

Selection of a culture medium for the growth of *Pichia guilliermondii* LEVICA- 27 as activator additive of ruminal fermentation

Selección de un medio de cultivo para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* LEVICA- 27 como aditivo activador de la fermentación ruminal

Bexy González Mora^{1,2}, Dailyn Sosa Cossio¹, Yoandra Marrero Rodríguez¹,
Yaneisy García Hernández¹ and Nereyda Albelo Dorta¹

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba

²Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Perif. Francisco. R. Almada km 1, Zootecnia, Chihuahua, CP 33820. Chihuahua, México

Email: bexyglez94@gmail.com, bexy@ica.co.cu

Bexy González Mora: <http://orcid.org/0000-0001-6408-2859>

Dailyn Sosa Cossio: <http://orcid.org/0000-0003-3933-1176>

Yoandra Marrero Rodríguez: <http://orcid.org/0000-0001-6213-5857>

Yaneisy García Hernández: <http://orcid.org/0000-0002-7055-4880>

Nereyda Albelo Dorta: <http://orcid.org/0000-0003-4827-3991>

In order to select a non-conventional culture medium for the growth of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 as an activator additive for ruminal fermentation, two trials were carried out in which YPG medium was used (yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L and glucose 20 g/L) as control medium. In the first, seven culture media were evaluated for yeast growth at 24 hours of fermentation. While in the second, growth kinetics was performed in the selected medium of the first test. In addition, in the latter, the maximum specific growth rate, the biomass doubling time, and the stoichiometric balance of the selected medium were determined. At 24 hours of fermentation, there were not differences between the media studied and the YPG medium ($p=0.073$). Therefore, the latter can be replaced without affecting the strain growth in 24 h. In the kinetic study, there was a higher microbial concentration at 12 h ($P<0.0001$) in the medium containing molasses and urea. The maximum specific growth rate was lower ($P=0.0260$) and the biomass doubling time was higher ($P=0.0283$) with respect to the control. The selected medium constitutes an adequate option for the production of LEVICA-27, since it allows obtaining good cell concentration, covering the nutritional requirements and includes fewer components in its preparation. This offers economic and operational advantages for obtaining the additive at production scales.

Key words: *molasses, yeast, fermentation, biomass.*

The use of yeast additives in ruminant feeding constitutes an alternative to increase milk and meat production in the world (Elghandour *et al.* 2020 and Suntara *et al.* 2021). To obtain these additives through fermentation processes, it is important to select a culture medium that is economically feasible and covers the nutritional requirements of the yeast strain used.

It is estimated that approximately 30 % of the total cost of fermentation is the cost of the culture medium (Bharti *et al.* 2018). The most used commercial

Para seleccionar un medio de cultivo no convencional para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 como aditivo activador de la fermentación ruminal, se realizaron dos ensayos en los que se utilizó caldo YPG (extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L y glucosa 20 g/L) como medio control. En el primero, se evaluaron siete medios de cultivo para el crecimiento de la levadura a las 24 horas de fermentación. Mientras que en el segundo, se realizó la cinética de crecimiento en el medio seleccionado del primer ensayo. Además, en este último se determinó la velocidad específica máxima de crecimiento, el tiempo de duplicación de la biomasa y se realizó el balance estequiométrico del medio seleccionado. A las 24 horas de fermentación, no se encontraron diferencias entre los medios estudiados y el caldo YPG ($p=0.073$). Por tanto, este último se puede sustituir sin que se afecte el crecimiento de la cepa en 24 h. En el estudio de la cinética, se presentó mayor concentración microbiana a las 12 h ($P<0.0001$) en el medio que contenía melaza y urea. La velocidad específica máxima de crecimiento fue inferior ($P=0.0260$) y el tiempo de duplicación de la biomasa fue superior ($P=0.0283$) con respecto al control. El medio seleccionado constituye una opción adecuada para la producción de LEVICA-27, pues permite obtener buena concentración celular, cubrir los requerimientos nutricionales e incluye menos componentes en su preparación. Esto ofrece ventajas económicas y operacionales para la obtención del aditivo a escalas productivas.

Palabras clave: *melaza, levadura, fermentación, biomasa.*

La utilización de aditivos con levaduras en la alimentación de rumiantes constituye una alternativa para incrementar la producción de leche y carne en el mundo (Elghandour *et al.* 2020 y Suntara *et al.* 2021). Para la obtención de estos aditivos mediante procesos fermentativos es importante seleccionar un medio de cultivo que sea económicamente factible y cubra los requerimientos nutricionales de la cepa de levadura que se utilice.

Se estima que, aproximadamente, 30 % del costo total de la fermentación lo constituye el costo del medio de cultivo (Bharti *et al.* 2018). Los medios comerciales

media for yeast growth in laboratory studies are malt extract and YPG medium (yeast extract, peptone and glucose). However, the high prices they have in the market prevent their use at productive scales. For this reason, it is necessary to allocate efforts in the search for economic sources of nutrients for large-scale yeast production.

The use of agro-industrial by-products as substrates for microbial growth are widely studied because it provides carbon and nitrogen sources that is less expensive. In addition, it allows the use of wastes that should be treated before its disposal, and thus add value to the latter. Among the most used agro-industrial by-products are sugar cane molasses (Álvarez-Cao *et al.* 2019 and Bento *et al.* 2020) and whey (Cortez *et al.* 2019 and Santiesteban-Lopez *et al.* 2020). However, the results with the use of these unconventional media vary depending on the yeast strain used (Marrero *et al.* 2016 and Marrero *et al.* 2020a). For the above reasons, it is necessary to find the right components in the culture medium, so that they guarantee the highest possible growth.

