

CAPÍTULO 8

CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DE LEVADURAS NATIVAS AISLADAS DE VACAS LECHERAS DE RAZA GYR EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Karen María De Hoyos Correa ²⁰
Jhoan Alonso Cardona Doria ²¹
Luty del Carmen Gomezcaeres Pérez ²²

20 Biólogo. Maestría en Biotecnología

21 Biólogo. Maestría en Biotecnología

22 Bacterióloga, Especialista en aseguramiento de la calidad Microbiológica. Maestría en Agricultura del Trópico Húmedo. Estudiante de Doctorado. Profesora en Corporación Universitaria del Caribe - CECAR

Introducción

Colombia es un país en el que la ganadería bovina es la principal actividad agropecuaria, destacándose que el ganado doble propósito es la especialidad que concentra el mayor porcentaje a nivel nacional con un 38,8%, mientras que un 35% se dedica a la cría, el 19,8 % a la ceba y el 6,4 % a lechería especializada, lo que conlleva a que se ocupe el doceavo lugar en el ranking de producción mundial, y el quinto lugar a nivel latinoamericano (Martínez, 2009).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), recomienda un consumo anual de 188 litros de leche por persona, y 33 kg de carne magra, sin embargo, a nivel nacional los datos promedio reportados son de 44 litros de leche y de 10 kg de carne anual por habitante (Martínez, 2009). La problemática en el sector ganadero del país se acentúa en razón a que Colombia es uno de los países con medicamentos animales más caros del mundo, asimismo, la presencia de residuos de antibióticos en la leche aqueja a toda la industria lechera, debido a que cantidades mínimas de antibióticos en la leche o la carne representan un problema de salud pública que no debe ser aceptado, además de ser ilegal (Gómez, 2013). Sumado a ello, se presenta el problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos, llegando a reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de enfermedades (Díaz, 2013). El principal factor incidente es la aparición de cepas resistentes en el empleo excesivo de antimicrobianos, con tres propósitos básicos: profilaxis, tratamiento terapéutico y promoción del crecimiento (FAO, 2005).

Los antibióticos y otros antimicrobianos se utilizan ampliamente en los tratamientos de la mastitis y otras enfermedades infecciosas como neumonía, podofilitis, etc. Hoy en día, se utilizan en el tratamiento profiláctico de vacas no lactantes y en este caso, pueden ser excretados elevados niveles de residuos durante largos periodos después del parto. Adicionalmente, los antibióticos presentes en la leche pueden inducir

alteración de la flora intestinal, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas; sin embargo, a interior del tubo digestivo de animales (y el hombre) existen microorganismos que favorecen la asimilación de alimentos, debido a que presentan propiedades que pueden ser aprovechadas, no solo a nivel de la misma agricultura, sino que también pueden tener aplicaciones médicas, esos microorganismos son llamados probióticos (OMS, 2004). Los probióticos han sido señalados como una alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Asimismo, estimulan la digestión y ayudan a mantener el equilibrio microbial en el intestino de los animales, acciones que contrarrestan el estrés derivado de los cambios en las dietas, las condiciones perjudiciales de manejo, y el ataque de patógenos (Anderson et al., 1999).

Una de las ventajas de los probióticos es el control de las infecciones intestinales en el ganado, dado que el uso de antibióticos a pesar de ser efectivo en algunos tratamientos ha provocado problemas como la afectación de la microbiota intestinal, predisposición a infecciones y aumento de cepas resistentes. Ante esta situación los probióticos constituyen una alternativa para evitar enfermedades y desordenes intestinales (Avila, 2010).

En el departamento de Sucre, la ganadería ocupa un lugar muy importante en la economía, en el año 2014 las fincas ganaderas ascendían a 17.296 predios, con una población bovina aproximada de 823.131 cabezas de ganado (Censo Nacional Agropecuario, 2014), y el sector lácteo es uno de los renglones básicos, con un aporte lechero en el mercado nacional de 634.863 litros diarios aproximadamente, disponibles especialmente para las plantas procesadoras y centros de acopio, representando el 3,3% de la producción de leche diaria a nivel nacional (Dimas, 2016). Sin embargo, la producción de leche en Sucre ha bajado entre un 40 % y 50 % por la sequía y afecciones gástricas (Aguilera, 2005)

Uno de los probióticos más utilizados en alimentación animal, tanto en monogástricos como en rumiantes; son las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque algunas formulaciones pueden incluir algunas cepas de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia* (Rodríguez, 2015). Adicionalmente, cultivos de levaduras y mohos se utilizan como aditivos comerciales para mejorar la fermentación ruminal. Estos se designan

“Direct Feed Microbes” o “alimentación directa con microorganismos” y se les asocia con capacidad fibrolítica o degradativa de paredes celulares; siendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* los más utilizados para este propósito (Caja et al., 2003).

Existe un relativo consenso de que las mejores respuestas en rumiantes se han observado en casos de vacas lecheras, y los efectos reconocidos en rumiantes se atribuyen al aumento de la celulólisis ruminal y del flujo de proteína microbiana al intestino (Van Vuuren, 2003). Actualmente, la raza Gyr y el cruce con esta raza, se ha convertido en una alternativa para mejorar la productividad lechera de los hatos del departamento, debido a su aptitud para la producción de leche y adaptación al trópico. A pesar de la vocación ganadera de Sucre, es muy poco lo que se conoce y se ha reportado acerca del potencial que puede representar el ganado, por ello es importante desarrollar estudios que evalúen las características probióticas de levaduras nativas aisladas a partir de estiércol de vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre.

Identificar los microorganismos con características probióticas en vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre, permitirá conocer el potencial uso de estos microorganismos, según los resultados que se obtengan, lo que contribuirá significativamente a la comunidad científica interesada, dado que al respecto es nueva información para el sector ganadero del departamento.

Caracterización de las propiedades probióticas in-vitro de levaduras aisladas a partir de muestras de estiércol de vacas lecheras de raza gyr.

Caracterización de las levaduras aisladas.

