. Sin embargo, los avances en la biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la utilización de estos residuos agroindustriales con valor agregado desde el punto de vista nutricional y mejor efecto en la fisiología y salud de los animales.

Las cremas de *S. cerevisiae*, al ser tratadas en un proceso biotecnológico con enzimas microbianas producidas por *Bacillus subtilis* (agente hidrolítico), se transforman en un producto valioso (PROBIOLEV®) con propiedades prebióticas y probióticas (Pérez *et al.* 2006). Al provenir de la industria azucarera, constituyen una materia primanacional de bajo costo, una alternativa más válida ante el uso de aditivos antibióticos, y una forma económicamente rentable para ampliar su perfil de uso.

PROBIOLEV® es un biopreparado íntegro, cuyo enfoque principal se orienta a los componentes de la hidrólisis de la pared celular de *S. cerevisiae* (oligosacáridos de glucanos y mananos), por sus antecedentes como prebiótico promotor del crecimiento en animales (Jahanian y Ashnagar 2015 y Lourenço *et al.* 2016), y a las células viables de *B. subtilis* y sus endosporas, microorganismo probiótico que favorece el incremento de la biota intestinal benéfica y activa la respuesta inmune (Díaz *et al.* 2017 y Milián *et al.* 2019).

of PROBIOLEV® to animal diets, the beneficial microbiota is promoted, together with its powerful defensive effect against colonization of pathogens and opportunists, it reinforces the function of the intestinal barrier. According to the cited authors, this biological preparation caused greater efficiency in feed conversion, body weight uniformity and productive yields of birds that consumed it.

Low production cost of PROBIOLEV® and the high availability of its raw material (waste obtained from alcohol and derivatives production industry, rich in *S. cerevisiae*), which constitutes an environmental pollutant, are the basis for the economic feasibility of the use of this additive. In addition, the increase of production levels of meat, milk and eggs in animals of zootechnical interest, due to the decrease of pathogenic microbial concentration (Piad *et al.* 2006 and Rodríguez *et al.* 2015).

Distillery creams have been used directly in pig diets for years. Solano *et al.* (2012) managed to replace 30% of the protein provided by soy bean meal with this *S. cerevisiae* cream, besides supplying B vitamins (except B-12) from the pig premix, without affecting the characteristics of the productive performance of these animals. However, due to the amounts of these components (proteins and vitamins) in the product (cream) and in the diets, their effects could be less important when compared to the possibility of expanding the activity of oligosaccharides of glucans, mannans and *B. subtilis* cells and their endospores.

However, to ensure that PROBIOLEV® has biologically stable properties for animal development and growth, it is necessary to carry out chemical analysis and microbiological quality studies, since one of the fundamental raw materials for its preparation, which is the cream of *S. cerevisiae*, does not come from the same source.

Table 3 shows the results of the microbiological characterization of creams under study. The populations of the different microorganisms analyzed were determined to be within the normal ranges defined by the NC-ISO for microbiology studies of food intended for human and animal consumption. This fact corroborates the absence of viable contaminants in this type of product. No noticeable alterations were found, regardless of the distillery from which the creams came from.

During the packaging and transportation of creams from different provinces, aseptic conditions were favorable for the non proliferation of foreign microbial agents during the storage period (10 days, under environmental conditions) until their processing. The extreme conditions of the medium (acidic pH) decrease the possibilities of growth and development of harmful germs in creams. These characteristics allow their use and storage in production places where there are no possibilities of conservation at low temperatures.

Por su composición, PROBIOLEV® se considera un aditivo con alto potencial de actividad simbiótica.

Pérez *et al.* (2005), Piad *et al.* (2006) y Pérez *et al.* (2015) demostraron que cuando se aplica PROBIOLEV® en la dieta de los animales se promueve la microbiota benéfica, unido al efecto defensivo potente que ejerce ante la colonización de patógenos y oportunistas, pues refuerza la función de la barrera intestinal. Según los autores citados, este preparado biológico provocó mayor eficiencia en la conversión alimentaria, en la uniformidad del peso corporal y en los rendimientos productivos de las aves que lo consumieron.

