



## HIDROLIZADO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: SU EFECTO EN LA POBLACIÓN MICROBIANA RUMINAL *IN VITRO* DE PASTO ESTRELLA (*CYNODON NLEMFUENSIS*)

### *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HYDROLYZATE: ITS EFFECT ON THE *IN VITRO* RUMINAL MICROBIAL POPULATION OF STAR GRASS (*CYNODON NLEMFUENSIS*)

JUANA GALINDO<sup>1\*</sup>, NIURCA GONZÁLEZ<sup>2</sup>,  
 YOANDRA MARRERO<sup>2</sup>, MARLEN RODRÍGUEZ<sup>3</sup>, MAGALY HERRERA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal, C. Central, km 47 ½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup>Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Calle 3ra No. 40759 e/ 6ta y Carretera a Tirabeque, Reparto la Unión, Boyeros, La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Universidad de Matanzas, Carretera a Varadero, km 2 ½. Código postal: 40100, Matanzas, Cuba

\*Email: [juanaluzgblanco@gmail.com](mailto:juanaluzgblanco@gmail.com)

Se realizó un experimento con el hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae*, registrado como PROBIOLEV®, obtenido en Cuba de la hidrólisis de la crema de destilería a partir del crudo enzimático de *Bacillus subtilis* E-44, para determinar su efecto en la población microbiana ruminal de pasto estrella (*C. nlemfuensis*). Se aplicó la técnica de producción de gases *in vitro*, con modificaciones según el objetivo propuesto. Se establecieron tres tratamientos: A) control de pasto estrella, B) pasto estrella + crema de levaduras y C) pasto estrella + hidrolizado de levaduras. Las dosis de crema e hidrolizado fueron 100 mL/kg de concentrado/día, equivalente a 130 mg de ( $\beta$  1,3) glucano/kg de concentrado. Los muestreos se hicieron antes de incubar, y a las 3 y 6 horas después de la incubación. El hidrolizado activó las poblaciones totales de bacterias ( $P=0.0088$ ) en 62 %, lo que corresponde a  $19.36 \times 10^{11}$  UFC/mL más de bacterias, lo que significa incremento en biomasa bacteriana. Las bacterias celulolíticas fueron más numerosas ( $P=0.0042$ ) y el número total de hongos celulolíticos se incrementó ( $P=0.0009$ ) con el hidrolizado. No hubo efecto del tiempo en las bacterias viables totales, celulolíticas y hongos celulolíticos. Se concluye que el hidrolizado produce cambios en la población ruminal, incrementa la población de bacterias viables totales, bacterias y hongos celulolíticos, evento que pudiera favorecer la degradación de la fibra contenida en el pasto estrella.

**Palabras clave:** bacterias totales, celulolíticas, hongos, proteolíticas, PROBIOLEV®

An experiment was carried out with the hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae*, registered as PROBIOLEV®, obtained in Cuba from the hydrolysis of distillery cream from the enzymatic crude of *Bacillus subtilis* E-44, to determine its effect on the ruminal microbial population of star grass (*C. nlemfuensis*). The *in vitro* gas production technique was applied, with modifications according to the proposed objective. Three treatments were established: A) star grass control, B) star grass + yeasts cream and C) star grass + yeasts hydrolyzate. The doses of cream and hydrolyzate were 100 mL/kg of concentrate/day, equivalent to 130 mg of ( $\beta$  1.3) glucan/kg of concentrate. Samplings were done before incubation, and at 3 and 6 hours after incubation. The hydrolyzate activated the total bacterial populations ( $P=0.0088$ ) by 62 %, which corresponds to  $19.36 \times 10^{11}$  CFU/mL more of bacteria, which means an increase in bacterial biomass. Cellulolytic bacteria were more numerous ( $P=0.0042$ ) and the total number of cellulolytic fungi increased ( $P=0.0009$ ) with the hydrolyzate. There was no effect of time on the total viable bacteria, cellulolytic bacteria and cellulolytic fungi. It is concluded that the hydrolyzate produces changes in the ruminal population, increasing the population of total viable bacteria, bacteria and cellulolytic fungi, an event that could favor the degradation of the fiber contained in the star grass.