En el departamento de Sucre solo 6 haciendas poseen ganado de raza Gyr puro, de las cuales se muestreó un 66,7%, correspondiente a 4 haciendas ubicadas en los municipios de Sampués, Toluviejo, Corozal y Sincé. La muestra de heces fue tomada del recto del animal e inmediatamente se depositó en un recipiente estéril con una capa de aceite mineral para mantener en condiciones de anaerobiosis. En total se colectaron 4 muestras posteriormente fueron trasladadas en cavas con hielo hasta el laboratorio de biotecnología de la universidad de Córdoba para su procesamiento.

A partir de un pool de heces de 12 vacas raza Gyr sanas (3 de cada hacienda), de 53 a 96 meses de edad, alimentadas a base de maíz, pasto, vegetales y sin antibióticos, se aislaron 9 cepas de levaduras que crecieron tras diluciones y purificación en medio SDA (Rondón et al., 2008), las cuales fueron caracterizadas morfológicamente. En la tabla 1 se muestran las principales características morfológicas de las cepas aisladas.

Tabla 1. Características morfológicas de las levaduras nativas aisladas de las muestras de heces de vacas lecheras raza Gyr en el departamento de Sucre.

MEDIO DE CULTIVO	CEPAS (Código)	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	TINCIÓN CON AZUL DE LACTOFENOL
		Morfología	Gram	
Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)	KSPS 5B	Colonias grandes, color blanco, borde irregular	Positivo	Ausencia de pseudohifas y clamidosporas
	KSPS 3A	Colonias medianas, circulares, color crema, con bordes enteros	Positivo	Ausencia de pseudohifas y clamidosporas
	KSPS 3'A		Positivo	Presencia de pseudohifas
	KSPS 4A	Colonias grandes, circulares, elevadas, borde entero	Positivo	Doble pared, presencia de clamidosporas, ausencia de pseudohifas
	KSPM 6'A		Positivo	Presencia de pseudohifas
	KSPS 5'A		Positivo	Presencia de Clamidosporas y pseudohifas
	KISDA 4A		Positivo	Ausencia de pseudohifas y clamidosporas
	KSPM 6A	Positivo		
	KSPM 6'B	Colonias grandes, color blanco, borde irregular	Positivo	Presencia de Clamidosporas y pseudohifas

Fuente: Cálculos del estudio

Dentro de los microorganismos aislados, las levaduras una vez crecidas en medio SDA fueron sembradas en Chromagar en donde 8 de las 9 cepas mostraron un crecimiento de color verde, y azul, lo que indica que poseen características del género *Cándida*, descartando la continuidad de estas en el proceso de selección de microorganismos con características probióticas. La cepa KSPS 3'A mostró un crecimiento de color amarillo cremoso por lo que esta cepa se seleccionó para la realización de pruebas probióticas.

Características probióticas de los aislados

Tolerancia a cambios de pH. La cepa KSPS 3'A se evaluó a diferentes valores de pH, 3, 4, 5.6 y 7 (incubación a 37 °C durante 24 hrs); la sobre-vivencia y resistencia se comprobó al comparar el conteo de microorganismos viables del inóculo, con las células sobrevivientes después de la incubación (Zavaglia et al., 1998); el porcentaje de resistencia se calculó con la fórmula de (Kociubinski et al., 1999): $\% R \text{ pH} = [(UFC/\text{mL}) \text{ MRS pH} \times 100] / (UFC/\text{mL}) \text{ MRS (inóculo)}$, estableciéndose como criterio de selección resistir a un pH por encima del 50 %.

Al observar el comportamiento de la cepa de levadura sometida a diferentes concentraciones de pH se evidenció que KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus/Candida kefyri*) mostró crecimiento en todas las concentraciones de pH como se evidencia en la Figura 1.

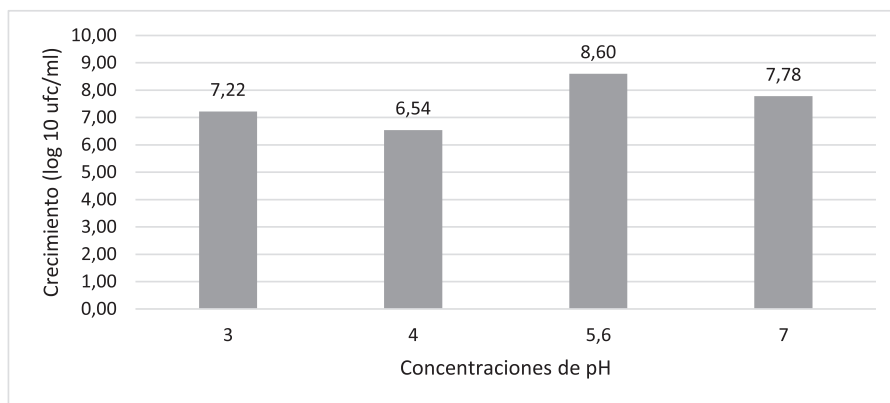


Figura 1. Crecimiento (log 10 ufc/ml) de la cepa KSPS3'A frente a diferentes concentraciones de pH (3, 4, 5,6 y 7).

Esto concuerda con lo reportado por You et al., (2006) quienes, en la búsqueda de microorganismos probióticos en los alimentos, aislaron una cepa de *Candida kefyri* de granos de kefyri y la sometieron a condiciones de simulación del tracto gastrointestinal. Esta levadura mostró altas resistencias al ambiente ácido y no murió incluso a pH 2,0, resultado que le confiere una ventaja y la convierte en una posible opción probiótica. Asimismo, Maccaferri et al., (2012) investigó diversos rasgos probióticos potenciales de *K. marxianus* utilizando ensayos in vitro, encontrando que esta levadura sobrevivió en condiciones de simulación gástrica a pH 2 con un valor final de 4,97 log cfu/mL. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Mendoza., (2013) quien evaluó la capacidad probiótica de la levadura *K. marxianus*, aislada a partir de una muestra de pulque y para ello fue sometida a valores de pH entre 1.5 a 4 por hasta 24 horas, siendo capaz de sobrevivir a estas condiciones.