El bajo costo de producción de PROBIOLEV® y la alta disponibilidad de su materia prima (desecho obtenido de la industria de producción de alcohol y derivados, rico en *S. cerevisiae*), que constituye un contaminante del medio ambiente, fundamentan la factibilidad económica de la utilización de este aditivo. A ello se une el incremento de los niveles de producción de carne, leche y huevos en los animales de interés zootécnico, debido a la disminución de la carga microbiana patógena (Piad *et al.* 2006 y Rodríguez *et al.* 2015).

Las cremas de destilería se han empleado directamente durante años en la dieta de cerdos. Solano *et al.* (2012) lograron sustituir con esta crema de *S. cerevisiae* 30% de la proteína que aporta la harina de soya; además de suplir las vitaminas del complejo B (excepto la B-12) de la premezcla porcina, sin que se afectaran los rasgos del comportamiento productivo en estos animales. No obstante, por las cantidades de estos componentes (proteínas y vitaminas) en el producto (crema) y en las dietas, sus efectos pudieran ser de menor importancia si se comparan con la posibilidad de ampliarla actividad de los oligosacáridos de glucanos, mananos y las células de *B. subtilis* y sus endosporas.

No obstante, para lograr que PROBIOLEV® tenga propiedades biológicamente estables para el desarrollo y crecimiento animal, es necesario realizar un análisis químico y estudios de calidad microbiológica, debido a que una de las materias primas fundamentales para su elaboración, que es la crema de *S. cerevisiae*, no procede de la misma fuente.

La tabla 3 muestra los resultados de la caracterización microbiológica de las cremas en estudio. Se determinó que las poblaciones de los diferentes microorganismos analizados se encuentran en los rangos normales definidos por las NC-ISO para los estudios de microbiología de los alimentos destinados al consumo humano y animal. Este hecho corrobora la ausencia de viables contaminantes en este tipo de producto. No se encontraron alteraciones perceptibles, independientemente de la destilería de la que provienen las cremas.

Durante el envase y transportación de las cremas procedentes de diferentes provincias, las condiciones de asepsia favorecieron que no proliferaran agentes microbianos extraños durante el período de almacenaje (10 d, en condiciones ambientales) hasta su procesamiento. Las condiciones extremas del medio

Table 3. Microbiological analysis of different *Saccharomyces cerevisiae* creams

Microbiological tests	Cuban distilleries				
	José A. Echeverría	Jesús Rabí	Héctor Molina	Heriberto Dukuesne	Antonio Sánchez
Recount of <i>Bacillus spp.</i> (CFU mL ⁻¹)	-	-	-	-	-
Recount of viable yeasts (CFU mL ⁻¹)	10 ³	<10 ³	10 ³	<10 ³	<10 ³
Recount of total and fecal coliforms	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Recount of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Recount of <i>Staphylococcus aureus</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Recount of <i>Bacillus cereus</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Counting of Salmonella in 25 mL	No presence	No presence	No presence	No presence	No presence

In addition to the chemical and microbiological study, an organoleptic analysis was performed. Results showed normal, brown coloration, characteristic odor, slightly alcoholic, with an acid tendency, and normal appearance. This means that there was no presence of foreign particles or signs of contamination.

From the obtained results, it is concluded that the different *S. cerevisiae* creams, without considering the distillery of origin, have chemical and microbiological characteristics that favor their use for producing the symbiotic additive PROBIOLEV®, biotechnologically. Currently, this additive is neither produced nor applied on a production scale. However, the study carried out is very important because it, undoubtedly, enables the rational and feasible use of recycling *S. cerevisiae* yeast cream, made from a polluting agro-industrial residue with a harmful effect on the environment.

(pH ácido) disminuyen las posibilidades de crecimiento y desarrollo de gérmenes dañinos en las cremas. Estas características permiten su utilización y almacenamiento en lugares de producción donde no existan posibilidades de conservación a bajas temperaturas.