The Instituto de Ciencia Animal (ICA) of the Republic of Cuba has a collection of yeasts isolated from the ruminal ecosystem of cows that previously intake a fermented product, rich in yeast (Sosa *et al.* 2018). Among them is *Pichia guilliermondii* LEVICA-27, which in previous studies showed potential to stimulate ruminal fermentation in animals that intake fibrous diets (Marrero *et al.* 2020a and Marrero *et al.* 2020b). The results justify the search for an adequate and economically feasible culture medium to obtain an additive with *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 on an industrial scale and its subsequent introduction into livestock systems. Hence, the objective of this research was to select a non-conventional culture medium for the growth of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 strain.

Materials and Methods

The studies were carried out in Laboratorio de Producción de Alimentos de la Unidad Central de Laboratorios (UCELAB) belonging to Instituto de Ciencia Animal (ICA), located at Carretera Central km 47½, in San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Design and experimental treatments. Two tests were carried out to evaluate the growth of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 in culture media, from cheap substrates. In the first, a completely random design was used to compare the yeast growth in each medium to be evaluated (M2, M3, M4, M5, M6 and M7) with respect to the control medium YPG (yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L and glucose 20 g/L). Previously, the effect of different components that are usually reported for yeast growth was consulted. The M2 medium was proposed by Sánchez *et al.* (2007) for

más utilizados para el crecimiento de levaduras en estudios de laboratorio son extracto de malta y caldo YPG (extracto de levadura, peptona y glucosa). Sin embargo, los altos precios que tienen en el mercado impiden su utilización a escalas productivas. Por esta razón, es necesario destinar esfuerzos en la búsqueda de fuentes económicas de nutrientes para la producción de levaduras a grandes escalas.

El uso de subproductos agroindustriales, como sustratos para el crecimiento microbiano se estudia ampliamente porque suministra fuentes de carbono y nitrógeno que resultan menos costosas. Además, permite la utilización de residuos que se deberían tratar antes de su eliminación, y así agregar valor a estos últimos. Entre los subproductos agroindustriales más empleados se encuentran la melaza de caña de azúcar (Álvarez-Cao *et al.* 2019 y Bento *et al.* 2020) y el suero de leche (Cortez *et al.* 2019 y Santiesteban-Lopez *et al.* 2020). Sin embargo, los resultados con el empleo de estos medios no convencionales varían según la cepa de levadura que se utilice (Marrero *et al.* 2016 y Marrero *et al.* 2020a). Por las razones anteriores, es necesario encontrar los componentes adecuados en el medio de cultivo, de modo que garanticen el mayor crecimiento posible.

El Instituto de Ciencia Animal (ICA) de la República de Cuba cuenta con una colección de levaduras aisladas del ecosistema ruminal de vacas que consumieron previamente un producto fermentado, rico en levadura (Sosa *et al.* 2018). Entre ellas se encuentra *Pichia guilliermondii* LEVICA-27, que demostró en estudios anteriores potencialidades para estimular la fermentación ruminal en animales que consumen dietas fibrosas (Marrero *et al.* 2020ab). Los resultados justifican la búsqueda de un medio de cultivo adecuado y económicamente factible para la obtención de un aditivo con *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 a escalas industriales y su posterior introducción en los sistemas ganaderos. De ahí que, el objetivo de esta investigación fue seleccionar un medio de cultivo no convencional para el crecimiento de la cepa *Pichia guilliermondii* LEVICA-27.

Materiales y Métodos

Los estudios se realizaron en el Laboratorio de Producción de Alimentos de la Unidad Central de Laboratorios (UCELAB) perteneciente al Instituto de Ciencia Animal (ICA), ubicado en Carretera Central km 47½, en San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Diseño y tratamientos experimentales. Se realizaron dos ensayos para evaluar el crecimiento de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 en medios de cultivo, a partir de sustratos económicos. En el primero se utilizó un diseño completamente aleatorizado para comparar el crecimiento de la levadura en cada medio a evaluar (M2, M3, M4, M5, M6 y M7) con respecto al medio control YPG (extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L y glucosa 20 g/L). Previamente, se consultó el efecto de diferentes componentes que usualmente se informan para

a strain of *Pichia guilliermondii*, destined for animal feeding. Then, modifications were made to this culture medium that consisted of the incorporation of some mineral sources. Table 1 shows the composition of the seven culture media evaluated in the first test.

el crecimiento de levaduras. El medio M2 fue propuesto por Sánchez *et al.* (2007) para una cepa de *Pichia guilliermondii*, destinada a la alimentación animal. Luego, a este medio de cultivo se le realizaron modificaciones que consistieron en la incorporación de algunas fuentes

Table 1. Composition of the culture media (M1, M2, M3, M4, M5, M6 and M7), evaluated for the growth of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27

Nutrient concentration (g/L)	(Control)						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Sugar cane molasses	-	20	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Yeast extract	10.00	-	-	-	-	-	-
Peptone	10.00	-	-	-	-	-	-
Glucose	20.00	-	-	-	-	-	-
Urea	-	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
KH ₂ PO ₄	-	-	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
MgSO ₄	-	-	1.50	1.50	1.50	1.50	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	0.15	0.15	0.15	-	-
CuSO ₄	-	-	0.10	0.10	-	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	0.06	-	-	-	-

Once the most suitable culture medium was selected from the technical and economic point of view for the culture of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27, the second test was carried out. In this, a completely random design with a 2x10 factorial arrangement was used, in which the yeast growth in the previously selected medium was monitored. The factors were the culture medium and time (0, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 h). The YPG medium was used as control medium and three repetitions were performed at each sampling time for the two culture media studied.