Esta resistencia a cambios de pH se debe posiblemente a que existen sistemas intracitoplásmicos que permiten regular su equilibrio ácido base tal como sucede con otras levaduras lo cual hace que puedan soportar variaciones de pH, particularmente la acidez tal como lo menciona Fujimori et al., (2007), quien señala que la tolerancia de las levaduras a diferentes valores de pH se debe a los antiportadores de la bomba de Na^+/H^+ que poseen las levaduras, estos son proteínas encontradas en la membrana citoplasmática así como en los organelos de las células, estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) y H^+ a través de las membranas, de tal modo que regulan las concentraciones de cationes y pH a nivel citoplasmático y de los organelos (Mitsui et al., 2005; Ohgaki et al., 2005).

Viegas et al., (1998) sugieren que existe otro mecanismo adicional de las levaduras para regular el pH y la concentraciones, se trata de una ATPasa, codificada por el gen PMA 1 que se localiza en la membrana citoplasmática, esta puede crear un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos que está implicado en mantenimiento del pH cercano a la neutralidad y que además de ser un componente crítico de la adaptación de la levadura a los ácidos., es útil para muchas de las funciones fisiológicas de la levadura como la toma de nutrientes y la regulación intracelular.

Tolerancia a sales biliares. El ensayo se realizó con diferentes concentraciones de sales 0,05, 0,1, 0,15 y 0,3 % p/v ajustado el pH =7, e incubación a 37 °C durante 24 h, la sobrevivencia y resistencia se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Brizuela, 2003; Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Avila et al., 2010). Como resultado del comportamiento respecto a la tolerancia que exhiben los microorganismos a las diferentes concentraciones de sales biliares se pudo evidenciar que la cepa KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus/ Candida kefyr*) también presentó crecimiento en todas las concentraciones de sales biliares como se observa en la Figura 2.

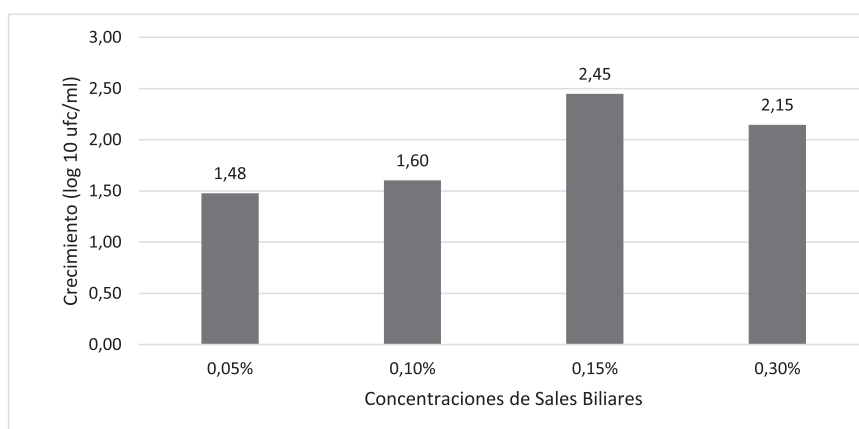


Figura 2. Crecimiento (log 10 ufc/ml) de la cepa KSPS3'A frente a diferentes concentraciones de sales biliares (0,05%; 0,10%; 0,15%; y 0.3%).

Este comportamiento es similar al señalado por You et al., (2006) en una de sus investigaciones donde *K. marxianus* muestra una alta tolerancia a la sal biliar al 1,0%, con un porcentaje de supervivencia de 97,2% luego de ser sometida a una simulación del tracto gastrointestinal. De igual forma Mendoza et al., (2013) con la finalidad de comprobar la resistencia de la levadura a las sales biliares, realizaron un ensayo exponiendo a *K. marxianus* a diferentes concentraciones de sales biliares, mostrando ser resistente a concentraciones de 0.05% a 0.30%, y se observó que la cantidad de ufc/ml de las levaduras en todos los casos se mantiene en el orden de 1×10^6 , indicando su tolerancia las diferentes concentraciones evaluadas. .

Estudios similares propuestos por Gilliland (2004) y Kühle (2005) reportaron que cepas de levaduras como *S. cerevisiae* y *S. var. bouldarii* mostraron resistencia a concentraciones de sales biliares de 0.30% (p/v) observando que dichas cepas crecían incluso después de 4 horas de incubación, para el estudio de *K. marxianus* el mayor periodo de incubación fue de 24 horas lo cual representa una ventaja al ser un periodo de tiempo mucho más grande.

Tolerancia a cloruro de sodio (NaCl). Se realizó una evaluación de KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus*/ *Candida kefyri*), a diferentes concentraciones de NaCl, 2, 4, 7 y 10 % p/v, e incubación a 37 °C durante 24 h; (Rondón et al., 2008), ésta cepa mostró crecimiento en todas las concentraciones, disminuyendo la densidad óptica a medida que la concentración de NaCl aumentaba como se observa en la Figura 3.

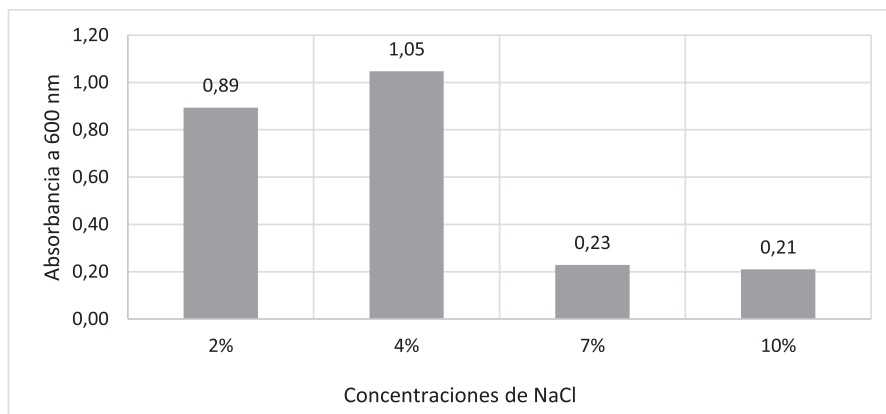


Figura 3. Promedios de crecimiento (Absorbancia 600 nm) de la cepa KSPS3'A frente a las diferentes concentraciones de NaCl (2%; 4%; 7%; y 10%).