Además del estudio químico y microbiológico, se realizó un análisis organoléptico. Los resultados mostraron coloración normal, marrón; olor característico, a alcohol ligeramente, con tendencia ácida, y aspecto normal. Esto significa que no hubo presencia de partículas extrañas ni indicios de contaminación.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que las diferentes cremas de *S. cerevisiae*, sin considerar la destilería de origen, presentan características químicas y microbiológicas que posibilitan su utilización para elaborar el aditivo simbiótico PROBIOLEV® por vía biotecnológica. En los momentos actuales, este aditivo no se produce ni se aplica a escala de producción. No obstante, el estudio realizado resulta de gran interés porque posibilita, sin lugar a dudas, el uso racional y factible de reciclar la crema de levadura de *S. cerevisiae*, elaborada a partir de un residuo agroindustrial contaminante con efecto nocivo para el medio ambiente.

References

- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Tacanga, D., Zuta, I. & Linares, G. 2015. "Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo". *Agroindustrial Science*, 5(1): 37-46, ISSN: 2226-2989, DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/agroind.science.2015.01.04>.
- Álvarez, P. 1995. "Los probióticos como complemento alimenticio". *Mundo Ganadero*, (11): 38-50, ISSN: 0214-9192.
- AOAC (Official Method of Analysis: Association of Official Analytical Chemists). 1995. 16th Ed. Ed. AOAC International, Arlington, Virginia, USA, ISBN: 0935584544.
- Arratia, J.M. 2009. Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal tamaulipeco. MSc. Thesis. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Bennett, R.W. & Lancette, G.A. 2007. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual. Available: <http://www.fda.gov/oc/spanish/> [Consulted: January, 2015].
- Bernfeld, P. 1955. "Amylases, alpha and beta". *Methods in Enzymology* I, 1: 149-158, ISSN: 1557-7988, DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5).
- Carro, M.D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A. & Ranilla, M.J. 2014. "Empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes". *Ganadería*, (93): 42 – 49, ISSN: 1695-1123.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStatversion 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz, E., Isaza, J. & Ángel, D. 2017. "Probióticos en la avicultura: una revisión". *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(35): 175-189, ISSN: 0122-9354, DOI: <https://doi.org/10.19052/mv.4400>.
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356, ISSN: 1520-6882, DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

