

## Enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*: an additive with antibacterial potential for animal feeding

## Hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo con potencial antibacteriano para la alimentación animal

Marlen Rodríguez<sup>1</sup>, Grethel Milián<sup>1</sup>, Ana J. Rondón<sup>1</sup>, R. Bocourt<sup>2</sup>, Marta Laurencio<sup>1</sup>,  
Yadileiny Portilla<sup>1</sup> and A. Beruvides<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero, km 3 ½, Matanzas, Cuba

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba

Email: marlen.rodriguez@umcc.cu

In order to evaluate the antibacterial potential of an enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*, three *in vitro* experiments were performed. The confrontation of the biopreparation with the pathogenic microorganisms was performed through the methods of substance diffusion in agar, the co-culture establishment and the co-aggregation technique. Bacterial isolations were taken from the liver of sick chicken, and were isolated and identified at the Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA) in Matanzas. It was demonstrated that the hydrolyzed preparation contains antibacterial substances, mainly bacteriocins and/or antibiotics, which inhibit the growth of *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* and *E. coli spp.* The antibacterial effect of this additive was demonstrated after decreasing the population of pathogenic bacteria, when they are cultivated in the same medium. The strains of *Salmonella spp.* and *E. coli spp.* induce the ability of co-aggregation (32.7 and 22.3 %, respectively) to the components of the cell wall of yeasts within the hydrolyzed preparation. Results indicate the limited growth of bacterial strains in the presence of the enzymatic hydrolyzed preparation of yeast. This activity is multifactorial and unleashes different processes that are interrelated and, as a consequence, favor the improvements of physiology, yield and health of animals. Therefore, it can be used as an additive for animal feeding.

Key words: enzymatic hydrolyzed preparation, antibacterial activity, co-aggregation, pathogenic bacteria

The biotechnological treatment and use of yeast residues allows the use of food additives for animal production because these are low cost products with positive effects on health and on the zootechnical performance of animals. On the other hand, their utilization contributes to the decrease the risks of environmental contamination (Fleet 2007, Jacques and Casaregola 2008 and Pérez *et al.* 2012).

Among the substances with prebiotic activity, there are some of the structural components of the cell walls of yeasts, and the strains from *Saccharomyces cerevisiae* are among the most used. Polysaccharides and other products of their hydrolysis produce prebiotic effects, mainly because they stimulate the immunological response and prevent infectious diseases in animals and humans (Lourenco *et al.* 2011 and Van-Staden and Dicks 2012).

Because of its nutritional, pharmacological and

Para evaluar el potencial antibacteriano de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron tres experimentos *in vitro*. El enfrentamiento del biopreparado a los microorganismos patógenos se realizó mediante los métodos de difusión de sustancias en agar, el establecimiento de cocultivos y la técnica de la coagregación. Los aislados bacterianos procedían del hígado de pollos enfermos y se aislaron e identificaron en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA) de Matanzas. Se demostró que el hidrolizado contiene sustancias antibacterianas, fundamentalmente bacteriocinas y/o antibióticos que inhiben el crecimiento de *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli spp.* Se comprobó el efecto antibacteriano de este aditivo, al disminuir la población de bacterias patógenas, cuando se cultivan en el mismo medio. Se observó que las cepas de *Salmonella spp.* y *E. coli spp.* inducen habilidad de coagregación (32.7 y 22.3 %, respectivamente) a los componentes de la pared celular de las levaduras presentes en el hidrolizado. Los resultados indican el limitado crecimiento de las cepas bacterianas en presencia del hidrolizado enzimático de levadura. Esta actividad es multifactorial y desencadena diferentes procesos que se interrelacionan y como consecuencia, provocan mejoras en la fisiología, el rendimiento y la salud de los animales. Por ello, se puede inferir su utilización como aditivo en la alimentación animal.

Palabras clave: hidrolizado enzimático, actividad antibacteriana, coagregación, bacterias patógenas

El uso y tratamiento biotecnológico de residuos de levaduras permite disponer de aditivos alimenticios para la producción animal, ya que son productos de bajo costo con efectos positivos en la salud y en el desempeño zootécnico de los animales. Por otra parte, su utilización contribuye a la disminución de los riesgos de contaminación ambiental (Fleet 2007, Jacques y Casaregola 2008 y Pérez *et al.* 2012).

Entre las sustancias consideradas con actividad prebiótica, se encuentran algunos de los componentes estructurales de la pared celular de las levaduras, y entre las más utilizadas se hallan las cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Los polisacáridos y otros productos de su hidrólisis producen efectos prebióticos, principalmente porque estimulan la respuesta inmunológica y previenen enfermedades infecciosas en los animales y el hombre (Lourenco *et al.* 2011 y Van-Staden y Dicks 2012).

dynamic characteristics, the strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) have been used in animal feeding for several decades, because they provide proteins, minerals, and B complex vitamins. In addition, their cell wall is formed, partly, by mannanes and beta-glucanes that, after being released, may favor the intestinal exclusion of pathogenic bacteria (Moslehi-Jenabian *et al.* 2010 and Carro *et al.* 2014).