Resultados similares reportaron Cardona., (2014), Díaz., (2013) y Pacheco (2013) en sus respectivas investigaciones donde a medida que se incrementaba la concentración de Cloruro de Sodio, disminuía el crecimiento de las levaduras evaluadas.

Prueba de antagonismo. La capacidad inhibitoria de KSPS3' fue evaluada contra *Salmonella* sp, *Pseudomona* y *E. coli*, sembradas en forma masiva en agar Müller Hinton. Observando que KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus*/ *Candida kefyri*) presentó halo de inhibición frente a *Salmonella*

(0,95 mm) y *E.coli* (0,98 mm), pero no frente a *Pseudomona* sp. Como se observa en la Figura 4.

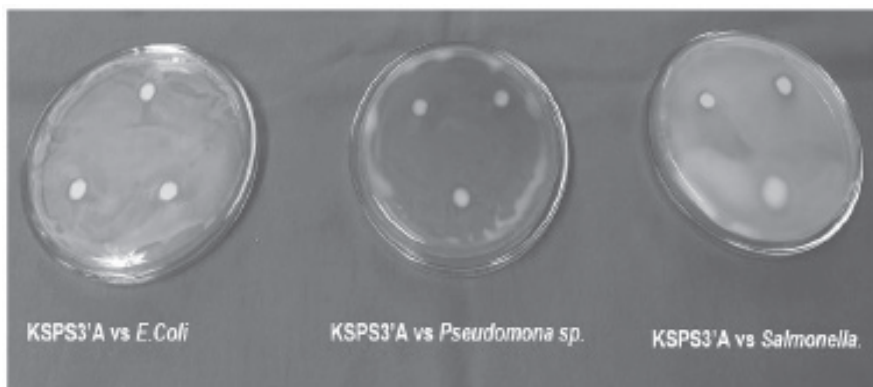


Figura 4. Promedios de crecimiento (Absorbancia 600 nm) de la cepa KSPS3'A frente a las diferentes concentraciones de NaCl (2%; 4%; 7%; y 10%).

You et al., (2006) reportaron que *Candida kefyr* no fue inhibida por el antibiótico tetraciclina. Estos resultados sugieren que esta levadura posee propiedades útiles como probióticos. Otras investigaciones señalan que *K. marxianus* inhibió el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en ensayo in vitro, cabe mencionar que en algunas ocasiones la inhibición del crecimiento de un microorganismo patógeno puede darse no solo por la producción de sustancias antimicrobianas, sino por la competencia en la superficie de adhesión en el intestino, o por la competencia por nutrientes (Mendoza., 2013)

Existen levaduras como *Saccharomyces boulardii*, que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos pertenecientes a las cepas de *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, y algunas otras bacterias enteropatógenas (Elmer y Corthier., 1991). Asimismo, Rodríguez et al., (1996) reporta que la levadura *Saccharomyces boulardii* es capaz de inhibir la multiplicación de *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, y *Klebsiella pneumoniae* en estudios in vitro.

Otro factor importante del cual depende la inhibición de un microorganismo patógeno es de la cantidad del inóculo. Al analizar la inhibición de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*, Salvatierra et al., (2004) reportó que el efecto depende de la concentración del inóculo y del tipo de patógeno lo que sugiere que

el efecto inhibitorio del microorganismo probiótico depende tanto de la especie de microorganismo patógeno y su concentración, así como de la concentración del microorganismo inhibidor, Rodríguez et al., (1996).

Prueba de fermentación de la glucosa. Se utilizó caldo MRS que contenían 0,2 % v/v de una solución de púrpura de bro-mocresol (0,5 %) y campanas de Durham; la producción de gas se evidenció mediante la presencia de gas en las campanas y luego de incubación a 37 °C durante 48 hrs (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008). *K. marxianus* presentó producción de gas (Ver Figura 5), lo que sugiere que la glucosa se fermento. Esta levadura puede ser de mucha importancia para metabolizar el oxígeno residual que entra con los alimentos manteniendo una anaerobiosis en el rumen. Díaz, (2013) reportó que levaduras aisladas de cerdo zungo costeño, producen gas (CO₂) y Pacheco, (2013), reportó datos similares al evaluar la producción de gas por levaduras aisladas de heces de gallinas ponedoras; lo que en monogástricos no es favorable por que puede producir trastornos digestivos; pero en rumiantes, hay una serie de mecanismos por los cuales se aprovecha el CO₂ producto de la fermentación ruminal. Como el metabolismo microbiano es anaerobio; y por lo tanto, no existe una cadena respiratoria que acepte estos hidrogeniones, los microorganismos los transfieren a distintos aceptores o sumideros de hidrógeno; Uno de los más importantes es el carbono (CO₂), originando la formación de metano (CH₄) (Relling y Mattioli 2003).

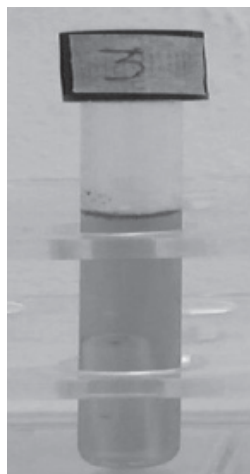


Figura 5. Capacidad de fermentación de glucosa de la cepa de levadura KSPS3'A

Tolerancia a cambios de temperatura. KSPS3' (*K. marxianus*) fue soemtida a temperaturas de 30 y 40°C por un periodo de 24h (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Ávila et al., 2010). *K. marxianus* presentó un crecimiento satisfactorio en ambas temperaturas, siendo 40°C donde obtuvo valores más altos como se muestra en la Figura 6.