Experimental procedure. The strain *Pichia guilliermondii* LEVICA-27, belonging to Banco de Microorganismos para la Producción Animal (BAMIPA) from the Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba), was used. The strain was activated by means of two subcultures in YPG medium at 110 r.p.m, 30 °C and 24 h of incubation. From the active culture, the inoculum was obtained under the same conditions. It was inoculated at 10 % (v/v) in erlenmeyer flasks with a capacity of 100 mL, with 45 mL of the culture media corresponding to the experimental treatments. The initial concentration of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 in all the studied media was 10⁶ cfu/mL. The flasks were incubated in an orbital shaker at 30 °C and 110 r.p.m. In the first test, sampling was done at 24 h. At this time, the flasks were shaken and 1 mL of the homogeneous sample was taken. All samples were serially diluted with saline (0.85 %, w/v) as a diluent and seeded in Petri dishes with Sabouraud agar (Biolife, Italy) to determine, by visual counting, the colony-forming units per milliliter (cfu/mL). In the second test, the

minerales. La tabla 1 muestra la composición de los siete medios de cultivo evaluados en el primer ensayo.

Una vez que se seleccionó el medio de cultivo más adecuado desde el punto de vista técnico y económico para el cultivo de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27, se realizó el segundo ensayo. En este se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 x 10, en el que se monitoreó el crecimiento de la levadura en el medio seleccionado anteriormente. Los factores fueron el medio de cultivo y el tiempo (0, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 h). Se utilizó caldo YPG como medio control y se realizaron tres repeticiones en cada horario de muestreo para los dos medios de cultivo estudiados.

Procedimiento experimental. Se utilizó la cepa *Pichia guilliermondii* LEVICA-27, perteneciente al Banco de Microorganismos para la Producción Animal (BAMIPA) del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). Se activó la cepa mediante dos subcultivos en caldo YPG a 110 r.p.m., 30 °C y 24 h de incubación. A partir del cultivo activo, se obtuvo el inóculo en iguales condiciones. Se inoculó al 10 % (v/v) en erlenmeyers de 100 mL de capacidad, con 45 mL de los medios de cultivo correspondientes a los tratamientos experimentales. La concentración inicial de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 en todos los medios estudiados fue de 10⁶ ufc/mL. Los frascos se incubaron en zaranda orbital a 30 °C y 110 r.p.m. En el primer ensayo, la toma de muestras se realizó a las 24 h. En este horario, se agitaron los frascos y se tomó 1 mL de la muestra homogénea. A todas las muestras se le realizaron diluciones seriadas con solución salina (0.85 %, p/v) como diluyente y se sembraron en placas Petri con agar Sabouraud (Biolife, Italia) para determinar, por conteo visual, las unidades formadoras de colonia por mililitro

same procedure as in the previous one was used to determine the cfu/mL at each sampling time. From this last indicator, the maximum specific growth rate (μ) of the strain was determined by linear regression of the \ln (cfu/mL) in the exponential phase. In addition, the biomass doubling time (dt) was calculated, according to equation 1.

$$d_t = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1)$$

The stoichiometric balance of the medium selected in the first study was performed. The necessary amount of carbon source in the culture medium was determined by the biomass/substrate yield ($Y_{X/S}$), represented in equation 2. While, the rest of the components were determined by mass balance (equation 3), assuming that all the added mass of each element is transformed into a cellular component. The average elemental composition of a microorganism ($CH_{1.79}O_{0.50}N_{0.20}$) reported by Doran (2013) was used, with a standard deviation of 3 %. The microbial concentration in g/L was determined from a model fitted by linear regression that relates the dry weight of the biomass of LEVICA-27 with the cfu/mL.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (2)$$

Where:

X_0 and X_f are the initial and final concentrations of biomass (g/L) and S_0 and S_f are the initial and final concentrations of substrate, respectively, g/L

$$m_i^0 = w_i \cdot m_x \quad (3)$$

Where:

m_i^0 is the initial mass of element i in the culture medium (g/L), w_i is the mass fraction of element i in the cell and m_x is the cell mass, g/L.

Statistical analysis. The data was processed with the statistical program Infostat (Di Rienzo *et al.* 2017). In the first test, means were compared using orthogonal contrast (M1 vs. M2, M3, M4, M5, M6 and M7) by Scheffé's test (Montgomery 2004). In the second, the comparison of means between treatments was performed using Duncan (1955) test.

Results and Discussion

Figure 1 shows the cell concentrations (log cfu/mL) of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 at 24 h of fermentation in the culture media evaluated. There were no differences between the studied media, when each one is compared with the control (M1). It was verified that with the culture media from unconventional sources concentrations of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 were obtained similar to those of the conventional medium used as control. Hence, the latter can be replaced by the others, without affecting the strain growth.