Pérez *et al.* (2006) described the methodology for obtaining the enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*. This product contains viable cells of Bacillus and its endospores, which potentiate the favorable effects of this bio-preparation on the prevention of infectious diseases in animals of zootechnical importance (Pérez *et al.* 2011 and Milián *et al.* 2014). However, it is not known which specific antimicrobial action develops this bio-preparation in front of harmful bacteria from the gastrointestinal ecosystem. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antibacterial potential of an enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae* in front of potentially pathogenic strains, using three *in vitro* experiments.

### Materials and Methods

*Production of an Enzymatic Hydrolyzed Preparation of Yeast.* The cream of *Saccharomyces cerevisiae* was obtained from an alcohol distillery plant belonging to the Complejo Agroindustrial "Jesús Rabi" in Calimete, Matanzas province. For preparing the enzymatic raw and producing the hydrolyzed of *S. cerevisiae* yeast, the methodology described and registered by Pérez *et al.* (2006) was used.

*Treatment of the indicator strains.* Wild strains of *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* and *E. coli* were used, which were isolated from the liver of sick fowls and identified at the Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA) from Matanzas. All the indicator strains were inoculated in a nutrient-enriched medium and incubated into a shaker (MAXQ-600), under anaerobic conditions for 24 hours at 37 °C.

*Determination of the antibacterial effect of the hydrolyzed preparation in co-cultures with potentially pathogenic bacteria.* The antagonistic activity of an enzymatic hydrolyzed preparation of yeast was studied through the associated cultures or culture mixtures. The technique described by Orłowski and Bielecka (2006), and modified by Rodríguez (2010), was used. The development of a co-culture took place in a shiny green bile medium (BVB, Biocen), which was added in flasks of 100 mL, at a rate of 50 mL of effective volume. An amount of 3.6 mL of the enzymatic hydrolyzed preparation and 5 mL of the culture with the potentially pathogenic or indicator microorganism (with a population of  $1 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) were added to each flask. Once they are mixed, the co-cultures

Gracias a sus características nutricionales y farmacodinámicas, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) se utilizan en la alimentación animal y humana desde hace varias décadas, pues proveen de proteínas, minerales y vitaminas del complejo B. Además, su pared celular está constituida, en parte, por mananos y beta-glucanos que, al liberarse, pueden favorecer la exclusión intestinal de bacterias patógenas (Moslehi-Jenabian *et al.* 2010 y Carro *et al.* 2014).

Pérez *et al.* (2006) describieron la metodología para la obtención de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (HELSc). Este producto hidrolizado posee en su composición células viables de Bacillus y sus endosporas, que potencian los efectos favorables de este biopreparado en la prevención de enfermedades infecciosas en animales de interés zootécnico (Pérez *et al.* 2011 y Milián *et al.* 2014). Sin embargo, no se conoce qué acciones antimicrobianas específicas desarrolla este biopreparado ante bacterias nocivas del ecosistema gastrointestinal. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar mediante tres experimentos *in vitro* el potencial antibacteriano de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* ante cepas potencialmente patógenas.

### Materiales y Métodos

*Elaboración del Hidrolizado Enzimático de Levadura.* La crema de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo en la planta de destilería de alcohol perteneciente al Complejo Agroindustrial "Jesús Rabi" de Calimete, provincia de Matanzas. Para la preparación del crudo enzimático y la elaboración del hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* se siguió la metodología descrita y patentada por Pérez *et al.* (2006).

*Tratamiento de las cepas indicadoras.* Se utilizaron las cepas salvajes de *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli*, aisladas del hígado de pollos enfermos e identificadas en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA) de Matanzas. Todas las cepas indicadoras se inocularon en caldo nutriente enriquecido y se incubaron en zaranda termostataada (MAXQ-600) en condiciones de aerobiosis durante 24 horas a 37 °C.

*Determinación del efecto antibacteriano del hidrolizado en cocultivos con bacterias potencialmente patógenas.* La actividad antagónica del hidrolizado enzimático de levadura se estudió mediante cultivos asociados o mezclas de cultivos. Se utilizó la técnica descrita por Orłowski y Bielecka (2006), modificada por Rodríguez (2010). El desarrollo del cocultivo tuvo lugar en caldo bilis verde brillante (BVB, Biocen), que se adicionó en frascos de 100 mL, a razón de 50 mL de volumen efectivo. En cada frasco se añadieron 3,6 mL de hidrolizado enzimático y 5 mL del cultivo del microorganismo potencialmente patógeno o indicador (con una población de  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Una vez mezclados, los cocultivos se incubaron en condiciones

were incubated under static conditions for 12 h at 37 °C, and samples were taken at 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h in order to perform serial dilutions in a peptone medium (1 %). The culture took place in plaques with Agar MacConkey (Biocen) for counting viables. As indicator strains, the pure strains of *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* and *E. coli* were used, which were inoculated in the same medium (BVB).

*Determination of antibacterial substances.* The method of diffusion of substances in agar was applied, which was proposed by Schillinger and Lucke (1989).

*Determination of antibacterial substances of the hydrolyzed preparation in front of positive and negative Gram bacteria.* A total of 10 mL of the hydrolyzed preparation were taken and they were centrifuged at 15,000 rpm at 5 °C for 10 min. in a refrigerated centrifuge (P-selecta-Mixtasel). Later, the supernatant was sterilized with cellulose acetate filters, with pores of 0.22 µm (Minisart, satorius 600 kPa max). The supernatant was used in three variants: V1- supernatant without modification, V2 – modified supernatant, with the addition of NaOH 0.1 N (up to pH 7) to remove the action of acids, and V3 – modified supernatant with the addition of the pronase enzyme (1 mg. mL<sup>-1</sup>) to remove the action of bacteriocins. The potentially pathogenic strains used in the previous experiment were used as indicator strains.