- Esperanza, E. & Constanza, S. 2007. Evaluación de Melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Diploma Thesis. Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Estévez, R.E. 2015. Fermentación y destilación alcohólica. Conferencia ICIDCA
- Guevara, C.A., García, A.B., Mijares-Mena, D. & Ramos-Pousa, I. 2014. "Integración de procesos para la producción sostenible de alimento animal en la UEB "Antonio Sánchez". ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 48(2): 63-68, ISSN: 0138-6204.
- Hahn-Didde, D., & Purdum, S. E. 2016. "Prebiotics and probiotics used alone or in combination and effects on pullet growth and intestinal microbiology". Journal of Applied Poultry Research, 25(1): 1-11, ISSN: 1056-6171, DOI: <https://doi.org/10.3382/japr/pfv051>.
- Jahanian, R. & Ashnagar, M. 2015. "Effect of dietary supplementation of mannan-oligosaccharides on performance, blood metabolites, ileal nutrient digestibility, and gut microflora in *Escherichia coli*-challenged laying hens". PoultryScience, 94(9): 2165-2172, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pev180>.
- Lezcano, P., Castro, M., Mora, L.M. & Rodríguez, Y. 2010. Cómo incrementar el alimento animal para sustituir importaciones en animales monogástricos. In: Seminario Internacional de Porcicultura Tropical, La Habana, Cuba, CD-ROM, ISBN: 978-959-7208-07-5.
- Lourenço, M. C., de Souza, A. M., Hayashi, R. M., da Silva, A. B., & Santin, E. 2016. "Immune response of broiler chickens supplemented with prebiotic from *Sacharomyces cerevisiae* challenged with *Salmonella enteritidis* or Minnesota". Journal of Applied Poultry Research, 25(2): 165-172, ISSN: 1537-0437, DOI: <https://doi.org/10.3382/japr/pfv094>.
- Machín, C., Garrido, N.A. & Guevara, A. 2016. "Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica". ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(1): 20-28, ISSN: 0138-6204.
- Meir, H. 1986. Laborproktibuire. Tierernahrungund, futtermittelfürTiererproduzenten. Verlag, Berlin.
- Milián, G., Rodríguez, M., Díaz, D., Rondón, A.J., Pérez, M.L., Bocourt, R., Portilla, Y. & Beruvides, A. 2019. "Evaluación del aditivo zootécnico SUBTILPROBIO® C-31 en la alimentación de gallinas ponedoras en una unidad de producción comercial". Cuban Journal of Agricultural Science, 53(2): 161-168, ISSN: 2079-3480.
- NC ISO 6887-1. 2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Preparación de la muestra de ensayo, la suspensión inicial y las diluciones decimales para pruebas microbiológicas. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales (ISO 6887-1:1999, IDT), ICS: 07.100.30. Oficina Nacional de Normalización (NC), La Habana, Cuba.
- Neeraj, K. 2016. "Review on Natural Growth Promoters Available for Improving Gut Health of Poultry: An Alternative to Antibiotic Growth Promoters". Asian Journal of Poultry Science, 10(1): 1-29, ISSN: 1819-3609, DOI: <https://doi.org/10.3923/ajpsaj.2016.1.29>.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. PhD Thesis. Universidad Agraria de La Habana, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 100.
- Pérez, M., Milián, G., Bocourt, R. & Alemán, R. 2016. "Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos". La Técnica, (16): 64-75, ISSN: 2477-8982.
- Pérez, M., Milián, G., Piad, R., González, R., Bocourt, R. & Savón, L. 2006. Hidrolizado de fondaje de cubetas de destilerías de alcohol con un crudo enzimático de la cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 y su procedimiento de obtención. Patente No.23179, (Int.cl.8) A-23-J1/00,3/30, C-12N-9/56, Oficina Cubana de Propiedad Industrial, La Habana, Cuba.
- Pérez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt, R. & Torres V. 2015. "Efecto de endosporas de *Bacillus subtilis* E-44 con actividad probiótica sobre indicadores fermentativos en órganos digestivos e inmunológicos de pollos de engorde". Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 35(2): 89-94, ISSN: 1317-973X.
- Pérez, M., Piad, R., Bocourt, R., Milián, G., Medina-Medina, E., Savon, L., Sarduy, L. & Laurencio, M. 2005. "Actividad prebiótica y probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollos de ceba". CYTA Journal of Food, 5(1): 42-47, ISSN: 1947-6337, DOI: <https://doi.org/10.1080/11358120509487670>.
- Piad, R., Samaniego, L.M., Pérez, M. & Bocourt, R. 2006. "Actividad prebiótica de un hidrolizado enzimático de crema de levadura en indicadores productivos de gallinas ponedoras". CYTA Journal of Food, 5(3): 226-230, ISSN: 1947-6337, DOI: <https://doi.org/10.1080/11358120609487695>.
- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p.100.
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt, R., Portilla, Y., Laurencio, M. & Beruvides, A. 2015. "Hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo con potencial antibacteriano para la alimentación animal". Cuban Journal of Agricultural Science, 49(3): 389 – 397, ISSN: 2079-3480.
- Solano, G., Rodríguez, Z. & Paneque, C. 2012. "Crema de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* inoculada con bacterias ácido lácticas". Revista Electrónica Granma Ciencia, 16(3), ISSN: 1027-975X.
- Solano, G.S., Miranda, O., Ramírez, R. & Rondón, G. 2010. "Crema de levadura *Saccharomyces* y miel de caña como alimento de cerdos en crecimiento-ceba". Revista Electrónica Granma Ciencia, 14(2), ISSN: 1027-975X.
- Valdés, A., Bruno, D., Mota, A.M., Cristóbal, N., Aguilar, C.N., Iliina, A., Teixeira, J.A. & Ruiz, H.A. 2015. Cinética para la producción de bioetanol usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pe-2 para su escalamiento en reactores en Columna y gas-lift. In: Memorias XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, México.

Received: December 23, 2019

Accepted: June 3, 2020