It is important to highlight that the M2 medium,

(ufc/mL). En el segundo ensayo, se procedió igual que en el anterior para la determinación de las ufc/mL en cada horario de muestreo. A partir de este último indicador, se determinó por regresión lineal del \ln (ufc/mL) en la fase exponencial, la velocidad específica máxima de crecimiento (μ) de la cepa. Además, se calculó el tiempo de duplicación de la biomasa (td), según la ecuación 1.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1)$$

Se realizó el balance estequiométrico del medio que se seleccionó en el primer estudio. La cantidad necesaria de fuente de carbono en el medio de cultivo se determinó mediante el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$), representado en la ecuación 2. Mientras, en el resto de los componentes se determinaron por balance de masa (ecuación 3), al suponer que toda la masa que se añade de cada elemento se transforma en componente celular. Se utilizó la composición elemental promedio de un microorganismo ($CH_{1.79}O_{0.50}N_{0.20}$) que informó Doran (2013), con una desviación estándar del 3 %. La concentración microbiana en g/L se determinó a partir de un modelo ajustado por regresión lineal que relaciona el peso seco de la biomasa de LEVICA-27 con las ufc/mL.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (2)$$

X_0 y X_f son las concentraciones inicial y final de biomasa (g/L) y S_0 y S_f las concentraciones inicial y final de sustrato respectivamente, g/L

$$m_i^0 = w_i \cdot m_x \quad (3)$$

Donde:

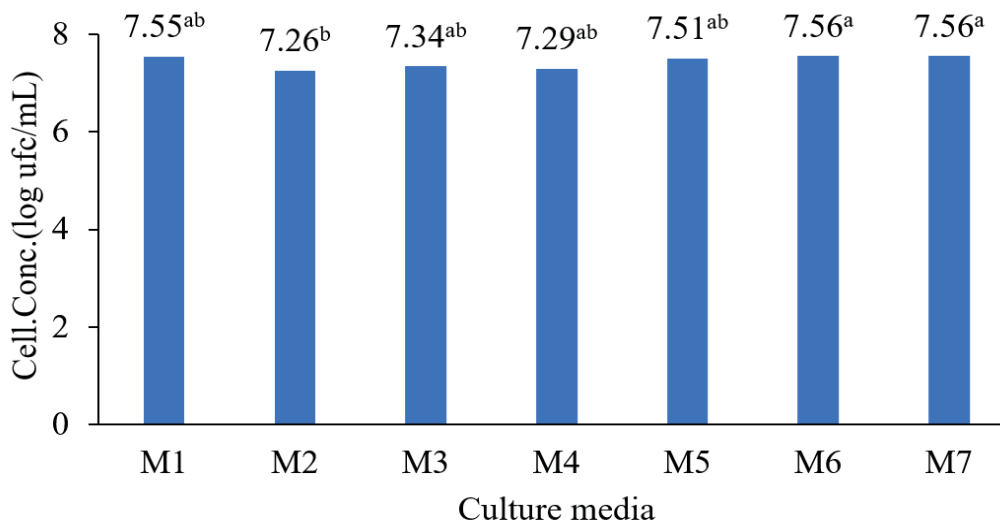
m_i^0 es la masa inicial del elemento i en el medio de cultivo (g/L), la w_i es la fracción másica del elemento i en la célula y m_x es la masa celular, g/L.

Análisis estadístico. Los datos se procesaron con el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2017). En el primer ensayo, las medias se compararon mediante contraste ortogonal (M1 vs. M2, M3, M4, M5, M6 y M7) por la prueba de Scheffé (Montgomery 2004). En el segundo, la comparación de medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Duncan (1955).

Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestran las concentraciones celulares (log ufc/mL) de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 a las 24 h de fermentación en los medios de cultivo evaluados. No se encontraron diferencias entre los medios estudiados, cuando se comparan cada uno con el control (M1). Se pudo comprobar que con los medios de cultivo a partir de fuentes no convencionales se obtuvieron concentraciones de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 similares a las del medio convencional usado como control. De ahí que, este último se puede sustituir por los demás, sin afectar el crecimiento de la cepa.

Es importante destacar que el medio M2, además de permitir el crecimiento de LEVICA-27, en



^{a, b} Different letters differ at $P < 0.05$, $SE \pm 0.06$, $P = 0.073$

Figure 1. Concentration of *P. guilliermondii* LEVICA-27 in media M1 (control), M2, M3, M4, M5, M6 and M7 cultured at 30 °C and 110 r.p.m, at 24 h

in addition to allowing the growth of LEVICA-27, in concentrations similar to the control, has the least amount of components. Its simplicity allows it to be the most suitable from a technical-economic point of view. This advantage facilitates the production of yeast at higher scales, in which the use of conventional media or with a large number of components is not feasible. Given the absence of statistical difference in the evaluated media with respect to the conventional medium used as control, the M2 medium was selected to be used in the growth of LEVICA-27. The reasons for its choice are related to its simplicity, in terms of components and low cost, since it only contains molasses and urea, which are economical sources of nutrients for yeast growth.

Most of the studies consulted in the scientific literature used a strain of *Pichia guilliermondii* for purposes different than animal feeding. In this study, different culture media were evaluated for the growth of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27. Roepcke *et al.* (2011) and Wang *et al.* (2012) used culture media for the growth of *Pichia guilliermondii*, similar to M3, M4, M5 and M6, and found high concentrations of cell biomass (10 g/L). According to these results, it was expected to obtain a higher concentration of biomass in the media M3, M4, M5 and M6. However, there were no differences between the growth obtained with the control medium (M1) and the rest of the evaluated media, despite that they contained mineral sources that can stimulate cell growth. This unexpected result could be related to other variables of the fermentation process, such as the concentration of dissolved oxygen in the culture medium, the speed of agitation, temperature and pH. It is important to study in future researches these variables that also influence on yeast growth.