*Development of the technique of diffusion in agar.* An amount of 200 µL was taken from the cultures of the indicator strains. They were inoculated in tubes with 20 mL of nutrient enriched agar (with 1 % of Ion-Agar, OXOID) at 45 °C. They were poured in plaques for their solidification. In each plaque that contained indicator strains, small wells of 7 mm of diameter were opened, in which 20 µL of variants 1, 2 and 3 of the supernatant of the hydrolyzed preparation were deposited. The plaques were maintained at 5 °C for 4 h until achieving the best diffusion of substances in agar. Later, they were incubated for 24 h at 37 °C until finding the growth and appearance of inhibition halos. The diameter of halos was measured with a ruler. The diameter of the small wells was subtracted from each value.

*Determination of the co-aggregation of potentially pathogenic bacteria to the components of the cell Wall of yeasts within the the hydrolyzed preparation.* The percent of co-aggregation was determined using the formula of Orłowski and Bielecka (2006).

Percent of co-aggregation =  $\{[(Ax_i + Ay_i)/2 - At(x + y) / (Ax_i + Ay_i/2)]\} \cdot 100$

Where:

$Ax_i$ : Absorbency at 5 h of the indicator strain

$Ay_i$ : Absorbency at 5 h of the yeast hydrolyzed preparation

$A_t(x + y)$ : Absorbency of the mixture of indicator strain + yeast hydrolyzed preparation

$Ax_i$ : Absorbency of the indicator strain in the initial

estáticas durante 12 h a 37 °C y se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h para realizar diluciones seriadas en caldo peptona (1 %). La siembra se llevó a cabo en placas con Agar MacConkey (Biocen) para el conteo de viables. Como cepas indicadoras, se utilizaron las cepas puras de *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli*, que se inocularon en el mismo medio (BVB).

*Determinación de sustancias antibacterianas.* Se aplicó el método de la difusión de sustancias en agar, propuesto por Schillinger y Lucke (1989).

*Determinación de sustancias antibacterianas del hidrolizado frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.* Se tomaron 10 mL de hidrolizado y se centrifugaron a 15 000 rpm a 5 °C durante 10 min. en centrifuga refrigerada (P-selecta-Mixtasel). Seguidamente, se esterilizó el sobrenadante mediante filtros de acetato de celulosa, con poros de 0,22 µm (Minisart, satorius 600 kPa max). El sobrenadante se utilizó en tres variantes: V1 - sobrenadante sin modificar, V2 - sobrenadante modificado, con la adición de NaOH 0,1 N (hasta pH 7) para eliminar la acción de ácidos, y V3 - sobrenadante modificado con la adición de la enzima pronasa (1 mg. mL<sup>-1</sup>) para eliminar la acción de las bacteriocinas. Como cepas indicadoras se utilizaron las cepas potencialmente patógenas utilizadas en el experimento anterior.

*Desarrollo de la técnica de difusión en agar.* De los cultivos de las cepas indicadoras se tomaron 200 µL. Se inocularon en tubos con 20 mL de agar nutriente enriquecido (con 1 % de Ión-Agar, OXOID) a 45 °C. Estos se virtieron en placas para su solidificación. En cada placa, que contenía las cepas indicadoras, se abrieron pocillos de 7 mm de diámetro, en los que se depositaron 20 µL de las variantes 1, 2 y 3 del sobrenadante del hidrolizado. Las placas se mantuvieron a 5 °C durante 4 h para lograr mejor difusión de las sustancias en el agar. Luego se incubaron por 24 h a 37 °C hasta encontrar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. El diámetro de los halos se midió con regla milimetrada. A cada valor se le restó el diámetro de los pocillos.

*Determinación de la coagregación de las bacterias potencialmente patógenas a los componentes de pared celular de las levaduras presentes en el hidrolizado.* El por ciento de coagregación se determinó mediante la fórmula de Orłowski y Bielecka (2006).

Por ciento de Coagregación =  $\{[(Ax_i + Ay_i)/2 - At(x + y) / (Ax_i + Ay_i/2)]\} \cdot 100$

Donde:

$Ax_i$ : Absorbancia a las 5 h de la cepa indicadora

$Ay_i$ : Absorbancia a las 5 h del hidrolizado de levaduras

$A_t(x + y)$ : Absorbancia de la mezcla de la cepa indicadora + hidrolizado de levaduras

$Ax_i$ : Absorbancia de la cepa indicadora en el tiempo inicial

time

$Ay_i$ : Absorbency of the yeast hydrolyzed preparation in the initial time

**Statistical processing of data.** Three replications were performed per each experiment and per each simple. The results were analyzed according to a design of simple classification. The system INFOSAT Version 1 (Balzarini *et al.* 2001) was used for data processing. The analysis of variance were performed to verify the differences among means, with a level of significance of  $P < 0.05$ . The test of Duncan (1955) was used to perform multiple comparisons among the means. The counting of viable microorganisms was turned into Log N to guarantee the normality conditions in the growth curve.