**Key words:** cellulolytic, fungi, proteolytic, PROBIOLEV®, total bacteria

Recibido: 28 de diciembre de 2023

Aceptado: 03 de abril de 2024

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

**Declaración de contribución de autoría CRediT:** Juana Galindo: **Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Análisis formal, Redacción - borrador original.** Niurca González: **Curación de datos, Investigación.** Yoandra Marrero: **Curación de datos, Investigación.** Marlen Rodríguez: **Curación de datos.** Magaly Herrera: **Análisis formal**



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## Introducción

La mayoría de los estudios con levaduras en la alimentación de animales rumiantes se han realizado con el empleo de levaduras vivas (Marrero *et al.* 2015 y Marrero *et al.* 2020). Sin embargo, el uso de sus hidrolizados como aditivos en la alimentación de animales rumiantes ha sido poco explorado, aunque constituye una vía promisoriosa que posibilita la activación de la población microbiana ruminal, específicamente la celulolítica, así como los principales sitios sensibles del complejo ecosistema ruminal.

En *S. cerevisiae*, aproximadamente, 90 % de la pared celular está compuesta por polisacáridos, de 5-10 % de proteínas y no rebasa 1 % de lípidos, aunque la porción proteica es, relativamente, pequeña y, aproximadamente, 50 % de la pared celular está compuesta por glicoproteínas (Klis *et al.* 2006 y Díaz *et al.* 2018). Según estos autores, los principales componentes de la pared celular de estas levaduras son manano proteínas y  $\beta$ - glucanos, en proporciones más o menos iguales y pequeña cantidad de N-acetilglucosamina

Entre las materias primas disponibles para la producción de derivados de pared de levadura, los residuos de la industria alcoholera (cremas de destilerías o cremas de levaduras, vinazas) constituyen un contaminante muy agresivo para el medio ambiente. Del alcohol destilado se producen, aproximadamente, de 12-15 L de aguas residuales/L con producción anual de 2.6 millones de m<sup>3</sup>. Su carga orgánica es 60 - 150 g DQO/L, aproximadamente, 1000 veces mayor que la permitida por la norma de protección del medio ambiente. Estas razones justifican su uso para producir alimento animal mediante procedimientos biotecnológicos, lo que constituye, además, una vía para mejorar el entorno y la gestión ecológica de la industria alcoholera.

Galindo *et al.* (2010, 2019) sugirieron la hipótesis de que el hidrolizado que se obtiene de estas cremas se puede utilizar en la alimentación de animales rumiantes bajo el concepto de aditivos microbianos. Los aditivos microbianos activan la población microbiana que habita en el rumen de los rumiantes, incrementan la utilización digestiva de los alimentos y la degradación de la fibra (Valenciaga *et al.* 2019). Además, pueden reducir la producción de metano a ese nivel y de esa manera, doblemente, brindan un servicio ambiental. Estos antecedentes ofrecen la posibilidad de pensar que la utilización de un hidrolizado enzimático de *S. cerevisiae* pudiera favorecer la acción de los microorganismos ruminales en animales que consumen dietas fibrosas. De ahí que el objetivo del trabajo que se presenta fue determinar el efecto de un hidrolizado de *S. cerevisiae* en la población microbiana ruminal de pasto estrella.

## Materiales y Métodos

El experimento se desarrolló en el Instituto de Ciencia Animal, municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba, a 92 m s.n.m., 22°53' latitud norte y 82°02' longitud oeste. El suelo ferralsolítico, ondulado, con 4.84 % de materia orgánica, 0.26 de nitrógeno total, 40.59 ppm de fósforo, 4.60 de calcio, 0.46 de magnesio y pH de 6.34.

*Tratamientos experimentales:* Se evaluaron tres tratamientos, según diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 3x3 (tres tratamientos y tres horas de muestreos). Los tratamientos fueron: A) control con pasto estrella, B) pasto estrella + crema de levaduras y C) pasto estrella + hidrolizado de levaduras. Las dosis de crema e hidrolizado fueron 100 mL/kg de concentrado/d, equivalente a 130 mg de ( $\beta$  1,3) glucano/kg de concentrado.

El hidrolizado o la crema de levaduras se asperjaron sobre el concentrado comercial para vacas lecheras en la dosis señalada. Luego de un mezclado homogéneo, el producto quedó listo para su empleo.

El resto de la dieta experimental consistió en pasto estrella. Su composición química fue 7.26, 74.57, 10.11, 0.42 y 0.18 para la PB, FDN, ceniza, calcio y fósforo, % MS, respectivamente (AOAC 2016).

