

Inclusion of *Pichia guilliermondii* on different culture media, on *in vitro* fermentation of *Cynodon nlemfuensis*

Inclusión de *Pichia guilliermondii* en diferentes medios de cultivos en la fermentación *in vitro* de *Cynodon nlemfuensis*

Yoandra Marrero, Daily Sosa, R. Rodríguez and Yaneysi García

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

Email: ymarrero@ica.co.cu

The objective of this study was to evaluate the effect of inclusion of *Pichia guilliermondii* on different culture media on *in vitro* fermentation of *Cynodon nlemfuensis*. *In vitro* gas production technique was used, as well as a completely randomized design, with 6 x 7 factorial arrangement (six treatments per seven hours of fermentation). A strain of *P. guilliermondii* (Levica 27) was included on one of the treatments, which was cultured in malt extract broth and extract of yeast-peptone-glucose media. Two of the treatments included the supernatant of each medium after centrifugation, and another treatment suspended again cell pellet in a buffer medium. A control without yeast was also included. An amount of 1 g of *Cynodon nlemfuensis* was incubated as fibrous substrate. Gas production was measured at 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h. Results showed that Levica 27 strain, cultured in malt extract broth and extract of yeast-peptone-glucose media, stimulated *C. nlemfuensis* gas production in a higher proportion ($P < 0.001$) than when it was cultured in a malt extract broth medium, which demonstrated the influence of metabolites that produce yeasts and their stimulating effect.

Key words: yeasts, rumen, additives

The use of microbial additives in feed for ruminants, especially yeast, contributes to a better use of food, allowing the increase of productive yields and, consequently, milk and meat availability for humans (Stella *et al.* 2007, Doležal *et al.* 2011). Despite the advantages offered by these products, they are not produced in Cuba. Their high prices on the international market make them unaffordable for their livestock use.

Under these conditions, studies were conducted to obtain microbial additives that respond to the specific problems of a Cuban livestock, which is based on fibrous feeds. Currently, promising results have been obtained, in which strains not belonging to *S. cerevisiae* showed use potential as activators of ruminal fermentation under *in vitro* conditions, mainly *P. guilliermondii*, known as Levica 27 (Marrero *et al.* 2014). Therefore, *in vivo* studies were recommended to corroborate these results, for which large-scale culture is necessary.

It is known that the design of the culture medium is one of the most important tasks within biological technology. According to Winkler (1988), raw materials may represent between 30 and 80% of total cost of biotechnological products. In addition, the composition of culture medium has to meet all nutritional requirements

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la inclusión de *Pichia guilliermondii* en diferentes medios de cultivo en la fermentación *in vitro* de *Cynodon nlemfuensis*. Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* y un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 6 x 7 (seis tratamientos x siete horas de fermentación). En uno de los tratamientos se incluyó la cepa de *P. guilliermondii* (Levica 27), cultivada en los medios Caldo Extracto de Malta y Extracto de levadura-Peptona-Glucosa, en dos de ellos se incluyó el sobrenadante de cada medio después de centrifugación y en otro, se resuspendió el pellet de las células en medio buffer. Se incluyó además, un control sin levadura. Se incubó 1 g de *Cynodon nlemfuensis* como sustrato fibroso. La producción de gas se midió a las 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h. Los resultados mostraron que la cepa Levica 27, cultivada en los medios Caldo Extracto de Malta y Extracto de levadura-Peptona-Glucosa, estimuló la producción de gas de *C. nlemfuensis* en mayor proporción ($P < 0.001$) que cuando se cultivó en medio Caldo Extracto de Malta, lo que corroboró la influencia de los metabolitos que producen las levaduras y su efecto estimulador.

Palabras clave: levaduras, rumen, aditivos

La utilización de aditivos microbianos en la alimentación de rumiantes, en especial las levaduras, contribuye a un mayor aprovechamiento de los alimentos, lo que permite incrementar los rendimientos productivos y consecuentemente, la disponibilidad de leche y carne para el hombre (Stella *et al.* 2007, Doležal *et al.* 2011). A pesar de las ventajas que ofrecen estos productos, en Cuba no se producen. Sus altos precios en el mercado internacional los hacen incosteables para su uso en la ganadería.

Ante estas condiciones, se condujeron estudios para obtener aditivos microbianos que respondan a la problemática específica de una ganadería cubana, cuya base se halla en los alimentos fibrosos. En la actualidad, se han obtenido resultados promisorios, en los que las cepas que no pertenecen a la especie *S. cerevisiae* demostraron potencialidades de uso como activadoras de la fermentación ruminal en condiciones *in vitro*, entre las que se destacó *P. guilliermondii*, denominada Levica 27 (Marrero *et al.* 2014). Por ello, se recomendó realizar estudios *in vivo* que corroboren estos resultados, para lo que es necesario su cultivo a gran escala.