### Results and Discussion

Figures 1, 2, 3, 4 and 5 show the results of the development of co-cultures with the enzymatic hydrolyzed preparation and the indicator strains *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* and *E. coli*. There was no growth of the indicator strains in the medium with the dose used in this bio-preparation, while they showed an accelerate growth in the control culture.

It was verified that, as the time went by, the cells of indicator strains lost their viability and, after 12 hours, there were no live cells in the co-cultures of *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* and *E. coli spp.* The co-culture of *Salmonella spp.* showed a total reduction after 16 hours. These results indicate that there are antimicrobial substances in this bio-preparation that limit the growth of the inoculated pathogenic strains.

It is known that hydrolysis of the cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* is achieved using enzymes that produce Bacillus cells. The literature refers to the function of this genus in the production of bactericide and bacteriostatic substances (Milián 2009 and Ayala

$Ay_i$ : Absorbancia del hidrolizado de levaduras en el tiempo inicial

**Procesamiento estadístico de los resultados.** Por cada experimento y por cada muestra, se realizaron tres réplicas. Los resultados se analizaron de acuerdo con diseño de clasificación simple. Para el procesamiento de los datos, se utilizó el sistema INFOSAT Versión 1 (Balzarini *et al.* 2001). Los análisis de varianza se realizaron para verificar diferencias entre medias, con nivel de significación de  $P < 0.05$ . La prueba de Duncan (1955) se utilizó para realizar las comparaciones múltiples entre las medias. Los conteos de microorganismos viables se transformaron a Log N para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento.

### Resultados y Discusión

En las figuras 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran los resultados del desarrollo de cocultivos con el hidrolizado enzimático y las cepas indicadoras *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli*. Con la dosis que se utilizó en este biopreparado, no se produjo el crecimiento de las cepas indicadoras en el medio, mientras que estas en el cultivo control manifestaron crecimiento acelerado.

Se constató que en la medida que pasó el tiempo, las células de las cepas indicadoras perdieron viabilidad y a las 12 horas no se observaron células vivas en los cocultivos de *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *E. coli spp.*, a diferencia de *Salmonella spp.*, la cual manifestó una reducción total a las 16 horas. Estos resultados indican que en este biopreparado están presente sustancias antimicrobianas, que limitan el crecimiento de las cepas patógenas inoculadas.

Se conoce que la hidrólisis de los componentes de la pared celular de la *Saccharomyces cerevisiae* se logra mediante enzimas que producen las células de Bacillus. En la literatura se hace referencia a la función de este género en la producción de sustancias bactericidas y

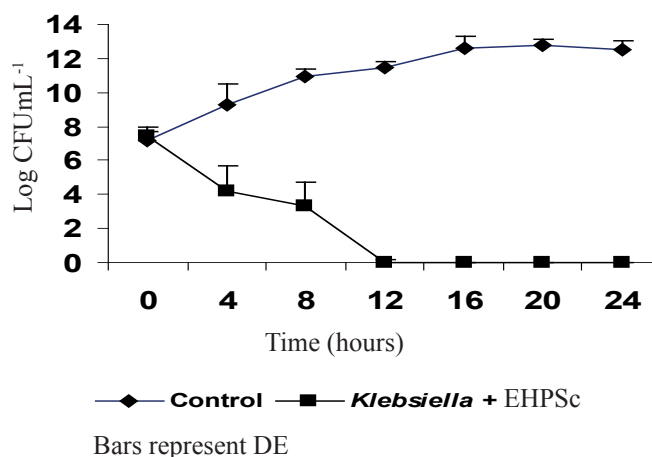


Figure 1. Growth dynamics of *Klebsiella spp.* in the presence of the enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*

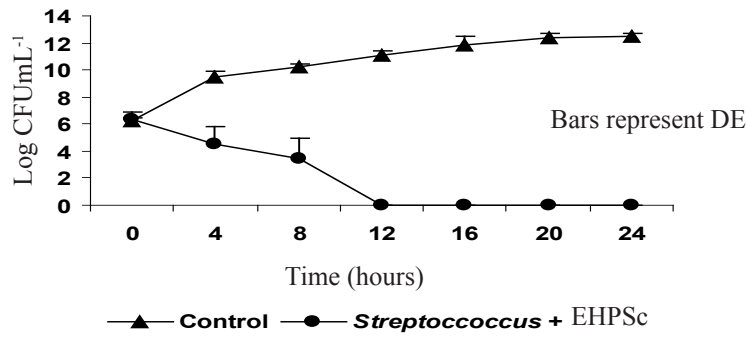


Figure 2. Growth dynamics of *Streptococcus* spp. in the presence of the enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*

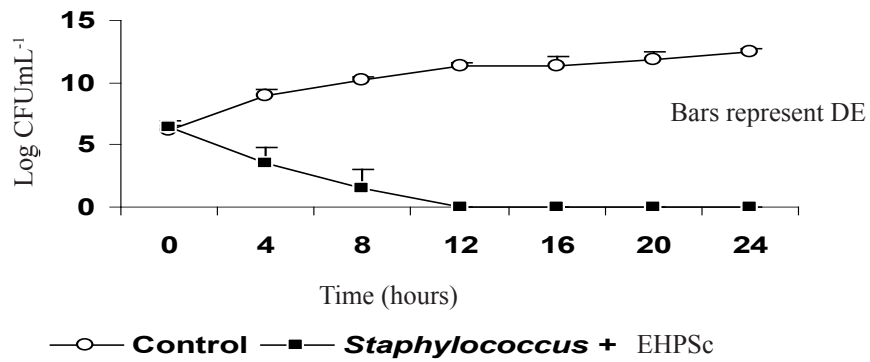


Figure 3. Growth dynamics of *Staphylococcus* spp. in the presence of the enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*