La crema de levaduras, materia prima a partir de la cual se obtuvo el hidrolizado, se obtuvo de la destilería del central Jesús Rabí, de la provincia Matanzas. La caracterización de la composición química del hidrolizado se realizó según las técnicas descritas por la AOAC (2016) y se indican MS, MO, cenizas y PV. Las fracciones fibrosas se analizaron por el procedimiento de Goering y van Soest (1970). La proteína bruta (PB) se determinó mediante el método de Kjeldahl. Los azúcares reductores totales (AR) se analizaron de acuerdo con la técnica colorimétrica del 3,5-dinitro salicílico (DNS), donde se empleó la glucosa como azúcar patrón (Bernfeld 1955). La cuantificación de carbohidratos totales (CT) se realizó mediante la técnica colorimétrica del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Los valores coinciden con los informados por Rodríguez *et al.* (2017): 19.39, 17.83, 82.17, 40.28, 38.54, 7.93 y 6.09 % de MS, cenizas, MO, PB, PV, AR CT. El pH del mismo fue de 5.56 y la relación PV/PB de 95.68.

*Procedimiento experimental:* El experimento se condujo en condiciones *in vitro*. Se utilizó la técnica de Theodorou *et al.* (1994). Según describe, se emplearon botellas selladas de 100 mL para incubar las muestras de alimento en líquido ruminal y un medio tampón. En cada botella se introdujeron 0.5 g del material a evaluar (pasto estrella), 50 mL de la mezcla integrada por líquido de rumen y solución tampón en relación 1:3 y el concentrado en cantidades equivalentes con el aditivo microbiano (hidrolizado o crema). Los frascos de fermentación se esterilizaron previamente a 121 °C y 1.5 a.t.m. durante 15 min. El procedimiento se realizó

en atmósfera de CO<sub>2</sub> para garantizar las condiciones de estricta anaerobiosis. El inóculo ruminal se obtuvo a partir de cuatro vacas mestizas estabuladas y canuladas en rumen, alimentadas con una dieta de forraje de gramíneas y 2 kg/día de concentrado comercial y libre acceso al agua. La muestra de líquido ruminal se colectó a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío. Se conservó en un termo herméticamente cerrado hasta su traslado al laboratorio de microbiología y genética molecular del rumen en el Instituto de Ciencia Animal. Posteriormente, se filtró a través de muselina. Para conformar la mezcla que se iba a fermentar, se utilizó el total del líquido ruminal de las cuatro vacas mestizas de Holstein, con el propósito de eliminar el efecto animal.

La toma de muestras para la determinación de las poblaciones microbianas se efectuó antes de incubar y a las 3 y 6 h posteriores al momento de la incubación (hora 0).

**Técnicas de cultivo y conteos de microorganismos:** Se utilizó la técnica de cultivo de [Hungate \(1950\)](#) en tubos roll y en condiciones de anaerobiosis estricta. La siembra de bacterias viables totales y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de [Caldwell y Bryant \(1966\)](#), modificados por [Elías \(1971\)](#) y [Galindo \(1988\)](#). Para la determinación de la población de hongos se utilizó el medio de cultivo de [Joblin \(1981\)](#).

**Análisis estadístico:** Para el análisis de los datos se empleó la metodología propuesta por [Herrera et al. \(2015\)](#). Se probaron los supuestos teóricos del análisis de varianza: normalidad de los errores por la dócima de [Shapiro y Wilk \(1965\)](#), homogeneidad de varianza por la de [Levene \(1960\)](#) para las variables bacterias totales, proteolíticas, celulolíticas y hongos celulolíticos. Todas las variables incumplieron con dichos supuestos.

Posteriormente, se empleó la transformación de los datos y no mejoraron su cumplimiento, por lo que se empleó análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado no paramétrico en arreglo factorial 3x3 Kruskal-Wallis. En los casos donde la interacción no fue significativa, se informaron los efectos principales y se aplicó la dócima LSD de [Fisher \(1935\)](#).

Para el procesamiento de los datos, se utilizó el paquete estadístico Infostat ([Di Rienzo 2012](#)). En los casos donde la interacción no fue significativa, se registraron los efectos principales.