Se conoce que el diseño del medio de cultivo es una de las tareas más importantes dentro de la tecnología biológica. Según Winkler (1988), en el costo total de los

of the microorganism.

There are means specifically formulated for yeast growth, such as malt extract broth (MEB) and yeast-peptone-glucose (YPG) extract. In previous studies with the strain of *P. guilliermondii* (Levica 27), it was demonstrated, by indirect methods of growth determination (biomass and optical density), that there are differences between both culture media at 16 h. The highest concentrations of biomass were obtained for YPG medium, with values of 3.88 mg/mL, whereas there were 2.33 mg/mL with MEB. There was also an increase of pH, when the strain was cultured in the MEB medium (Sosa *et al.* 2015).

These results indicate that culture medium influences on the nature of metabolites produced by the strain, so it is possible that this may also affect the ruminal fermentation process, when it is included as an additive in animal feeding. Regarding these antecedents, this study was conducted with the objective of studying the effect of culturing *P. guilliermondii* on different media, in *in vitro* fermentation of *C. nlempfuensis*.

Materials and Methods

Treatments and experimental design. The technique of *in vitro* gas production and a completely randomized design with 6 x 7 factorial arrangement (six treatments x seven hours of fermentation) were used. The effect of the inclusion of *P. guilliermondii* growths on different culture media in the *C. nlempfuensis* gas production was determined. Moreover, the use of 10 g of DM/animal yeast was evaluated, because it is generally included on diets for ruminants (Rojo *et al.* 2000, Combellas *et al.* 2002, Beauchemin *et al.* 2003).

Treatments consisted on the inclusion of the culture of the strain of *P. guilliermondii* (Levica 27), at a rate of 5 mg of DM.mL⁻¹ (equivalent to 10 g of DM/animal), on MEB and YPG media. Furthermore, supernatants were included as treatments for each media, after centrifuging cultures at 6000 rpm. There was also a treatment with the pellet of cells re-suspended in the incubation medium used in gas production. It also included a control without yeast.

Preparation of yeast inocula. *Pichia guilliermondii* (Levica-27) strain was used, which belonged to the Bank of Microorganisms from the Department of Bio-physiological Sciences, from the Institute of Animal Science (Mayabeque, Cuba), and its sequence is registered in Gen Bank, with number JF894143.1.

The strain was activated by two subcultures on Petri dishes with Sabouraud agar at 30 °C and 24 h of incubation. Active strain colonies were taken with an inoculation loop and an inoculum of 24 h, with a concentration of 10⁷ cfu mL⁻¹, was prepared in YPG medium. The inoculum was centrifuged, the supernatant was removed and the pellet was washed and re-suspended in PBS. Erlenmeyers of 250 mL

productos biotecnológicos, las materias primas pueden representar entre 30 y 80 %. Además, la composición del medio de cultivo tiene que satisfacer todos los requerimientos nutricionales del microorganismo.

Existen medios formulados específicamente para el crecimiento de levaduras, como el Caldo Extracto de Malta (CEM) y el Extracto de levadura-Peptona-Glucosa (YPG). En estudios previos con la cepa de *P. guilliermondii* (Levica 27), se demostró con métodos indirectos de determinación de crecimiento (biomasa y densidad óptica) que existen diferencias entre ambos medios de cultivo a las 16 h. Se encontró que las mayores concentraciones de biomasa se obtuvieron para el medio YPG, con valores de 3.88 mg/mL, mientras que en CEM fue de 2.33 mg/mL. También se observó aumento en el pH, cuando se cultivó la cepa en medio CEM (Sosa *et al.* 2015).

Estos resultados indican que el medio de cultivo influye en la naturaleza de los metabolitos que la cepa produce, por lo que es posible que también afecte el proceso fermentativo ruminal, cuando se incluye como aditivo en la alimentación animal. Con estos antecedentes se realizó este trabajo, que tuvo como objetivo estudiar el efecto del cultivo de *P. guilliermondii* en diferentes medios en la fermentación *in vitro* de *C. nlempfuensis*.