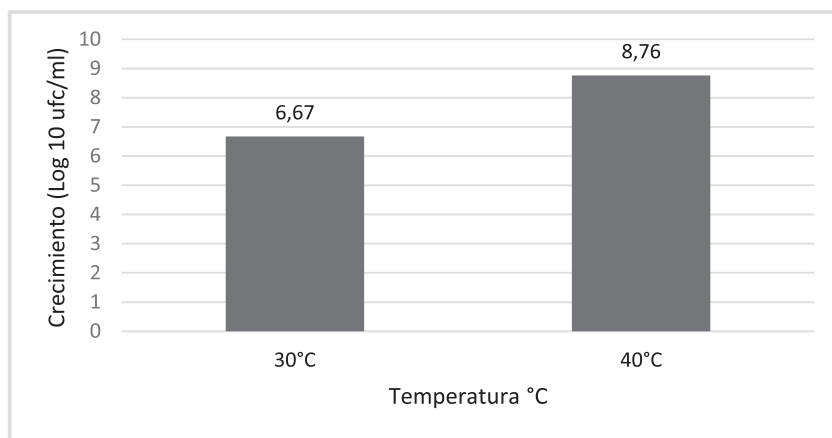


Figura 6. . Crecimiento (Log 10 ufc/ml) de la cepa de levadura KSPS3'A a 30°C y a 40°C.

Existen muchas investigaciones que han seleccionado como objeto de estudio a *K. marxianus*, y en ellas se observa como esta levadura ha tenido un extenso rango de temperatura de crecimiento.

Gouch et al., (1996) afirmaban que *Kluyveromyces marxianus* tenía una temperatura de crecimiento optimo que oscilaba entre 20 y 30°C. Diestra et al., (2015) señaló que la temperatura de crecimiento de este microorganismo es 39°C, y You et al., (2006) señalaron que *Candida kefyf* mostró una alta estabilidad térmica y de reproducción a 60 ° C.

Por su parte Mendoza, (2013) muestra que el rango de temperatura para *K. marxianus* oscila entre 27°C y 43°C ubicándola en la categoría de termo resistente a diferencia de otras levaduras que son más sensibles a la temperatura. Una muestra de ello, la sustenta Kumura., (2004) quien señala que *Saccharomyces sp* tiene una temperatura optima de crecimiento a 37°C, y Salazar et al., (2016) quienes reportan que *Lactobacillus curvatus* en compañía de las levaduras *Candida famata*, *Can. magnoliae*, *Can.*

krusei/incospicua y *Can. sphaerica* tuvieron una temperatura óptima de crecimiento a 33,5 °C.

Prueba de crecimiento.

La cepa de levadura que resistió la presencia de sales biliares y acidez se cultivó en 30 ml de caldo de guayaba agria, y se incubó a 37 °C durante 24 y 48 hrs; se realizó una curva de crecimiento para ver su comportamiento en el tiempo con los siguientes horarios de incubación (0, 6, 12, 18, 24 y 30 horas) (Rondón et al., 2008), encontrándose que cepa KSPS3'A (*K. marxianus*) mostró un crecimiento exponencial ya que se va incrementando a medida que aumenta el tiempo Figura 7.

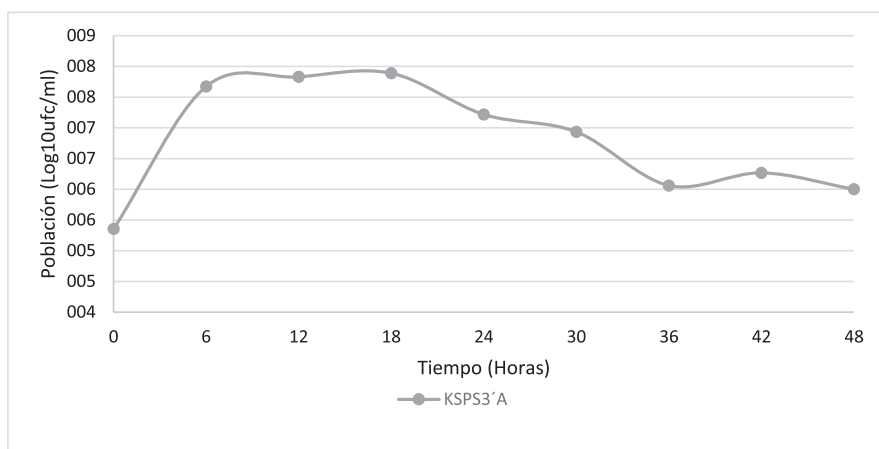


Figura 7. Crecimiento (Log 10 ufc/ml) de la cepa de levadura KSPS3'A a 30°C y a 40°C.

Adicionalmente se observó que su fase estacionaria se encuentra entre las 16 y 22 horas, finalmente la fase de muerte después de las 23 horas. Estos resultados difieren de los reportados por Mendoza, (2013) quien señaló que la fase logarítmica de *K. marxianus* inicia a la hora 3, su fase estacionaria es de las 27 a las 36 horas y la fase de muerte después de las 39 horas.

Es necesario resaltar que para la cepa KSPS3'A en su fase estacionaria existen poblaciones de $7,8 \times 10^7$ UFC/ml, cantidades óptimas de microorganismos para la preparación de un inoculo a partir del cual se pueda elaborar un producto nutricional como alternativa para ofertar a la

comunidad una visión de producción, reducción de las patologías entéricas de origen bacteriano, y reducción de costos para el propietario al disminuir la frecuencia de patologías digestivas en el ganado. Esto concuerda con los resultados reportados por Cavazzoni., (1998) quien señala que el número de microorganismos que debe contener un preparado comercial probiótico debe ser de 106 – 108 ufc/mL, para que al llegar a las células blanco puedan actuar sobre el huésped.

Identificación a nivel molecular las levaduras con potencial probiótico probadas in-vitro.