## Resultados

El hidrolizado de levaduras que se evaluó presenta concentraciones de oligosacáridos de glucanos de 3.34 ± 0.35 %. La crema que le dio origen tiene concentraciones de las referidas biomoléculas en concentraciones similares, solo que se encuentran en las paredes de las levaduras y no disponibles a los microorganismos ruminales en el producto. A partir de esos valores, la dosis de 100 mL/kg de concentrado equivale, aproximadamente, a 130 mg de β (1,3) glucano/kg de concentrado.

Del análisis de los resultados se puede informar que no hubo interacción significativa entre las poblaciones de bacterias viables totales, proteolíticas, celulolíticas y hongos celulolíticos con el tiempo de fermentación. La [tabla 1](#) muestra los efectos principales de los tratamientos en estos grupos microbianos. El hidrolizado de levaduras activó las poblaciones de bacterias viables totales del rumen (P=0.0088) y su población difirió de la encontrada cuando no se utilizó suplementación. La crema de levaduras propició valores intermedios de bacterias totales, sin manifestar diferencias entre los tratamientos control y con hidrolizado.

En términos de número poblacional de bacterias viables del rumen, la inclusión de dosis tan pequeñas como 100 mL/kg concentrado/d produce incrementos del 62 % de la población total de bacterias del rumen, lo que equivale a 19.36 x 10<sup>11</sup> UFC/mL más de bacterias, que significa incremento en biomasa bacteriana.

La población de bacterias celulolíticas fue significativamente más numerosa (P=0.0042) cuando se suplementó con el hidrolizado de levaduras con respecto a la crema que le dio origen y al tratamiento control sin suplementación, los que no difirieron entre sí ([tabla 1](#)). El número total de hongos celulolíticos se incrementó (P=0.0009) con la presencia del hidrolizado en el

**Tabla 1.** Efecto del hidrolizado de levaduras y la crema que le dio origen en algunos grupos fisiológicos de microorganismos del rumen

Tratamientos Variables	Control	Crema de levaduras	Hidrolizado de levaduras	EE± Significación
Bacterias totales viables, 10 <sup>11</sup> UFC/mL	30.94 <sup>b</sup> (4.48) DE=5.00	41.76 <sup>ab</sup> (7.70) DE=7.69	50.30 <sup>a</sup> (9.70) DE=7.23	P=0.0088
Bacterias proteolíticas, 10 <sup>6</sup> UFC/mL	41.06 (14.48) DE=15.79	36.76 (10.56) DE=5.67	41.06 (12.30) DE=5.48	P=0.3974
Bacterias celulolíticas, 10 <sup>6</sup> UFC/mL	3.91 <sup>b</sup> (3.74) DE=3.15	39.35 <sup>b</sup> (5.11) DE=2.70	52.22 <sup>a</sup> (8.48) DE=7.23	P=0.0042
Hongos celulolíticos, 10 <sup>8</sup> UFT/mL	30.80 <sup>b</sup> (2.33) DE=2.66	39.04 <sup>b</sup> (2.52) DE=1.63	53.17 <sup>a</sup> (4.63) DE=3.38	P=0.0009

() Medias de los datos originales, EE: error estándar

<sup>a,b</sup>: medias con letras diferentes en la misma fila difieren a p<0.05

UFC: unidades formadoras de colonias, UFT: unidades formadoras de talo

concentrado de los animales, cuando se relaciona con el tratamiento sin suplementar y con aquel suplementado con la crema de levaduras *S. cerevisiae*. El hidrolizado de levaduras y la crema que le dio origen no tuvieron efectos en la población de bacterias proteolíticas del rumen

En la investigación no se registró efecto del tiempo de fermentación en las poblaciones de bacterias viables totales, celulolíticas y hongos celulolíticos del rumen (tabla 2). Sin embargo, como muestra la tabla, las bacterias proteolíticas presentaron las menores poblaciones a las 3 h después de iniciada la fermentación (P=0.0269).

### Discusión

Múltiples han sido los mecanismos descritos acerca de que pequeñas dosis de levaduras adicionadas a la dieta de los rumiantes pueden estimular el crecimiento microbiano en el rumen (Marrero et al. 2015 y Marrero et al. 2020), fenómeno que se vincula a la calidad y tipo de dieta que consumen los animales.