Materiales y Métodos

Tratamientos y diseño experimental. Se empleó la técnica de producción de gas *in vitro* y un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 6 x 7 (seis tratamientos x siete horas de fermentación). Se determinó el efecto de la inclusión de crecimientos de *P. guilliermondii* en diferentes medios de cultivo en la producción de gas de *C. nlempfuensis*. Además, se valoró la utilización de 10 g de MS/animal de la levadura, por ser la que se incluye, generalmente, en dietas para rumiantes (Rojo *et al.* 2000, Combellas *et al.* 2002, Beauchemin *et al.* 2003).

Los tratamientos consistieron en la inclusión del cultivo de la cepa de *P. guilliermondii* (Levica 27), a razón de 5 mg de MS.mL⁻¹ (equivalente a 10 g de MS/animal) en los medios CEM y YPG. Además, se incluyeron como tratamientos los sobrenadantes para cada medio, después de centrifugados los cultivos a 6000 rpm. También hubo un tratamiento con el pellet de las células resuspendidas en el medio de incubación que se emplea en la producción de gas. Se incluyó además, uno control sin levadura.

Preparación de los inóculos de las levaduras. Se utilizó la cepa *Pichia guilliermondii* (Levica-27), perteneciente al Banco de Microorganismos del Departamento de Ciencias Biofisiológicas del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba), cuya secuencia está registrada en el Gen Bank con número JF894143.1.

Se activó la cepa mediante dos subcultivos en placas Petri con agar sabouraud a 30 °C y 24 h de incubación. Las colonias de la cepa activa se arrastraron con un asa de cultivo y se preparó en medio YPG un inóculo de 24 h, con concentración de 10⁷ ufc•mL⁻¹. El inóculo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el pellet se

of capacity were used with 100 mL of each medium under study, which was inoculated with microbial suspension at a rate of 1/10 (v/v) and incubated for 16 h on orbital shaker at 30 °C and agitation speed of 110 rpm. After removing these cultures from the shaker, they had a concentration of about 6.10^7 cfu•mL⁻¹ and pH of 5.74 and 7.03 for YPG and MEB, respectively.

Experimental procedure. Bottles 100 mL of capacity were used, to which 1 g of substrate (*C. nlemfuensis*) was added, as well as an incubation medium and an inoculum of ruminal microorganisms. These last at a rate of 0.20 of the total volume (16 mL of LRF + 64 mL of incubation medium = 80 mL). The chemical composition of the substrate (% of DM) was 96.21; 4.50; 34.65; 7.01; 0.46 and 0.40 for DM, CP, CF, ash, calcium and phosphorus. It was determined in LASAICA, according to AOAC (2012).

Twelve bottles per treatment and four bottles without substratum were incubated as target, for a total of 40 bottles. Ruminal content of an adult bovine, cannulated in the rumen and fed a diet similar to the evaluated one, was used as inoculum. Ruminal content was removed before feed supply and stored in closed thermos until getting to the lab, where it was filtered through several layers of gauze to form the inoculum.

Bottles were sealed and incubated in a water bath with controlled temperature, at 39 °C. Gas production was measured with a manometer HD8804, coupled to a pressure calibrator TP804 (DELTA OHM, Italy). Pressure readings became volume using a pre-established linear regression equation (gas (mL) = (pressure [103Pa] + 4.95)/2.5858); n=132; r=0.991). Gas volume was expressed per gram of incubated DM. Gas production was measured at 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h.

Mathematical analysis. In order to analyze the results of accumulated gas production, a curve modeling was conducted by Gompertz model, using a non-linear regression analysis with SPSS 15.0.1 (IBM Corporation 2006). Determination coefficient, significance of fit, parameters and normality of residues: $PG(a, b, c, t) = A \exp(-be^{-ct})$, were taken into consideration as statistical criteria of model fit goodness.

Homogeneity test of curves was performed according to the methodology presented by Jay *et al.* (2012a, b). As selection test, probability of null hypothesis fulfillment was used by the corrected Akaike information criterion (AICc). Multiple comparisons were performed, using the root of mean square distance among curves as measure. The Least Significant Difference (LSD) was used as test, with a significance level of $P < 0.05$. Experimental results were performed with InfoStat statistical package (Di Rienzo *et al.* 2001).

Results and Discussion

Figure 1 and table 1 show the results of accumulated

lavó y resuspendió en PBS. Se utilizaron erlenmeyers de 250 mL de capacidad con 100 mL de cada medio en estudio, que se inoculó con la suspensión microbiana a razón de 1/10 (v/v) y se incubó durante 16 h en zaranda orbital a 30 °C y velocidad de agitación de 110 rpm. Cuando se retiraron de la zaranda los cultivos, tenían una concentración de aproximadamente 6.10^7 ufc•mL⁻¹ y pH de 5.74 y 7.03 para el YPG y CEM, respectivamente.