Teniendo en cuenta que la cepa KSPS3'A obtuvo buenos resultados en las pruebas probióticas “in-vitro”, se seleccionó para ser identificada mediante biología molecular. Para ello se aisló y purificó su DNA, con el fin de posteriormente amplificar por PCR de la región genética que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal de procariotes. Una vez hecho esto, se purificó el fragmento de PCR amplificado, acto seguido se secuenció por extensión del iniciador del fragmento de 1465 pares de bases con cuatro diferentes iniciadores y se realizó un análisis bioinformático comparativo con bases de datos de secuencias de DNA de levaduras para el alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema y por último se realizó la clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

Con respecto a la cepa de levadura KSPS3'A, los resultados del análisis taxonómico de esta secuencia de 708 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indicaron que la secuencia problema tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies *Kluyveromyces marxianus*. Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE y RDP (Warcup Fungal ITS) especializadas en secuencias de hongos y el análisis indica que la secuencia tiene mayor similitud con secuencias de *Kluyveromyces marxianus* (Figuras 8 y 9).

Características probióticas de levaduras nativas aisladas de vacas lecheras de raza gyr en el departamento de Sucre

Database(s) used: UNITE (fungi) + INSD (= GenBank, EMBL, DDBJ) + Envir.

BLASTN 2.2.29+

Sequences producing significant alignments:

		Score (Bits)	E Value
KY103837	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
KY103833	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
KY103808	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
KY103800	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
KY103799	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
KY103795	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
KY103790	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
HQ396523	Kluyveromyces marxianus	1278	0.0
FM177658	Kluyveromyces	1278	0.0
LC269188	Kluyveromyces marxianus	1274	0.0
KY103791	Kluyveromyces marxianus	1272	0.0
KY103787	Kluyveromyces marxianus	1272	0.0
KY103785	Kluyveromyces marxianus	1272	0.0
HQ014731	<u>ISHAM:MIT5769</u>	1272	0.0
KY103834	Kluyveromyces marxianus	1269	0.0
KY103824	Kluyveromyces marxianus	1269	0.0
KY103816	Kluyveromyces marxianus	1269	0.0
KY103739	Kluyveromyces lactis	1269	0.0
KP132323	<u>ISHAM:MIT5777</u>	1269	0.0
KY103827	Kluyveromyces marxianus	1267	0.0
KY103826	Kluyveromyces marxianus	1267	0.0
KY103825	Kluyveromyces marxianus	1267	0.0
KY103801	Kluyveromyces marxianus	1267	0.0
KY103781	Kluyveromyces marxianus	1267	0.0
KY103818	Kluyveromyces marxianus	1265	0.0
KY103779	Kluyveromyces marxianus	1265	0.0
KR089890	Kluyveromyces marxianus	1265	0.0
KR089884	Kluyveromyces marxianus	1265	0.0
KP132340	<u>ISHAM:MIT5772</u>	1265	0.0
KP132339	<u>ISHAM:MIT5771</u>	1265	0.0
KP132337	<u>ISHAM:MIT5767</u>	1265	0.0
KP132336	<u>ISHAM:MIT5766</u>	1265	0.0
KP132335	<u>ISHAM:MIT5765</u>	1265	0.0
KP132334	<u>ISHAM:MIT5764</u>	1265	0.0
KP132333	<u>ISHAM:MIT5763</u>	1265	0.0
KP132332	<u>ISHAM:MIT5762</u>	1265	0.0
KP132331	<u>ISHAM:MIT5761</u>	1265	0.0

Figura 8. Resultado de la comparación de la secuencia KSPS3'A contra la base de datos UNITE.

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: Warcup Fungal ITS trainset 2
 Query File: classifier_seq_upload6459400259698256113.FASTA
 Query Submit Date: Tue Jul 18 14:19:41 EDT 2017

Display depth: Confidence threshold:

domain	%	Library
Fungi	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

norank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] [download entire hierarchy as text file](#)

- >> domain Fungi (1)
 - >>> phylum Ascomycota (1)
 - >>>> subphylum Saccharomycotina (1)
 - >>>>> class Saccharomycetes (1)
 - >>>>>> subclass Saccharomycetidae (1)
 - >>>>>>> order Saccharomycetales (1)
 - >>>>>>>> family Saccharomycetaceae (1)
 - >>>>>>>>> genus Kluyveromyces (1)
 - >>>>>>>>>> species Kluyveromyces marxianus (1)

Figura 9. Resultado de la comparación de la secuencia de KSPS3'A contra la base de datos Warcup fungal RDP

Adicionalmente, se cotejó contra la base de datos especializada en levaduras YiestID indicando que la secuencia tiene una mayor similitud con *Kluyveromyces marxianus* (Figura 10).

Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value
a199	T	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281, CBS 712 ITS	1255	0.0
a198	T	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> CBS 2104 ITS	1053	0.0
a5282	N	<i>Kluyveromyces lactis</i> CLIB 210 ITS	1007	0.0
a200	NT	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 683 ITS	1007	0.0
a201	T	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> CBS 2745 ITS	892	0.0
a203	T	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 ITS	670	0.0
a202	T	<i>Kluyveromyces nonfermentans</i> CBS 8778 ITS	666	0.0
a208	T	<i>Lachancea cidri</i> CBS 4575 ITS	365	e-101
a207	T	<i>Lachancea fermentati</i> CBS 707 ITS	365	e-101
a5251	IT	<i>Candida ascalaphidarum</i> ATCC MYA-4358, CBS 1015...	351	7e-97
a5666	T	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i> CBS 111 ITS	349	3e-96
a205	T	<i>Lachancea waltii</i> CBS 6430 ITS	347	1e-95
a4746	T	<i>Yamadazyma terventina</i> CBS 12510 ITS	343	2e-94
a4194	T	<i>Candida dendronema</i> CBS 6270 ITS	343	2e-94
a4188	T	<i>Candida germanica</i> CBS 4105 ITS	343	2e-94
a4527	T	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i> CBS 10408 ITS	341	6e-94
a5722	T	<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> CBS 5767 ITS	341	6e-94
a3394	T	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> CBS 6246 ITS	341	6e-94
a4341	T	<i>Candida chilensis</i> CBS 5719 ITS	341	6e-94
a5702	T	<i>Candida silvicultrix</i> CBS 6269 ITS	341	6e-94
a4759	T	<i>Lachancea lanzarotensis</i> CBS 12615 ITS	339	3e-93

Figura 10. Resultado de la comparación de la secuencia de KSPS3'A contra la base de datos YiestID

Al realizar una comparación de la secuencia de KSPS3'A contra la base de datos del GenBank el análisis arrojó que la especie *Kluyveromyces marxianus* presentó un 100% de identidad con la secuencia de dicha cepa, corroborando el resultado de identificación de la cepa analizada.