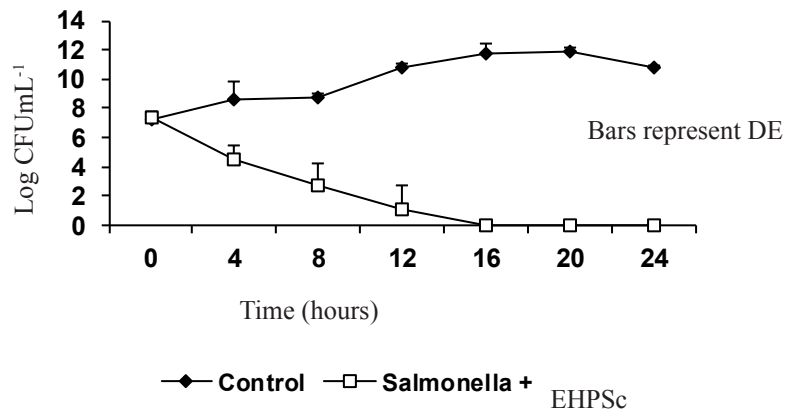


Figure 4. Growth dynamics of *Salmonella* spp. in the presence of the enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*

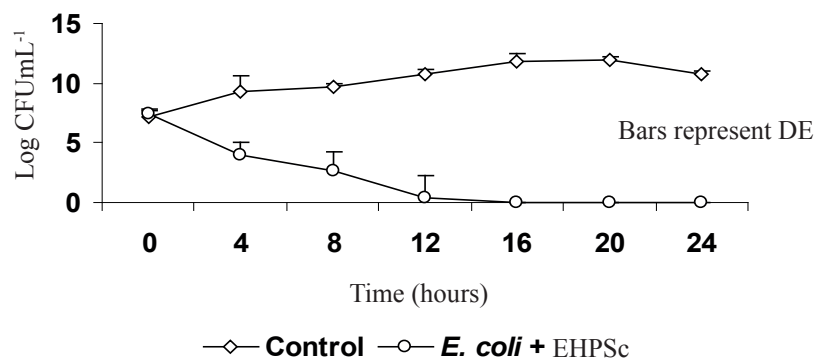


Figure 5. Growth dynamics of *E. coli* spp. in the presence of the enzymatic hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae*

*et al.* 2012).

Similar results have been reported by Svetoch *et al.* (2011), and Bayoda (2013), who demonstrate the antagonistic activity of a hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae* and of *Bacillus subtilis* 21BMC, respectively, in front of different pathogenic microorganism, including the *Candida albicans*, *Proteus*, *E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*.

According to Cho *et al.* (2011), the utilization of bacteria from *Bacillus* genus is a result of their ability to produce endospores. Studies carried out by Leser *et al.* (2008) state that these strains (spores or vegetative cells) exclude pathogenic microorganisms by competitive adhesion or by synthesis of antimicrobial substances.

The presence of *Bacillus* and its endospores in the hydrolyzed preparation of yeast could cause the inhibition of the growth of indicator strains in front of this bio-preparation.

Table 1 shows the results of the determination of the antibacterial substances in the enzymatic hydrolyzed preparation in front of indicator strains.

bacteriostáticas (Milián 2009 y Ayala *et al.* 2012).

Resultados similares han informado Svetoch *et al.* (2011), y Bayoda (2013) demuestran la actividad antagonista de un hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Bacillus subtilis* 21BMC respectivamente ante diferentes microorganismos patógenos, entre los que se incluyen *Candida albicans*, *Proteus*, *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

Según Cho *et al.* (2011), la utilización de bacterias del género *Bacillus* está dada por la capacidad que tienen de producir endosporas. Estudios realizados por Leser *et al.* (2008) alegan que estas cepas (células vegetativas o esporas) excluyen a los microorganismos patógenos por adhesión competitiva o por la síntesis de sustancias antimicrobianas.

La presencia de *Bacillus* y sus endosporas en el hidrolizado de levadura pudiera ser una de las causas por las que estas cepas indicadoras inhiben su crecimiento ante este biopreparado.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la determinación de sustancias antibacterianas en el hidrolizado enzimático ante cepas indicadoras.

Table 1. Antibacterial action of the hydrolyzed preparation of *Saccharomyces cerevisiae* in front of indicator strains

Indicator strains	Inhibition halos produced by the EHPSc (mm)		
	V1	V2	V3
<i>Klebsiella spp.</i>	13.34 <sup>b</sup>	13.85 <sup>b</sup>	NI
<i>Streptococcus spp.</i>	12.66 <sup>a</sup>	12.12 <sup>a</sup>	NI
<i>Staphylococcus spp.</i>	14.30 <sup>c</sup>	14.23 <sup>c</sup>	NI
<i>Salmonella spp.</i>	16.12 <sup>e</sup>	16.15 <sup>e</sup>	NI
<i>Escherichia coli spp.</i>	15.12 <sup>d</sup>	15.14 <sup>d</sup>	NI
SE ± Sig 0.71*			

<sup>a,b,c,d,e</sup>Columns with different letters differ at P<0.05 (Duncan 1955)

V1- Supernatant without modification; V2- Modified supernatant; V3- Modified supernatant with pronase. NI- No inhibition. \*P<0.05

The enzymatic hydrolyzed preparation of yeast caused the formation of inhibition halos in the supernatants of V1 and V2 in front of strains of *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* and *E. coli spp.* These results indicate the presence of bacteriocins and/or antibiotics in this hydrolyzed preparation, because there was an inhibition of the indicator strains with the supernatant of V3 (acid production).