Procedimiento experimental. Se utilizaron botellas de 100 mL de capacidad, a las que se adicionó 1 g de sustrato (*C. nlemfuensis*), un medio de incubación y un inóculo de microorganismos ruminales. Estos últimos en proporción de 0.20 del volumen total (16 mL de LRF + 64 de medio de incubación = 80 mL). La composición química del sustrato (% de MS) fue 96.21; 4.50; 34.65; 7.01; 0.46 y 0.40 para MS, PB, FB, ceniza, calcio y fósforo. Se determinó en el LASAICA, según AOAC (2012).

Se incubaron 12 botellas por tratamiento y cuatro botellas sin sustrato como blanco, para un total de 40 botellas. Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de un bovino adulto canulado en rumen y alimentado con dieta similar a la evaluada. El contenido ruminal se extrajo antes de la oferta del alimento y se conservó en termos cerrados hasta llegar al laboratorio, donde se filtró mediante varias capas de gasa para conformar el inóculo.

Las botellas se sellaron y se incubaron en un baño con temperatura controlada a 39 °C. La producción de gas se midió por medio de un manómetro HD8804, acoplado a un calibrador de presión TP804 (DELTA OHM, Italy). Las lecturas de presión se convirtieron en volumen mediante una ecuación de regresión lineal pre-establecida (gas (mL) = (presión [103Pa] + 4.95)/2.5858); n=132; r=0.991). El volumen de gas se expresó por gramo de MS incubada. La producción de gas se midió a las 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h.

Análisis matemático. Para el análisis de los resultados de producción acumulada de gases, se realizó la modelación de las curvas por el modelo de Gompertz, empleando el análisis de regresión no lineal con el programa SPSS 15.0.1 (IBM Corporation 2006). Se tomaron en cuenta, como criterios estadísticos de bondad de ajuste del modelo, el coeficiente de determinación, la significación del ajuste y los parámetros y normalidad de los residuos: $PG(a, b, c, t) = A \exp(-be^{-ct})$

La prueba de homogeneidad de las curvas se realizó de acuerdo con la metodología presentada por Jay *et al.* (2012a, b). Como prueba de selección, se utilizó la probabilidad de cumplimiento de hipótesis nula por el criterio de información de Akaike corregido (CIAC). Las comparaciones múltiples se realizaron tomando como medida la raíz de la distancia media cuadrática entre las curvas. La dócima empleada fue la Mínima Diferencia Significativa (LSD), con nivel de significación de $P < 0.05$. Los resultados experimentales se analizaron con el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2001).

Resultados y Discusión

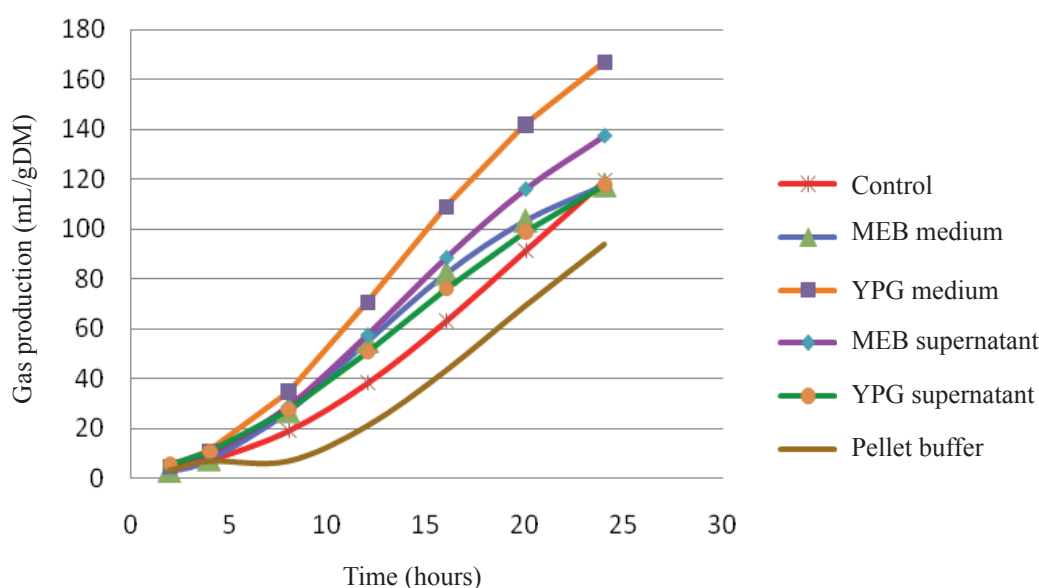
Los resultados de la producción de gas acumulada