Kluyveromyces marxianus es una levadura perteneciente a la familia Saccharomycetaceae, es la forma sexual o teleomorfa de *Candida kefyri*, termotolerante, y exhibe una alta tasa de crecimiento a 40°C (Seyis y aksoz., 2004). Las colonias de *K. marxianus* son de color crema a dorada y con la pigmentación rosada ocasionada debido a la producción del pigmento de quelato de hierro (Kurtzman et al., 2011).

Los biofilms de esta levadura son a menudo resistentes a los agentes antifúngicos comúnmente utilizados, debido a la dificultad en la penetración de la matriz polimérica extracelular (Nerurkar et al., 2012). Dentro de las

características de este microorganismo se puede encontrar que crece en una gran variedad de sustratos y a altas temperaturas que oscilan entre 20° C hasta 39°C, con un pH óptimo entre 6 y 7 (Fonseca et al., 2008).

El uso industrial de *K. marxianus* es principalmente en la conversión de lactosa en etanol como precursor para la producción de biocombustible (Lane et al., 2011) la capacidad de *K. marxianus* para reducir la lactosa es útil debido a la posibilidad de transformar residuos industriales de suero de leche, un producto problemático de desecho para su eliminación, en biomasa útil para piensos, aditivos alimentarios o combustible (Lane et al., 2011). Ciertas cepas también se pueden utilizar para convertir el suero en acetato de etilo, una fuente de combustible alternativo. (Looser et al., 2015). *K. marxianus* también se utiliza para producir las enzimas industriales: inulinasa, β -galactosidasa y pectinasa. Looser et al., (2015) dice que debido a la tolerancia al calor de *K. marxianus*, son posibles altas fermentaciones térmicas, lo que reduce los costos normalmente gastados para el enfriamiento, así como el potencial de contaminación por hongos o bacterias. Además, las fermentaciones a temperaturas más altas ocurren más rápidamente, haciendo la producción mucho más eficiente (Yang et al., 2015).

Debido a la capacidad de *K. marxianus* de utilizar simultáneamente lactosa y glucosa, su prevalencia en los entornos industriales es alta, ya que disminuye el tiempo de producción y aumenta la productividad (Fonseca et al., 2013). Recientes esfuerzos han intentado utilizar *K. marxianus* en la producción de aromas alimentarios a partir de productos de desecho de tomate y pimiento como sustrato (Güneşer et al., 2015). Maccaferri et al., (2012) desarrolló una investigación en la cual evaluaron las propiedades probióticas de *Kluyveromyces marxianus* B0399 utilizando ensayos in vitro, incluyendo la adhesión y la modulación inmune, y el efecto de la administración de 107 UFC / día de *K. marxianus* B0399 sobre la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal humana, todo esto en un sistema de cultivo continuo de 3 etapas que simulaba el colon humano. Los resultados de esta investigación demostraron que esta cepa fue muy adhesiva a las células Caco-2 similares a enterocitos humanos y moduló la respuesta inmune, induciendo citocinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). En presencia de estimulación inflamatoria con lipopolisacárido (LPS), *K. marxianus*

B0399 provocó disminuciones en los niveles de producción de citocinas proinflamatorias en PBMCs y células Caco-2, mejorando así la respuesta inflamatoria. Además, afectó a la microbiota del colon, aumentando la concentración de bifidobacterianos en las etapas del sistema del modelo colónico que simula el colon proximal y transversal. Las cantidades de acetato de ácidos grasos de cadena corta y propionato también aumentaron después de la suplementación con levadura. Finalmente, se encontró que *K. marxianus* B0399 induce una disminución del potencial citotóxico del sobrenadante de cultivo de la primera etapa del sistema de modelo de colon. Los efectos de *K. marxianus* B0399 sobre la adhesión, la función inmune y la microbiota colónica demuestran que esta cepa posee una serie de propiedades beneficiosas y específicas de cepa deseables para un microorganismo considerado para su aplicación como probiótico.

Por su parte Ceugniez et al., (2017) aislaron recientemente *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 y *Kluyveromyces lactis* S-3-05 de un queso francés tradicional, Tomme d'Orchies, y caracterizaron las ventajas de aplicación de estas cepas sobre el queso. Obteniendo como resultado su actividad anti-Salmonella principalmente en presencia de *K. marxianus* S-2-05. Además de su antagonismo, estas levaduras fueron capaces de sobrevivir en condiciones que imitan el medio gastrointestinal para formar biofilms en un dispositivo abiótico tal como poliestireno, dejando ver que las superficies de las paredes de las células poseen propiedades hidrófilas y capacidad de adhesión a las células Caco-2 intestinal, aumentando así su potencial como cepas probióticas.

Vale la pena resaltar la investigación desarrollada You et al., (2006) en la que evaluaron las propiedades probióticas de *Candida kefir* encontrando que la actividad enzimática fue mayor en amilasa ($0,33 \pm 1,12 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$) y que el número máximo de esta levadura en la curva de crecimiento se alcanzó a las 30 h de fermentación. Además, *Candida kefir* mostró altas resistencias al ambiente ácido, incluso a pH 2,0., y mostró una alta tolerancia a la sal biliar correspondiente a 97,2% de supervivencia en presencia de sal biliar al 1,0%. Sin dejar de lado, que presentó una alta estabilidad térmica a 60 ° C. y no fue inhibido en su totalidad por la tetraciclina. Estos resultados sugieren que *Candida kefir* tiene propiedades útiles como probiótico.