Se ha informado que las paredes celulares de las levaduras pueden constituir, aproximadamente, 30 % de la materia seca de la célula. A escala estructural, la misma se integra por tres grupos de polisacáridos: polímeros de manosa o mananoproteínas, hasta 50 % de la MS; polímeros de glucosa o  $\beta$ - glucanos (1.3/1.6), hasta 55 % de la MS y, en menor proporción, polímeros de N-acetilglucosamina o quitina en 6 % de la MS de la pared celular (Díaz et al. 2017)

Uno de los mecanismos que facilitan estos productos biotecnológicos subscriben que el efecto activador tiene su origen en los factores de crecimiento que aprovisionan las levaduras para los microorganismos ruminales, como polisacáridos de pared, las vitaminas del complejo B, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y de cadena ramificada, las provitaminas y los micronutrientes (Chaucheyras-Durand 2006 y Díaz et al. 2017).

La estimulación del crecimiento microbiano, según refieren Chaucheyras-Durand (2006) y Díaz et al. (2017)

puede estar asociada a la presencia de dos factores de crecimiento, localizados en las diferentes fracciones celulares de la levadura. Uno de ellos termolábil de origen lipídico y otro termoestable con un posible origen peptídico. Rossi et al. (2004) aislaron a partir de *S. cerevisiae* dos fracciones peptídicas ricas en lisina e histidina, que resultaron efectivas en estimular el crecimiento de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*, principal bacteria que fermenta el lactato a nivel de rumen.

Otras teorías se postularon por los que encontraron que el malato presente en las levaduras es capaz de estimular el crecimiento de algunas bacterias Gram negativas del rumen. También Newbold et al. (1996) hallaron aumento, en la población de bacterias celulolíticas y la digestión de la fibra. Todo esto se revierte en un incremento en la proteína microbiana en el rumen que ayuda a explicar los efectos beneficiosos que se observan cuando se incluyen levaduras vivas o sus hidrolizados en la dieta de los animales.

Chaucheyras-Durand et al. (2008) demostraron la eficacia de las levaduras para influir en el crecimiento y la actividad enzimática de los microorganismos que fermentan la fibra en el rumen e informaron la estimulación *in vitro* del hongo *Neocallimastix frontalis* por el suministro que realizan las levaduras de tiamina y vitamina requeridas por los hongos del rumen para la zoosporogénesis. Además, estos autores indicaron que las levaduras estimulan el crecimiento y la actividad enzimática de las enzimas glucosidasas e hidrolasas. Las referidas enzimas se encuentran presentes en las bacterias que fermentan la fibra, como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus spp* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, por el suministro que hacen de nutrientes y vitaminas para esta población fibrolítica.

En general, son pocos los trabajos que analizan el efecto de los hidrolizados de levaduras en animales rumiantes. Sus mecanismos de acción específicos no se definen claramente. Galindo et al. (2010), al evaluar el efecto de dos niveles de hidrolizado enzimático de la levadura *S. cerevisiae* en la población microbiana ruminal de animales que consumen *Cenchrus purpureum* vc. Cuba CT-

**Tabla 2.** Efecto del tiempo de fermentación en algunos grupos fisiológicos de microorganismos del rumen con hidrolizado de levaduras y la crema que le dio origen como activadores ruminales

Indicadores	Sampling time, h			EE± Significación
	0	3	6	
Bacterias totales viables, 10 <sup>11</sup> UFC/mL	45.83 (8.96) DE=5.79	38.76 (6.85) DE=7.47	38.41 (6.07) DE=5.72	P=0.3934
Bacterias proteolíticas, 10 <sup>6</sup> UFC/mL	46.87 <sup>a</sup> (13.93) DE=9.71	31.24 <sup>b</sup> (11.26) DE=13.76	44.89 <sup>a</sup> (12.15) DE=5.63	P=0.0269
Bacterias celulolíticas, 10 <sup>6</sup> UFC/mL	43.31 (4.59) DE=2.63	44.46 (7.41) DE=7.45	35.71 (4.59) DE=3.88	P=0.2913
Hongos celulolíticos, 10 <sup>6</sup> UFT/mL	43.54 (3.59) DE=3.02	45.28 (3.78) DE=3.37	34.19 (2.11) DE=1.53	P=0.1217

Legenda: () Medias de los datos originales, EE: Error estándar

<sup>a,b</sup>: medias con letras diferentes dentro de la misma fila difieren a p<0.05

UFC: unidades formadoras de colonias, UFT: unidades formadoras de talo

115 informaron incrementos de las poblaciones de bacterias viables totales y de bacterias celulolíticas en condiciones *in vitro*. El nivel de 100 mL/kg de concentrado/día fue el que permitió obtener el mayor incremento de la población de bacterias viables totales.