Table 1. Results of multiple comparisons of values from accumulated gas production of *C. nlemfuensis*, with the inclusion of Levica 27, cultured in different media

	Treatments						S. E.	Δ AICc	Sign.
	Control ^a	MEB Medium ^b	YPG Medium ^c	MEB Supernatant ^d	YPG Supernatant ^b	Pellet buffer ^e			
A	119.53	117.46	166.92	137.51	117.63	93.81	3.41	90.96	<0.001
b	4.787	5.104	4.886	4.692	4.150	4.886			
c	0.079	0.142	0.123	0.117	0.105	0.108			
R ²	0.946	0.842	0.936	0.917	0.885	0.869			

^{a,b,c,d,e} Different letters indicate significant differences by LSD for P<0.05.

Control: Treatment without the inclusion of yeast; MEB medium: Levica 27 cultivated in MEB medium; YPG medium: Levica 27 cultivated in YPG medium; MEB supernatant: supernatant of Levica 27 culture in a MEB medium after centrifuged; YPG supernatant: supernatant of Levica 27 culture in a YPG medium after centrifuged; Pellet buffer: culture cells of Levica 27 after centrifuged, re-suspended in a buffer medium.

Figure 1. Accumulated gas production of *C. nlemfuensis* with the inclusion of Levica 27, cultured in different media

gas production of Levica 27 in *in vitro* fermentation of *C. nlemfuensis* in different hours of study.

After the fourth hour, treatments using the yeast and its metabolites showed superior gas production to the control up to the 20th hour. Treatment that cultivated cells of the strain (pellet), re-suspended in a buffer solution, did not stimulate substratum gas production. Nevertheless, it is important to point out that at the 24th hour, gas production of treatments with MEB and YPG supernatant, was equal to that obtained with control, so it stimulated fermentation up to around 20 h.

Results of multiple comparisons of values of accumulated gas production (table 1) show that inclusion of Levica 27, cultivated in YPG medium and its supernatant of its culture in a MEB medium, stimulated gas production of star grass, being higher with the presence of the first. This indicates that cells of Levica 27, as metabolites produced by this yeast in a YPG medium, were used by ruminal microorganisms

de la cepa Levica 27 en la fermentación *in vitro* de *C. nlemfuensis* en las diferentes horas de estudio se muestran en la figura 1 y la tabla 1.

Se puede observar que a partir de la hora cuatro, los tratamientos donde estuvo la levadura y sus metabolitos mostraron producción de gas superior al control hasta la hora 20. El tratamiento en el que se cultivaron las células de la cepa (pellet), resuspendidas en solución buffer, no estimuló la producción de gas del sustrato. No obstante, se debe señalar que a la hora 24, la producción de gas de los tratamientos con medio CEM y sobrenadante de YPG igualó a la obtenida con el control, por lo que su efecto estimulador fue, aproximadamente, hasta las 20 h de fermentación.

Los resultados de las comparaciones múltiples de los valores de producción de gas acumulada (tabla 1) muestran que la inclusión de la cepa Levica 27, cultivada en medio YPG y del sobrenadante de su cultivo en medio CEM, estimuló la producción de gas del pasto estrella, siendo mayor con la presencia del primero. Lo anterior indica que estas células de Levica 27, como los metabolitos que

and increased their fermentative activity in the grass used as substratum, while yeast cells grown in a MEB medium, decreased gas production.

These results agree with studies performed by Marrero *et al.* (2006, 2010), with a strain of *S. cerevisiae* under Cuban and Colombian conditions, respectively. In both studies, it was concluded that yeast living cells and produced metabolites, have stimulating effect on populations of cellulolytic bacteria and, hence, the production of short-chain fatty acids (SCFA). This must be taken into account for obtaining ruminal fermentation activator products. Holtshausen and Beauchemin (2010) reported that most of the stimulating activity of these microorganisms is associated to live cells, although, in this study, Levica 27 cells, cultivated in a MEB medium, did not show this effect.

Literature refers to diverse action mechanisms of yeasts as activators of ruminal fermentation. Sirisan *et al.* (2013) stated that positive effect of yeasts on the rumen is a result of the stimulation of growth of certain populations of microorganisms, with its consequent effect on feed fermentation.

Several authors refer to the stimulating action of *S. cerevisiae* by providing, by the yeast, growth factors, organic acids, vitamins and small peptides that stimulate bacterial growth. These authors also stated the ability of yeasts to balance redox potential of rumen liquor to create optimal fermentation conditions by bacteria within this organ (Jouany 2001).