Molasses is a carbon source par excellence for the

concentraciones similares al control, tiene la menor cantidad de componentes. Su simplicidad le permite ser el más adecuado desde el punto de vista técnico-económico. Esta ventaja facilita la producción de la levadura a escalas superiores, en las que no sea factible la utilización de medios convencionales o con gran número de componentes. Ante la ausencia de diferencia estadística de los medios evaluados con respecto al medio convencional utilizado como control, se seleccionó el medio M2 para ser utilizado en el crecimiento de LEVICA-27. Las razones de su elección están relacionadas con su simplicidad, en cuanto a componentes y bajo costo, pues solo contiene melaza y urea, que son fuentes económicas de nutrientes para el crecimiento de levaduras.

La mayoría de los estudios consultados en la literatura científica utilizaron una cepa de *Pichia guilliermondii* con fines diferentes a la alimentación animal. En este estudio, se evaluaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27. Roepcke *et al.* (2011) y Wang *et al.* (2012) emplearon medios de cultivo para el crecimiento de *Pichia guilliermondii*, similares a M3, M4, M5 y M6, y encontraron concentraciones elevadas de biomasa celular (10 g/L). De acuerdo con estos resultados, se esperaba obtener mayor concentración de biomasa en los medios M3, M4, M5 y M6. Sin embargo, no hubo diferencias entre el crecimiento obtenido con el medio control (M1) y el resto de los medios evaluados, a pesar de que contenían fuentes minerales que pueden estimular el crecimiento celular. Este resultado inesperado se pudiera relacionar con otras variables del proceso de fermentación, como la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, la velocidad de agitación, la temperatura y el pH. Es importante estudiar en investigaciones futuras estas variables que también influyen en el crecimiento de la levadura.

La melaza constituye una fuente de carbono por

growth of microorganisms. In addition, it has minerals such as calcium, magnesium, iron, potassium, zinc and other growth factors (niacin, riboflavin, pantothenic acid) in its composition, which also favor cell growth, and could be the reason why LEVICA-27 it did not require other sources of minerals. Do *et al.* (2019) recognize that yeasts need vitamins and minerals for their development. However, they pointed out that the requirements can vary from one strain to another, so that there is no homogeneous behavior, in terms of the requirements of minerals or growth factors in yeasts. In the case of LEVICA-27, the sugar cane molasses, in addition to satisfying the carbon needs, provided the necessary minerals to obtain a growth similar to that obtained with the YPG commercial medium. The possibility of dispensing with these components makes it possible to simplify the culture medium, obtaining an acceptable biomass production without nutrient limitations.

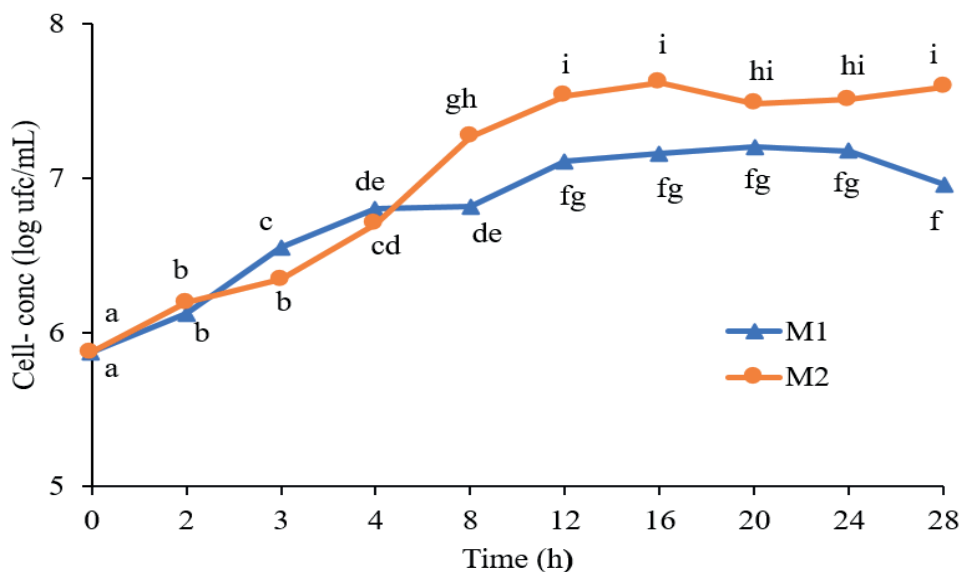
In this test, urea was used, as it is the cheapest nitrogen source worldwide and its use covered the nitrogen needs, without affecting the growth of LEVICA-27. According to these results, Marrero *et al.* (2016), when studying different nitrogen sources for the growth of this strain, found that the highest optical density values were observed with the use of casein and urea, a result that doubles that obtained with ammonium sulfate.