Similar studies, carried out by Vondruskova *et al.* (2010) and Ansari *et al.* (2012), demonstrate that different strains of *Bacillus subtilis* are able of generating substances like bacitracin, polymixin, difficidin, subtilin and mycobacillin, which are antibiotics that inhibit the growth of pathogenic microorganisms from the intestine of animals.

The inhibiting activity of *Bacillus subtilis* was also evaluated by mass spectroscopy (Lim-Teo *et al.* 2005) and it was demonstrated that this bacteria does not have

El hidrolizado enzimático de levadura provocó la formación de halos de inhibición en los sobrenadantes de la V1 y V2 ante las cepas de *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli spp.* Estos resultados indican la presencia de bacteriocinas y/o antibióticos en este hidrolizado, ya que no se produjo la inhibición de las cepas indicadoras con el sobrenadante de la V3 (producción de ácidos).

Estudios similares realizados por Vondruskova *et al.* (2010) y Ansari *et al.* (2012) demuestran que diferentes cepas de *Bacillus subtilis* son capaces de generar sustancias como la bacitracina, polimixina, difficidina, subtilina y mycobacillina, antibióticos que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos del intestino de los animales.

La actividad inhibitoria de *Bacillus subtilis* también se evaluó por espectroscopia de masa (Lim-Teo *et al.* 2005) y se demostró que esta bacteria tiene la capacidad de inhibir a *Clostridium difficile*, *Streptococcus*

the ability to inhibit *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* ATCC-35918, *Campylobacter coli* ATCC-51798 and *Clostridium perfringens* ATCC- 13124, due to the production of bacteriocins.

According to these results, the highest inhibiting activity existed in front of the strain of *Salmonella* ( $P < 0.05$ ), followed by *E. coli*. In young animals, 70 % of the infections due to enterobacteria show the presence of these agents as the most commonly isolated microorganisms (Pérez *et al.* 2011 and Tellez *et al.* 2012).

According to the literature (Gusils *et al.* 2008 and Fernando 2008), Gram-negative bacteria, like *E. coli* and *Salmonella*, use fimbriae to adhere to the target cells of the intestine of animals. These proteins (adhesins), within the fimbriae of pathogenic microorganisms, fix themselves to the receptors of cell walls of yeasts, and are capable of dragging pathogenic bacteria, due to their ability of bonding these microbes to their cell walls or joining by the receptive areas of the pathogens, which are connected to the intestinal mucus (Pérez-Sotelo *et al.* 2005 and Moslehi-Jenabian *et al.* 2010).

During the last years, the use of probiotics in prophylaxis and therapy of gastrointestinal diseases has been a subject of great interest and scientific discussion. Nowadays, the importance and possible efficiency of biotic therapy (probiotics and prebiotics) has been recognized as a medical tool for treating digestive diseases (Carro *et al.* 2014).

Table 2 shows the percent of co-aggregation reached by the cells of *Salmonella spp.* and *E. coli spp.* to the components of the cell wall of yeasts within the enzymatic hydrolyzed preparation of *S. cerevisiae*.

According to Suman Saran *et al.* (2012), the self-aggregation in bacteria can be defined as the phenomenon of aggregation among cells of the same strain, while the co-aggregation means the aggregation occurring between different species. The capacity of aggregation is related to the adhesion, which is a characteristic of *E. coli* and *Salmonella spp.*

As table 2 shows, the percentages of co-aggregation reported in this study could be related to the significant presence of cell wall fractions of yeasts within the enzymatic hydrolyzed preparation. Regarding this

*pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* ATCC-35918, *Campylobacter coli* ATCC-51798 y *Clostridium perfringens* ATCC- 13124, debido a la producción de bacteriocinas.

Según estos resultados, la mayor actividad inhibitoria estuvo ante la cepa de *Salmonella* ( $P < 0.05$ ), seguida por *E. coli*. Se conoce que en animales jóvenes, 70 % de las infecciones por enterobacterias destacan la presencia de estos agentes como los microorganismos más comúnmente aislados (Pérez *et al.* 2011 y Tellez *et al.* 2012).

Según informa la literatura (Gusils *et al.* 2008 y Fernando 2008), las bacterias Gram-negativas, como *E. coli* y *Salmonella*, utilizan fimbrias para adherirse a las células dianas del intestino de los animales. Estas proteínas (adhesinas), presentes en las fimbrias de los microorganismos patógenos, se fijan a los receptores de las paredes celulares de las levaduras, y son capaces de arrastrar a las bacterias patógenas, por la habilidad que tienen para ligar estos microbios a sus paredes celulares o para unirse por los sitios receptores de los patógenos que se conectan a la mucosa intestinal (Pérez-Sotelo *et al.* 2005 y Moslehi-Jenabian *et al.* 2010).