Recently, Yuan *et al.* (2015) proposed that yeast removes the oxygen present in the rumen and promotes the development of anaerobic microorganisms. Therefore, it improves fiber digestion. However, Salvati *et al.* (2015) found stimulating effects of *Saccharomyces* cells, living and dead, on feeding of lactating cows, which do not reaffirm this theory.

Mendes *et al.* (2012) suggested that yeasts are capable of degrading simple carbohydrates, which could favor growth of populations, and also contribute to ruminal pH regulation. Finally, another less studied aspect refers that different species of yeasts are able of producing and storing sugars as trehalose, from 10% to 20% of its dry weight, under unfavorable environmental conditions (Elbein *et al.* 2003).

It is known that structure and physicochemical properties of trehalose confer great stability, and this carbohydrate is accumulated in the cytosol of yeasts under abiotic stress conditions, due to its protective effect against dryness, high temperatures, freezing, high salinity and oxidation. Thanks to these properties, trehalose has important applications in the food, cosmetic, and pharmaceutical industry, as well as for research, as indicated by González *et al.* (2015). These authors report that *Candida* yeasts were high

produce esta levadura en el medio YPG, se utilizaron por parte de los microorganismos ruminales y aumentaron su actividad fermentativa en el pasto utilizado como sustrato, mientras que las células de la levadura crecidas en medio CEM disminuyeron la producción de gas.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Marrero *et al.* (2006, 2010), con una cepa de *S. cerevisiae* en las condiciones de Cuba y Colombia, respectivamente. En ambos trabajos se concluyó que las células vivas de la levadura y los metabolitos que produce tienen efecto estimulador en las poblaciones de bacterias celulolíticas y por ende, en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Esto se debe tener en cuenta en la obtención de productos activadores de la fermentación ruminal. Holtshausen y Beauchemin (2010) afirmaron que la mayor parte de la actividad estimuladora de estos microorganismos está asociada a la célula viva, aunque en este estudio las células de Levica 27, cultivadas en medio CEM, no demostraron este efecto.

En la literatura se refieren diversos mecanismos de acción de las levaduras como activadoras de la fermentación ruminal. Sirisan *et al.* (2013) afirmaron que el efecto positivo de las levaduras en el rumen está dado porque estimulan el crecimiento de ciertas poblaciones de microorganismos, con su efecto consecuente en la fermentación de alimentos.

Varios autores se refieren a la acción estimuladora de *S. cerevisiae* por el abastecimiento, por parte de la levadura, de factores de crecimiento, ácidos orgánicos, vitaminas y pequeños péptidos que estimulan el crecimiento bacteriano. También se ha abordado la capacidad de las levaduras de equilibrar el potencial redox de fluido ruminal para crear las condiciones óptimas de fermentación por parte de las bacterias que habitan este órgano (Jouany 2001).

Más recientemente, Yuan *et al.* (2015) propusieron que la levadura remueve el oxígeno presente en el rumen y promueve el desarrollo de los microorganismos anaerobios y por lo tanto, mejora la digestión de la fibra. Sin embargo, Salvati *et al.* (2015) encontraron efectos estimuladores de células de *Saccharomyces*, vivas como muertas, en la alimentación de vacas lactantes, lo que no reafirma esta teoría.

Mendes *et al.* (2012) sugirieron que las levaduras son capaces de degradar los hidratos de carbono simples, lo que podría favorecer el crecimiento de las poblaciones, y también contribuir a la regulación del pH ruminal. Finalmente, otro aspecto poco estudiado se refiere a que diferentes especies de levaduras son capaces de producir y almacenar azúcares como la trehalosa, desde 10 % hasta 20 % de su peso seco, en condiciones ambientales no favorables (Elbein *et al.* 2003).

Se conoce que la estructura y propiedades físico-químicas de la Trehalosa le confieren gran estabilidad, y que este carbohidrato se acumula en el citosol de las levaduras en condiciones de estrés abiótico, debido a su efecto protector contra la desecación, altas temperaturas,

producers of this disaccharide under thermal stress conditions.

In this study, difference in composition of media that cultured this yeast (MEB and YPG) lies, mainly, in that the former includes malt extract. This component constitutes a diverse energy source, which surely influenced on metabolic processes developed by the yeast strain and final products of these processes that expressed through the pH found in the culture in both media (5.74 and 7.03, respectively). These products of yeast growth also influenced on gas production of *C. nlemfuensis*, so it is necessary to deepen on their nature.