Desafortunadamente, no se pudo determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el presente experimento. Al respecto, Kettunen *et al.* (2016) y Oeztuerk *et al.* (2016) informaron la eficacia de dos hidrolizados de levadura *S. cerevisiae*, que estimularon la fermentación *in vitro* de diferentes sustratos y aumentaron la producción de AGCC. Este aspecto, en particular deberá constituir objeto de estudios futuros, debido a que con este mismo producto Díaz *et al.* (2011) obtuvieron incrementos en la concentración total de AGCC, ácido propiónico y butírico en ovejos.

Más recientemente, Díaz *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la suplementación con hidrolizado de *S. cerevisiae* en los indicadores fermentativos en fermentadores RUSITEC con heno de alfalfa y concentrado en relación 1/1. Estos autores constataron incrementos en el crecimiento microbiano en rumen, especialmente de bacterias celulolíticas, con la adición del hidrolizado en la dieta. Este resultado se corresponde con lo planteado en la literatura científica acerca del efecto activador de las cepas de levaduras en las poblaciones de bacterias viables totales y bacterias celulolíticas, cuando estas cepas se emplean como aditivos en dietas para rumiantes (Herrera 2014 y Casas 2018).

Si se tiene en cuenta que el hidrolizado enzimático de *S. cerevisiae* está constituido, fundamentalmente, por péptidos de bajo peso molecular, oligosacáridos de glucanos y mananos, vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos, entre otros componentes, entonces es evidente que este producto puede ejercer efecto estimulador de la población microbiana ruminal, al igual que las cepas de levaduras vivas, por la presencia de las referidas sustancias presentes en el hidrolizado enzimático. Ello pudiera incidir, directamente, en el incremento de la población microbiana, específicamente la celulolítica y, como consecuencia, se obtienen incrementos en la degradabilidad ruminal de los nutrientes del forraje que reciben los animales (Valenciaga *et al.* 2019).

### Conclusiones

El hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* produce cambios en la población ruminal, incrementa las poblaciones de bacterias viables totales, bacterias y hongos celulolíticos, evento que pudiera favorecer la degradación de la fibra contenida en el pasto estrella.

### Agradecimientos

Se agradece a Onidia Moreira, Jorge Hernández, Aned Capó, Lucía Sarduy y Osvaldo Tuero por sus valiosas contribuciones a la investigación.