En los últimos años, el uso de probióticos en la profilaxis y terapia de enfermedades gastrointestinales ha sido objeto de gran interés y controversia científica. Hoy en día, se reconoce la importancia y posible eficacia de la terapia biótica (probióticos y prebióticos) como herramienta médica para el tratamiento de enfermedades digestivas (Carro *et al.* 2014).

En la tabla 2 se muestra el por ciento de coagregación que alcanzaron las células de *Salmonella spp.* y *E. coli spp.* a los componentes de pared celular de las levaduras presentes en el hidrolizado enzimático de *S. cerevisiae*.

Según Suman Saran *et al.* (2012), la autoagregación en las bacterias se puede definir como el fenómeno de la agregación entre células de la misma cepa, mientras que la coagregación obedece a la agregación que ocurre entre diferentes especies. La capacidad de agregación está relacionada con la adhesión, propiedad que posee *E. coli* y *Salmonella spp.*

Como muestra la tabla 2, los por cientos de coagregación informados en este trabajo pudieran estar relacionados con la presencia significativa de fracciones de pared celular de las levaduras presentes en el hidrolizado enzimático. Al respecto, Sánchez-Hernández

Table 2. Co-aggregation of *Salmonella spp.* and *E. coli* to the components of the cell wall of yeasts within the enzymatic hydrolyzed of yeast.

Indicator strains	Co-aggregation (%)		
	Yeast hydrolyzed preparation	CV (%)	SD
<i>Salmonella spp.</i>	32.7	5.33	1.64
<i>E. coli spp.</i>	22.3	9.43	2.11

CV: coefficient of variation

SD- standard deviation

fact, Sánchez-Hernández *et al.* (2012) stated that when pathogens add to the cell wall of yeasts, a protective effect is induced, and this *S. cerevisiae*-pathogen complex is rapidly removed from the digestive tract

Scientific studies demonstrate that mannane oligosaccharides (MOS) are efficient for the agglutination of pathogens like Salmonella and *E. coli*, regulate the colonization of pathogens and generate the reestablishment of the beneficial flora, improving the intestinal health of animals (Celyk *et al.* 2003 and Khati *et al.* 2007). The adhesion property of MOS is demonstrated in this experiment and reveals the probiotic potential of this additive in antimicrobial activity.

For several years, multidisciplinary groups have worked on the introduction of these bio-preparations in animal production, due to their effect on yield and health of animals, and to the use of an economically viable technology for Cuban conditions (Pérez *et al.* 2006).

The results achieved in this study demonstrate the antibacterial potential of the enzymatic hydrolyzed preparation of yeast in front of the evaluated pathogenic microorganisms. The inhibiting activity, due to the production of bacteriocins and/or antibiotics and to the co-aggregation with pathogens, indicates the limited growth of bacterial strains in the presence of this bio-preparation. This activity is multifactorial and unleashes different processes that are interrelated and provoke, as a consequence, the improvements of physiology, yield and health of animals. Therefore, it can be used as an additive for animal feeding.

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 49, Number 3, 2015  
*et al.* (2012) plantearon que cuando los patógenos se unen a la pared celular de la levadura se induce un efecto protector y este complejo *S. cerevisiae*-patógeno se elimina rápidamente del tracto digestivo.

Estudios científicos comprueban que los oligosacáridos mananos (MOS) son eficientes en la aglutinación de patógenos como Salmonella y *E. coli*, modulan la colonización de patógenos y generan el restablecimiento de la flora benéfica, mejorando de esa forma la sanidad intestinal de los animales (Celyk *et al.* 2003 y Khati *et al.* 2007). La propiedad de adherencia que poseen los MOS se corrobora con este experimento y revela el potencial probiótico de este aditivo en la actividad antimicrobiana.

Desde hace varios años, grupos multidisciplinares trabajan en la introducción de estos biopreparados en la producción animal, no solo por los efectos que causan en el rendimiento y la salud de los animales, sino por la utilización de una tecnología económicamente viable para las condiciones cubanas (Pérez *et al.* 2006).

A partir de los resultados alcanzados en este trabajo, se comprueba el potencial antibacteriano que posee el hidrolizado enzimático de levadura ante los microorganismos patógenos evaluados. La actividad inhibitoria, debido a la producción de bacteriocinas y/o antibióticos y a la coagregación con patógenos, indica el crecimiento limitado de las cepas bacterianas en presencia de este biopreparado. Esta actividad es multifactorial y desencadena diferentes procesos que se interrelacionan y provocan, como consecuencia, mejora en la fisiología, rendimiento y salud de los animales. Por ello, se puede inferir su utilización como aditivo en la alimentación animal.