Nevertheless, there are many factors influencing on the inclusion of yeasts to stimulate the ruminal fermentative process, including diet, animal, and yeast species and strain (Marrero *et al.* 2015). This reaffirms the importance of selecting the strains and culture medium suitable for their use as an additive in diets for ruminants, according to the feed used.

It is concluded that Levica 27 strain, cultivated in YPG medium, stimulated the gas production of *C. nlemfuensis* at a higher proportion than within the MEB culture medium, which confirmed the influence of metabolites produced by the yeast and its stimulating effect. Further studies are recommended to explain the nature of metabolites produced by Levica 27 in YPD and MEB media because they stimulated gas production of *C. nlemfuensis*.

congelación, alta salinidad y oxidación. Gracias a estas propiedades, la trehalosa tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y en la investigación, según indican González *et al.* (2015). Estos autores informan que levaduras del género *Candida* fueron altas productoras de este disacárido en condiciones de estrés térmico.

En este estudio, la diferencia en la composición de los medios en los que se cultivó la levadura (CEM y YPG) radica, fundamentalmente, en que el primero incluye extracto de malta. Este componente constituye una fuente energética variada, lo que seguramente influyó en los procesos metabólicos desarrollados por la cepa de levadura y los productos finales de estos procesos que se expresaron a través del pH encontrado en el cultivo en ambos medios (5.74 y 7.03, respectivamente). Estos productos del crecimiento de la levadura también influyeron en la producción de gas de *C. nlemfuensis*, por lo que es necesario profundizar en la naturaleza de los mismos.

No obstante, existen múltiples factores que influyen al incluir las levaduras para estimular el proceso fermentativo ruminal, entre los que se destacan la dieta, el animal, la especie y la cepa de levadura (Marrero *et al.* 2015). Esto reafirma la importancia de seleccionar las cepas y el medio de cultivo adecuados para su utilización como aditivo en dietas para rumiantes, de acuerdo con el alimento que se desee emplear.

Se concluye que la cepa Levica 27, cultivada en medio YPG, estimuló la producción de gas de *C. nlemfuensis* en mayor proporción que en el cultivo en medio CEM, lo que corroboró la influencia de los metabolitos que la levadura produce y su efecto estimulador. Se recomienda encaminar estudios para dilucidar la naturaleza de los metabolitos que produce la levadura Levica 27 en los medios YPD y CEM, ya que estimularon la producción de gas de *C. nlemfuensis*.

References

- AOAC 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th ed., Gaithersburg, Md.: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-83-7, Available: <http://www.amazon.com/Official-Methods-Analysis-OFFICIAL-ANALYSIS/dp/0935584838/ref=pd_sim_sbs_14_1?ie=UTF8&dpID=31iikC-xl2L&dpSrc=sims&preST=_AC_UL160_SR160%2C160_&refRID=101AB94246X0EM9N7XMW>, [Consulted: April 1, 2016].
- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W. & Leedle, J. A. Z. 2003. "Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle". *Journal of Animal Science*, 81(6): 1628–1640, ISSN: 1525-3163, DOI: 10.2527/2003.8161628x.
- Combella, J., Jacqueline, S., Tesorero, M. & Gabaldón, L. 2002. "Animal response of yearling cattle to the addition of yeast culture to a diet of pasture, poultry litter and wheat middlings". *Zootecnia Tropical*, 20(3), ISSN: 0798-7269, Available: <<https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/21217>>, [Consulted: September 9, 2016].
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2001. InfoStat. version 2001, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Doležal, P., Dvořáček, J., Doležal, J., Čermáková, J., Zeman, L. & Szwedziak, K. 2011. "Effect of feeding yeast culture on ruminal fermentation and blood indicators of Holstein dairy cows". *Acta Veterinaria Brno*, 80(2): 139–145, ISSN: 0001-7213, 1801-7576, DOI: 10.2754/avb201180020139.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. & Carroll, D. 2003. "New insights on trehalose: a multifunctional molecule". *Glycobiology*, 13(4): 17–27, ISSN: 1460-2423, DOI: 10.1093/glycob/cwg047.
- González, H. J. C., Alcántar, C. M. A. & Cortés, R. C. 2015. "Producción de trehalosa a partir de levaduras no-convencionales". *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(1): 11–23, ISSN: 1665-2738.
- Holtshausen, L. & Beauchemin, K. A. 2010. "Supplementing Barley-Based Dairy Cow Diets with *Saccharomyces cerevisiae*". *The Professional Animal Scientist*, 26(3): 285–289, ISSN: 1080-7446, DOI: 10.15232/S1080-7446(15)30595-7.
- IBM Corporation 2006. IBM SPSS Statistics. version 15.0.1, [Windows], Multiplataforma, U.S: IBM Corporation, Available:

<<http://www.ibm.com>>.