Figure 2 shows the growth kinetics of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 in the M2 and control (M1) media. There was no presence of the adaptation phase in any of the two culture media evaluated. In both cases, the duration of the exponential phase was approximately 12 h, when the maximum microbial concentration was obtained, with a value of 7.1 log cfu/mL in the M1 medium and 7.62 log cfu/mL in the M2 medium. The

excelencia para el crecimiento de microorganismos. Además, posee minerales como calcio, magnesio, hierro, potasio, zinc y otros factores de crecimiento (niacina, riboflavina, ácido pantoténico) en su composición, los que también favorecen el crecimiento celular, y pudieran ser la razón por la cual LEVICA-27 no requirió de otras fuentes de minerales. Do *et al.* (2019) reconocen que las levaduras necesitan vitaminas y minerales para su desarrollo. Sin embargo, señalaron que los requerimientos pueden variar de una cepa a otra, de manera que no hay un comportamiento homogéneo, en cuanto a los requerimientos de minerales o factores de crecimiento en las levaduras. En el caso de LEVICA-27, la melaza de caña de azúcar además de satisfacer las necesidades de carbono, aportó los minerales necesarios para obtener un crecimiento similar al que se obtuvo con el medio comercial YPG. La posibilidad de prescindir de estos componentes permite simplificar el medio de cultivo, obteniéndose una producción de biomasa aceptable sin limitaciones de nutrientes.

En el presente ensayo se utilizó urea, por ser la fuente de nitrógeno más económica a nivel mundial y su empleo cubrió las necesidades de nitrógeno, sin afectar el crecimiento de LEVICA-27. De acuerdo con estos resultados, Marrero *et al.* (2016) al estudiar diferentes fuentes de nitrógeno para el crecimiento de esta cepa encontraron que los mayores valores de densidad óptica se observaron con el uso de caseína y urea, resultado que duplica el que se obtuvo con sulfato de amonio.

En la figura 2 se muestran las cinéticas de crecimiento de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 en los medios M2 y control (M1). No se observó la presencia de la fase de adaptación en ninguno de los dos medios de cultivo evaluados. En ambos casos, la duración de la fase exponencial fue de 12 h aproximadamente, cuando se obtuvo la máxima concentración microbiana, con valor de 7.1 log ufc/mL en el medio M1 y 7.62 log ufc/mL en



a,b,c,d,e,f,g,h,i Different letters differ at $P < 0.05$, $SE \pm 0.1$, $P < 0.0001$

Figure 2. Comparison of the growth kinetics of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 in media M1 (YPG medium) and M2 (molasses and urea) at 30 °C, during 28 h of fermentation

stationary phase extended from 12 to 28 h in the two culture media.

The absence of the adaptation phase showed in this test is a desired characteristic, especially in fermentations at the industrial level, because it allows reducing the production times. In agreement with this result, Wang *et al.* (2012) did not observe the presence of this phase, when they cultivated a strain of *Pichia guilliermondii* in a different medium from the one used for the inoculum in a laboratory bioreactor.

Unlike the previous test, LEVICA-27 had a higher concentration in the medium with unconventional sources than in the control medium. The strain reached its maximum growth in the M2 medium at 12 h (7.62 log cfu/mL), so in subsequent studies it will be convenient to stop the fermentation process at this time, where the maximum growth of LEVICA-27 is obtained.

Table 2 shows the results of the growth characteristics of LEVICA-27 strain in the last two studied media. The maximum specific growth rate was lower in the M2 medium compared to the control and, consequently, the biomass doubling time was higher.

el medio M2. La fase estacionaria se extendió desde las 12 hasta las 28 h en los dos medios de cultivo.

La ausencia de la fase de adaptación presentada en este ensayo es una característica deseada, sobre todo en las fermentaciones a nivel industrial, debido a que permite disminuir los tiempos de operación. De acuerdo con este resultado, Wang *et al.* (2012) no observaron la presencia de dicha fase, cuando cultivaron una cepa de *Pichia guilliermondii* en un medio diferente al que utilizaron para el inóculo en un biorreactor de laboratorio.

A diferencia del ensayo anterior, LEVICA-27 tuvo mayor concentración en el medio con fuentes no convencionales que en el medio control. La cepa alcanzó su máximo crecimiento en el medio M2 a las 12 h (7.62 log ufc/mL), por lo que en estudios posteriores será conveniente detener el proceso fermentativo en este horario, donde se obtiene el máximo crecimiento de LEVICA-27.

La tabla 2 muestra los resultados de las características del crecimiento de la cepa LEVICA-27 en los dos últimos medios estudiados. Como se observa, la velocidad específica máxima de crecimiento fue inferior en el medio M2 con respecto al control y, consecuentemente, el tiempo de duplicación de la biomasa fue superior.

Table 2. Growth characteristics of the *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 strain in M1 (YPG) and M2 (molasses and urea) media

Indicators	M1	M2	± SE Sign
Duration of the exponential phase, h	0-12	0-12	-
Maximum specific growth rate, h ⁻¹	0.55 ± 0.07	0.36 ± 0.06	0.04 P = 0.0260
Biomass doubling time, h	1.28 ± 0.17	1.94 ± 0.29	0.14 P = 0.0283
Log X _{max} (X _{max} x 10 ⁷ ufc/mL)	7.12 ± 0.11 (1.35)	7.62 ± 0.27 (4.80)	0.12 P = 0.0392

X_{max} is the maximum biomass concentration

Similar results were found by Aguilar *et al.* (2015) with *Saccharomyces cerevisiae*, cultivated in a medium with molasses and whey (7.81 log cfu/mL), approximately at 16 h of fermentation. These authors obtained 3.26 h as biomass doubling time and estimated the maximum specific growth rate using the modified Gompertz model and reported lower values (0.09 h⁻¹) than those of this research.