## References

- Ansari, A., Aman, A., Siddiqui, NN., Iqbal, S., Ali, U. & Qader, S. 2012. Bacteriocin (BACIB17): screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. The Karachi Institute of Biotechnology & Genetic. 25:195
- Ayala, L., Bocourt, R., Milián, G., Castro, M., Herrera, M. & Guzmán, J. 2012. Assessment of a probiotic based on *Bacillus subtilis* and its endospores in the obtainment of healthy lungs of pigs. Cuban J. Agric. Sci. 46:391
- Balzarini, M. G., Casanoves, F., Di Rienzo, J., Laura A González. & Robledo, C.W. 2001. Infostat Statistical Software. Version 1. Cordova, Argentina
- Bayoda, B. 2013. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de una cepa de *Bacillus subtilis* con potencial probiótico. Engineering Thesis. Universidad de Matanzas, Cuba
- Carro, M.D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A. & Ranilla, M. J. 2014. Perspectivas y retos de los extractos vegetales como aditivos alimentarios en rumiantes. Albèitar 179. p. 4-6. Grupo Asís Biomedica, S.L.
- Celyk, K., Denly, M. & Savas, T. 2003. Reduction of toxic effects of Aflatoxin B1 by using Baker yeast (*S. cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. Rev. Bras. Zootec. 32:615
- Cho, J.H., Zhao, P.Y. & Kim, I.H. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs. J. Animal and Veterinary Advances.10: 2127
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F test. Biometrics 11:1
- Fernando, N. 2008. Utilización de oligosacáridos mananos como promotor de crecimiento en cría y levante de pollitas de reposición Lohman Brown y su efecto hasta el pico de producción. Engineering Thesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador
- Fleet, G.H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Curr. Opin. Biotechnol. 18:170
- Gusils, C., Oppezzo, O., Pizarro, R. & Gonzalez, S. 2008. Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. Can. J. Microbiol. 49:472
- Jacques, N. & Casaregola, S. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. Int. J. Food Microbiol. 126:321
- Khati, B., Kolte, B., Shendare, R., Palve, H., Mandlekar, S. & Shisodiya, J. 2007. Effect of low protein level supplemented with or without yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on haematological and immunological profile of broiler quails. Royal



- Veterinary J. of India 3:131
- Leser, T. D., Knarreborg, A. & Worm, J. 2008. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. J. Appl. Microbiol. 104: 1025
- Lim, Teo., Yeow, A. & Tan, M. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. Appl. Environmental Microbiol. 71:4185
- Lourenço, M., Hayashi, R. M., Pickler, L., Miglino, L.B., Kuritza, L. & Santin, E. 2011. Expresión de células caliciformes y linfocitos t cd3 en la mucosa intestinal de pollos de engorde suplementados con oligosacáridos mananos. XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Laboratorio de Microbiología y Ornitopatología, Curitiba, Brasil. Universidad Federal de Paraná
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba
- Milián, G., Rondón, A.J., Pérez, M., Samaniego, L.M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, M.J., Carro, M.D., Rodríguez, M. & Laurencio, M. 2014. Isolation and identification of strains of *Bacillus* spp. in different ecosystems, with probiotic purposes, and their use in animals. Cuban J. Agric. Sci. 48: 347
- Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard, L. & Jespersen, L. 2010. Review: beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. Nutrients 2:449
- Orłowski, A. & Bielecka, M. 2006. Preliminary characteristics of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as probiotic candidates. Pol. J. Food Nutr. Sci. 15:269
- Pérez, M., Laurencio, M., Rondón, A. J., Milián, G., Arteaga, F., Rodríguez, M., Borges, Y. 2012. Evaluación de una mezcla probiótica en la alimentación de gallinas ponedoras en una unidad de producción comercial. Rev. Pastos y Forrajes. 35:311
- Pérez, M., Laurencio, M., Rondón, A. J., Milián, G., Bocourt, R. & Arteaga, F. 2011. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. Rev. Salud Anim. 33:147
- Pérez, M.Q., Milián, G., Piad, R. B., González, R.C., Bocourt, R. S. & Savón, V. 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 concebida. No.23179. (Int.cl.8) A 23 J 1/00, 3/30, C 12N 9/56. Volume: 001, Folio: 01
- Pérez-Sotelo, L.S., Talavera, R.M., Monroy, H.G., Bernabé, S.L., Cuarón, J.A., Ibarguengoytia, R., Montes de Oca, J. & Vázquez, J. C. 2005. *In vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. Revista Latinoamericana de Microbiología. 47:70
- Rodríguez, M. 2010. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Master Thesis. Instituto de Ciencia Animal. Cuba
- Sánchez-Hernández, J.A. Mayta-Baldivieso, M.J., & Rivera-Tapia, J.A. 2012. Alteraciones del pH vaginal asociado a lactobacilos o bacilo de Doderlein. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina 59:56
- Schillinger, U. & Lucke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. Appl. Environm. Microbiol. 55:1901
- Suman Saran, M.S., Bisht, K., Singh, U.V. & Teotia, S. 2012. Comparing Adhesion Attributes of two Isolates of *Lactobacillus acidophilus* for Assessment of prebiotics Honey and Inulin. International J. Sci. Research Publications 2:4
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Levchuk, V.P., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V. Mitsevich, I.P., Stepanshin, J., Dyatlov, I., Seal, B.S. & Stern, N.J. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and Characterization of Its Bacteriocin, Including the Antimicrobial Activity Spectrum. Appl. Environ Microbiol. 77: 2749
- Tellez, G., Pixley, B. E., Wolfenden, S., Layton, L. & Hargis, B. M. 2012. Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry G Probiotics/direct fed microbials for Salmonella control in poultry. Food Research International 45: 628
- Van Staden, A.D. & Dicks, L.M. 2012. Applications, antibiotic release and alternatives to antibiotics. J Appl. Biomater Funct Mater. 10:2
- Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z & Pavlik, I. 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. Veterinarni Medicina. 55:199

Received: February 12, 2015