### Referencias

- AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20. ed. ed., Rockville MD: AOAC International., Latimer, George W. Jr., ISBN: 9780935584875, Available at: <http://www.worldcat.org/title/official-methods-of-analysis-of-aoac>
- Bernfeld, P. 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, 1: 149-158, ISSN: 1557-7988. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5).
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Applied Microbiology*, 14(5): 794-801, ISSN: 2471-9315. <https://doi.org/10.1128/am.14.5.794-801.1966>.
- Casas, S. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* y Aspergillus oryzae: estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 30(2): 1-8, ISSN: 2224-7920.
- Chaucheyras-Durand, F. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia* (Bratislava), 61/6: 741—750, ISSN: 1336-9563. <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0151-4>.
- Chaucheyras-Durand F., Walker, N.D. & Bach, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 5–26, ISSN: 2321-1628. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.019>.
- Díaz, A. 2018. Strategies for improving the nutritive value of conventional and organic forages. Tesis PhD. Universidad de León, Fac. de Veterinaria, Departamento Producción animal. España
- Díaz, A. Ranilla, M.J. & Saro, C. 2017. Influence of increasing doses of a yeast hydrolyzate obtained from sugarcane processing on *in vitro* rumen fermentation of two different diets and bacterial diversity in batch cultures and Rusitec fermenters. *Animal Feed Science and Technology*, 232: 129-138, ISSN: 2321-1628. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.011>.
- Díaz Reyes, A., Ranilla García, M., SaroHiguera, José., Tejido Mediavilla, C., Pérez Quintana, M. & Carro Travieso, M.D. 2011. Influence of increasy dosis of a yeast hidrolizate obtained from sugarcane processing on *in vitro* rumen fermentation of two different diets and bacterial diversity in batch cultures AND Rusitec fermenters. *Animal Feed Science and Technology*, 232:129-138, ISSN: 1520-6882. <https://doi.org/10.1021/ac601a017>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dubois, M., Gilles, K.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. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high molasses urea diet. Tesis Dr. Cs. Aberdeen
- Fisher, R. 1935. The Design of Experiments. *Biometrics Journal*, 20 (2): 307–321, ISSN: 1541-0420.
- Galindo, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en el rumen de animales que consumen ensilaje. Tesis Dr. C. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba
- Galindo, J., Diaz, A., González, N., Sosa, A., Marrero, Y., Aldana, A.I., Moreira, O., Bocourt, R., Torres, V., Sarduy, L. & Noda, A. 2010. Effect of hydrolyzed enzymatic product of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts on the ruminal microbial population with substrate of *Pennisetum prupureum* vc. Cuba CT-115 under *in vitro* conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 44(3): 275–279, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., Rodriguez, M., Valenciaga, D., Milian, G., López, J.R., Díaz, A., Bocourt, R., García, R., Camacho, Y., Rondón, A.J., Perez, M., Marrero, Y., Gonzalez, N., Sosa, A. & Herrera, M. 2019. Hidrolizate de *Saccharomyces cerevisiae* (PROBIOLEV®): su efecto como activador de la fermentación ruminal y producción de leche vacuna . Premio CITMA Mayabeque.
- Goering, H. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Agricultural Hand book. US Dept. Agriculture Washington, USA, No, 379.
- Herrera, M. 2014. Métodos Estadísticos alternativos de análisis con variables discretas y categóricas en investigaciones agropecuarias. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. Mayabeque, Cuba. 100 p.
- Herrera, M., Bustillo, C.W. & Torres, V. 2015. Metodología para el análisis estadístico de diferentes tipos de variables que se miden en las investigaciones que utilizan diseños experimentales relacionados con los modelos de análisis de varianza paramétrico y no paramétrico. ISBN: 978-959-7171-57-7.
- Hungate, R.D. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 14(1): 1-49, ISSN: 0005-3678. <https://doi.org/10.1128/br.14.1.1-49.1950>.
- Joblin, K. N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tube. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6): 111-112, ISSN: 1098-5336. <https://doi.org/10.1128/aem.42.6.1119-1122.1981>.
- Kettunen, K., Vuorenmaa, J., Gaffney, D. & Apajalahti, J. 2016. Yeast hydrolysate product enhances ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Animal Nutrition*, 4, ISSN: 2049-257X. <https://doi.org/10.1017/jan.2015.14.1-7>.
- Klis, F.M., Boorsma, P. & De Groot, J. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3): 185-2002, ISSN: 1097-0061. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. Contributions to Probability and Statistics. Stanford University Press: 278-292.
- Marrero, Y., Galindo, J., Castillo, Y. & Ruiz, O. 2020. Development of yeast additives for feeding ruminants in Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(4): 457-469, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Montoya, C. A., Ruiz, O., Elías, A. & Madera, N. 2015. Growth of *Pichia guilliermondii* strain Levisa 27 in different energy sources and nitrogen. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(1): 47-52, ISSN: 2079-3480.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J. & McIntosh, F.M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 76: 249-261, ISSN: 1475-2662.
- Rodríguez, M., Milián, G., Rondón, A.J., Bocourt, R., Laurencio, M., Portilla, Y. & Beruvides, A. 2015. Enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*: an additive with antibacterial potential for animal feeding. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(3): 389-397, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV frente a bacterias patógenas. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Matanzas, Cuba.
- Oeztuerk, H., Emre, M.B. & Breves, G. 2016. Effects of hydrolysed yeasts on ruminal fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Veterinárni Medicina*, 61(4): 195-203. <https://doi.org/10.17221/8820-VETMED>.
- Rossi, F., Di Lucia, D., Vicenti, P & Coconcelli, S. 2004. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cereviceae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Animal Research*, 53: 177-186, ISSN: 1627-3591.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591-611, ISSN: 1464-3510. <https://doi.org/10.2307/2333709>.
- Theodorou, M.K, Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4): 185-197, ISSN: 1873-2216. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6).
- Valenciaga, D., López, J. R., Delgado, A., Galindo, J., Herrera, M. & Monteagudo, F. 2019. Effect of the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the kinetics of ruminal degradation of nutrients of *Cenchrus purpureus* hybrid OM - 22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus americanus*) forage. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(3): 249-262, ISSN: 2079-3480.