Sanchez *et al.* (2007) reported values of maximum specific speed and biomass doubling time similar to those of this study, when evaluating the fermentation kinetics of *Pichia guilliermondii* strain with the same M2. However, the mentioned authors observed the presence of the adaptation phase lasting 4 h and the maximum concentration of biomass (3.97 g/L) was obtained at 24 h. This shows the specificity of microorganisms, since their behavior not only depends on the culture medium, genus or species, but also on

Resultados similares encontraron Aguilar *et al.* (2015) con *Saccharomyces cerevisiae*, cultivada en un medio con melaza y suero lácteo (7.81 log ufc/mL), aproximadamente a las 16 h de fermentación. Estos autores obtuvieron 3.26 h como tiempo de duplicación de la biomasa y estimaron la velocidad máxima específica de crecimiento mediante el modelo de Gompertz modificado e informaron valores inferiores (0.09 h⁻¹) a los de la presente investigación.

Sánchez *et al.* (2007) informaron valores de velocidad específica máxima y tiempo de duplicación de la biomasa similares a los de este estudio, al evaluar la cinética de fermentación de la cepa *Pichia guilliermondii* con el mismo medio M2. Sin embargo, los autores citados observaron la presencia de la fase de adaptación con 4 h de duración y la máxima concentración de biomasa (3.97 g/L) la obtuvieron a las 24 h. Esto demuestra la especificidad de los microorganismos, pues su comportamiento no solo depende del medio de cultivo,

the strain used.

In the stoichiometric balance, it was determined that the culture medium M2 must contain 2.32 g/L of total reducing sugars (3.87 g/L of sugar cane molasses) and 0.39 g/L of urea to produce 7.62 log cfu/mL (1.66 g dry biomass/L) which corresponds to the highest concentration of LEVICA-27 reached in this study. The balance also showed that the M2 medium, composed of 20 g/L of sugar cane molasses with 12 g/L of total reducing sugars (60 %) and 10 g/L of urea, has the potential to obtain 4 g dry biomass/L (10⁹ cfu/mL) of LEVICA-27, so there is no nutrient limitation.

Regarding the economic analysis of these two media, molasses and urea have a market cost of 2.4 and 2 USD/kg, respectively. On the other hand, the kilogram of YPG medium has a cost of approximately 260 USD. If the concentrations of the components in each culture medium are considered, it is obtained that the production of 100 L of YPG medium has a cost of 400 USD, and this same amount of medium M2 (molasses and urea) will have a cost of 6.82 USD. Hence the cost of the latter represents only 1.7 % of the conventional medium. In addition to the economic aspect, the use of simple culture media is very important for biomass production at industrial levels. This is due to the reduction of the time that is used in its preparation during the technological process.

When analyzing all the indicators, it can be stated that the M2 medium is the most suitable option for the production of *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 as an additive for animal feeding. In this case, in addition to obtaining better growth parameters than in the control medium, it includes fewer components in its preparation and has a lower cost, which offers economic and operational advantages for obtaining the additive at productive scales.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest between them.

Authors contribution

Bexy González Mora: Conceptualization, Investigation, Writing – original draft

Dailyn Sosa Cossio: Investigation, Supervision, Data curation, Formal analysis

Yoandra Marrero Rodríguez: Data curation, Formal analysis, Writing – original draft

Yaneisy García Hernández: Supervision, Data curation, Writing – original draft

Nereyda Albelo Dorta: Investigation, Data curation, Formal analysis.

género o especie, sino de la cepa que se utilice.

En el balance estequiométrico se determinó que el medio de cultivo M2 debe contener 2.32 g/L de azúcares reductores totales (3.87 g/L de melaza de caña) y 0.39 g/L de urea para producir 7.62 log ufc/mL (1.66 g biomasa seca/L) que corresponde con la mayor concentración de LEVICA-27 alcanzada en este estudio. También el balance demostró que el medio M2, compuesto por 20 g/L de melaza de caña con 12 g/L de azúcares reductores totales (60 %) y 10 g/L de urea tiene potencialidades para obtener 4 g biomasa seca/L (10⁹ ufc/mL) de LEVICA-27, por lo que no existe limitación de nutrientes.

En cuanto al análisis económico de estos dos medios, la melaza y la urea tienen un costo en el mercado de 2.4 y 2 USD/kg, respectivamente. En cambio, el kilogramo de caldo YPG tiene un costo de 260 USD aproximadamente. Si se consideran las concentraciones de los componentes en cada medio de cultivo se obtiene que la producción de 100 L de caldo YPG tiene un costo de 400 USD, y esta misma cantidad de medio M2 (melaza y urea) tendrá un costo de 6.82 USD, de ahí que el costo de este último representa solo 1.7 % del medio convencional. Además del aspecto económico, el empleo de medios de cultivo simples es muy importante para la producción de biomasa a niveles industriales. Esto se debe a la disminución del tiempo que se utiliza en su preparación durante el proceso tecnológico.

Al analizar todos los indicadores se puede plantear que el medio M2 constituye la opción más adecuada para la producción de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 como aditivo para la alimentación animal. En este caso, además de la obtención de mejores indicadores de crecimiento que en el medio control, incluye menos componentes en su preparación y tiene un costo menor, lo que ofrece ventajas económicas y operacionales para la obtención del aditivo a escalas productivas.