- Jay, O., Torres, V., Marrero, Y. & Torres, J. P. 2012a. "Sensibility analysis of homogeneity tests of *in vitro* gas production curves by Monte Carlo simulation". Cuban Journal of Agricultural Science, 46(1): 15–22, ISSN: 2079-3480.
- Jay, O., Torres, V., Marrero, Y. & Torres, P. 2012b. "Tests assessment for multiple comparisons of *in vitro* gas curves, from the root of the mean square distance". Cuban Journal of Agricultural Science, 46(2): 133–138, ISSN: 2079-3480.
- Jouany, J. P. 2001. "A new look at yeast cultures as probiotics for ruminants". Feed Mix, 9(6): 17–19, ISSN: 0928-124X.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Ruiz, O., Burrola, E. & Angulo, C. 2015. "Feeding of yeast (*Candida* spp.) improves *in vitro* ruminal fermentation of fibrous substrates". Journal of Integrative Agriculture, 14(3): 514–519, ISSN: 2095-3119, DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60830-3.
- Marrero, Y., Galindo, J., Aldama, A. I., Moreira, O. & Cueto, M. 2006. "*In vitro* effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the microbial rumen population and fermentative indicators". Cuban Journal of Agricultural Science, 40(3): 313–320, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Martín, E., Rodríguez, D. & Galindo, J. 2010. "Effect of the inclusion of fractions of *Saccharomyces cerevisiae* culture on the *in vitro* ruminal fermentation of star grass (*Cynodon nlemfuensis*)". Cuban Journal of Agricultural Science, 44(2): 157–163, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Ruiz, O., Corrales, A., Jay, O., Galindo, J., Castillo, Y. & Madera, N. 2014. "*In vitro* gas production of fibrous substrates with the inclusion of yeast". Cuban Journal of Agricultural Science, 48(2): 119–123, ISSN: 2079-3480.
- Mendes, de A. P. N., Robson, D. E., Oliveira, A. F., Silva, F. C. E., Castro, G. L. & Rosa, C. A. 2012. "Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed different sources of forage". Revista Brasileira de Zootecnia, 41(11): 2336–2342, ISSN: 1806-9290, DOI: 10.1590/S1516-35982012001100006.
- Rojo, R., Mendoza, M., García, B., Bárcena, G. & Aranda, I. 2000. "Intake and digestibility of tropical grasses in steers with nitrogen supplementation and *Saccharomyces cerevisiae*". Revista de la Facultad de Agronomía, 17(4): 358–370, ISSN: 0378-7818.
- Salvati, G. G. S., Morais Júnior, N. N., Melo, A. C. S., Vilela, R. R., Cardoso, F. F., Aronovich, M., Pereira, R. A. N. & Pereira, M. N. 2015. "Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer". Journal of Dairy Science, 98(6): 4062–4073, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2014-9215.
- Sirisan, V., Pattarajinda, V., Vichitphan, K. & Leasing, R. 2013. "Isolation, identification and growth determination of lactic acid-utilizing yeasts from the ruminal fluid of dairy cattle". Letters in Applied Microbiology, 57(2): 102–107, ISSN: 0266-8254, DOI: 10.1111/lam.12078.
- Sosa, D., García, Y., Marrero, Y., Albelo, N. & Moreira, B. 2015. "Characterization of *Pichia guilliermondii* (Levica-27) for use as microbial additive in animal production". In: II Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria, Centro de Convenciones Plaza América, Varadero, Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), p. 297, ISBN: 978-959-7125-45-7, Available: <<http://www.sanidadagropecuaria.com/>>, [Consulted: September 9, 2016].
- Stella, A. V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux, E., Dell'Orto, V. & Savoini, G. 2007. "Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats". Small Ruminant Research, 67(1): 7–13, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.08.024.
- Winkler, M. A. 1988. "Optimisation and time-profiling in fermentation processes". Progress in industrial microbiology, 25: 91–150, ISSN: 0079-6352.
- Yuan, K., Liang, T., Muckey, M. B., Mendonça, L. G. D., Hulbert, L. E., Elrod, C. C. & Bradford, B. J. 2015. "Yeast product supplementation modulated feeding behavior and metabolism in transition dairy cows". Journal of Dairy Science, 98(1): 532–540, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2014-8468.

Received: June 21, 2016