Conflicto de intereses

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

Contribución de los autores

Bexy González Mora: Conceptualización, Investigación, Redacción- borrador original

Dailyn Sosa Cossio: Investigación, Supervisión, Curación de datos, Análisis formal

Yoandra Marrero Rodríguez: Curación de datos, Análisis formal, Redacción- borrador original

Yaneisy García Hernández: Supervisión, Curación de datos, Redacción- borrador original

Nereyda Albelo Dorta: Investigación, Curación de datos, Análisis formal.

References

- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Tacanga, D., Zuta, I. & Linares, G. 2015. "Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo". *Agroindustrial Science*, 5 (1): 37-47, ISSN: 2226-2989. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2015.01.04>.
- Álvarez-Cao, M.E., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. & Becerra, M. 2019. "Bioconversion of beet molasses to alpha-

- galactosidase and ethanol". *Frontiers in Microbiology*, 10: 405, ISSN: 1664-302X. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1222-x>.
- Bento, H.B.S., Carvalho, A.K.F., Reis, C. & De Castro, H.F. 2020. "Single cell oil production and modification for fuel and food applications: assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus". *Industrial Crops and Products*, 145: 112-141, ISSN: 0926-6690. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112141>.
- Bharti, A.K., Kumar, A., Kumar, A. & Dutt, D. 2018. "Exploitation of *Parthenium hysterophorus* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687". *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11 (4): 271-280, ISSN: 1687-8507. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.01.003>.
- Cortez, M., Olivo, R., Rodríguez, C., Morales, G. & Montejo, C. 2019. "Evaluación del crecimiento de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo líquido". *Science, Technology and Educational Research*, 7 (1): 1-8, ISSN: 2007-8102.
- Di Rienzo, J. A., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. *Software estadístico y biometría*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Do, H.D.T., Theron, C.W. & Fickers, P. 2019. "Organic wastes as feedstocks for non-conventional yeast-based bioprocesses". *Microorganisms*, 7 (8): 229, ISSN: 2076-2607. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080229>.
- Doran P. 2013. *Bioprocess Engineering Principles*. 2nd ed. New York (EE. UU): Academic Press. ISBN: 0-12-220855-2.
- Duncan, D.E. 1955. "Multiple range and multiple F test". *Biometrics*, 11: 1-42, ISSN: 1541-0420. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Elghandour, M.M.Y., Tan, Z.L., Abu, H.S.H., Adegbeye, M.J., Greiner, R., Ugbogu, E.A. & Salem, A.Z.M. 2020. "*Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non- and pseudo-ruminant feeding: a review". *Journal of Applied Microbiology*, 128 (3): 658-674, ISSN: 1365 2672. <https://doi.org/10.1111/jam.14416>.
- Marrero, Y., Angulo, C., Ruiz, O., Elías, A. & Madera, N. 2016. "Growth of *Pichia guilliermondii* strain Levica 27 in different energy sources and nitrogen". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49 (1): 47-52, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Galindo, J., Castillo, Y. & Ruiz, O. 2020a. "Development of yeast additives for feeding ruminants in Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54 (4): 457-469, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Rodríguez, R., Torres, V., Jay, O. & Galindo, J. 2020b. "Effect of yeasts on the production of gas from *Cynodon nlemfuensis* in an *in vitro* rumen incubation". *Livestock Research for Rural Development*, 32 (1): 1-4, ISSN: 0121-3784.
- Montgomery, D.C. 2004. *Diseño y análisis de experimentos*. 2da ed. Universidad Estatal de Arizona. Editorial Limusa Wiley, ISBN: 968-18-6156-6.
- Roepcke, C.B.S., Vandenberghe, L.P.S. & Soccol, C.R. 2011. "Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation". *Animal Feed Science and Technology*, 163 (1): 33-42, ISSN: 0377-8401. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.09.018>.
- Sánchez, M.I., Santos, A., Dustet, J.C., Guerra, G., León, T., Argüelles, J., Ramos-Leal, M., Manzano, A.M., Casado, G. & Gómez, B. 2007. "Estudio fisiológico de una cepa de levadura con potencialidades para el enriquecimiento proteico del bagazo de caña de azúcar". *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 38 (1):39-43, ISSN: 0253-5688.
- Santesteban-Lopez, N.A., Ceron-Carrillo, T.G., Carmona-Silva, J.L. & Chavez-Medina, J. 2020. "Cultivation of *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* in whey for the production of single-celled protein intended for feeding cattle". *International Journal of Food Science and Biotechnology*, 5 (2): 12-21, ISSN: 2578-964. <http://dx.doi.org/10.11648/j.ijfsb.20200502.11>.
- Sosa, A., González, N., García, Y., Marrero, Y., Valiño, E., Galindo, J. & Moreira, O. 2018. "Collection of microorganisms with potential as additives for animal nutrition at the Institute of Animal Science". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51 (3): 311-319, ISSN: 2079-3480.
- Suntara, C., Cherdthong, A., Wanapat, M., Uriyapongson, S., Leelavatcharamas, V., Sawaengkaew, J. & Foiklang, S. 2021. "Isolation and characterization of yeasts from rumen fluids for potential use as additives in ruminant feeding". *Veterinary Sciences*, 8 (3): 52, ISSN: 2306-7381. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci8030052>.
- Wang, G.Y., Chi, Z., Song, B., Wang, Z.P. & Chi, Z.M. 2012. "High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22". *Bioresource Technology*, 124: 77-82, ISSN: 0960-8524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.024>.

Received: February 4, 2022

Accepted: March 28, 2022