Conclusiones

- La cepa de levadura KSPS 3'A mostró potencial probiotico, exhibiendo tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal, Tales como: diferentes concentraciones de pHs, sales biliares, altas concentraciones de NaCl, actividad inhibitoria a patógenos, fermentación de glucosa y temperatura de 40°C.

- La identificación a nivel molecular dio como resultado que la cepa KSPS 3'A corresponde a la levadura *Kluyveromyces marxianus* con un 99% de identidad en el 100% de su longitud, por lo que se propone como cepa con potencialides probioticas.

- *Kluyveromyces marxianus* posee las características idóneas para la elaboración de un biopreparado que pueda ser probado en vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre.

Referencias Bibliográficas

- Aguilera Díaz, M. M. (2005). La economía del departamento de Sucre: ganadería y sector público. Banco de La República-Economía Regional.
- Anderson, D. B., Mccracken, V. J., Aminov, R. I., Simpson, J. M., Mackie, R. I., Verstenge, M. W., y otros. (1999). Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information*, 70(2), 115N-122N.
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, & Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 17(2), 161:169.
- Brizuela, M. (2003). Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Doctoral. ICIDCA, 101.
- Caja G., González E., Florez C., Carro M.D., Albanell e. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de Especializacion FEDNA.
- Cardona Doria, J. A. (2014). Evaluación de las características probióticas de levaduras nativas aisladas de novillos en el departamento de

- Cordoba-Colombia. [Tesis de Maestría en Biotecnología] Montevideo - Cordoba, 4-54.
- Cavazzoni, V., A, A., & G, G. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British Poultry Science*, 30:526-529.
- Ceugniz Alexandre, Coucheney Françoise, Jacquesa Philippe, Daube Georges, Delcenserie Véronique, Idriider Djame. (July–August de 2017). Anti-Salmonella activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Research in microbiology*, Volume 168, Issue 6, 575-582.
- Díaz Fajardo, M. J. (2013). Caracterización de levaduras y lactobacilos nativos con potencial probiótico aislado del estiércol de cerdo zungo costeño (*Sus scrofa domestica*), en San Pelayo – Córdoba. [Tesis de Maestría] Universidad de Córdoba, 103p.
- Diestra Balta, J., Aguilar, L. M., Vega Paulino, R., & Castillo Calderón, M. (2015). Modelación matemática del efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 303-312.
- Dimas Hoyos, D. L. (2016). El sector agropecuario en el departamento de Sucre.
- Elmer GW., Corthier G. (1991). Modulation of *Clostridium difficile* induced mortality as a function of the dose and the viability of the *Saccharomyces boulardii* used as a preventative agent in gnotobiotic mice. *Canadian journal of microbiology*, 37(4):315-7.
- Estadística-DANE, D. A. (2014). COLOMBIA - Tercer Censo Nacional Agropecuario.
- FAO/WHO. 2005. Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius [Internet]. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual. 15th Edition. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome. Pp 101-107 (Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_15e.pdf Consultado: noviembre, 24, 2008.

- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3):339-54.
- Fonseca, Graciano Gustavo; de Carvalho, Nuno Miguel Barbosa; Gombert, Andreas Karoly. (23 February 2013). "Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (11): 5055–5067.
- Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, et al. (2007). High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2(8):1199-204.
- Giusiano, M. L. Mangiaterra. (1998). Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar Candida . *Revista Argentina de Microbiología*, 30:100-103.
- Gilliland SE, Walker DK. (2004). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans . *Journal of dairy science*, 73(4):905-11.
- Gouch S, Flynn O, Hack C, Marchant R. (1996). Fermentation of molasses using thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimization of media supplements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46:187-90.
- Gómez Rodríguez, L. (2013). Informe especial: Colombia, uno de los países con insumos más costosos. *Revista Contexto Ganadero*, Una lectura rural de la realidad Colombiana. Colombia.
- Güneşer, Onur; Demirkol, Aslı; Karagül Yüceer, Yonca; Özmen Toğay, Sine; Çöleten Hoşoğlu, Müge; Elibol, Murat. (23 January 2015). "Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*". "Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (6): 1143–1155.
- Kreger, V., & Rij, M. (1984). *The yeasts. A taxonomy study*.

- Kühle, A., Skovgaardb, K., Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 29-39.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (17 de 11 de 2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of dairy science*, 87(12), 4050-6.
- Kurtzman, edited by Cletus P.; Fell, Jack W.; Boekhout, Teun. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier ISBN 978-0-444-52149-1: (5th ed. ed.).
- Lane, Melanie M.; Burke, Niall; Karreman, Rob; Wolfe, Kenneth H.; O'Byrne, Conor P.; Morrissey, John P. (15 June 2011). "Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*". *Antonie van Leeuwenhoek*, 100 (4): 507-519.
- Looser, Christian; Urit, Thanet; Gruner, Erik; Bley, Thomas. (17 January 2015). "Efficient growth of *Kluyveromyces marxianus* biomass used as a biocatalyst in the sustainable production of ethyl acetate". *Energy, Sustainability and Society*, 5 (1).
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (Febre- ro de 2012). Potencial probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an In Vitro Coloni Model System. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 956-964.
- Martínez, M., Gómez, C., Serpa, J. (2009). Diagnósticos de la calidad composicional e higiénico sanitaria de la leche cruda en centros de acopio y plantas procesadoras de del departamento de Sucre 2009. Universidad de Sucre.
- Mendoza Gardezabal, A. S. (Mayo de 2013). Caracterización de la levadura *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* como microorganismo probiótico. [Tesis de Maestría] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 75p. San Agustín Tlaxiaca, Hgo.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta*; 1720: 125-136.

- Nerurkar, Alka; Solanky, Priti; Chavda, Nilesh; Baria, Hinal; Desai, Binita. (2012). "Isolation of Candida Species in clinical specimens and its virulence factor: The biofilm". *International Journal of Medical Science and Public Health*, 1 (2): 97.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., Kanazawa, H. (2005). Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺/H⁺ antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta*; 1712: 185-196.
- Organización Mundial de la Salud. (Octubre de 2004). Foro mundial FAO/OMS de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
- Pacheco, D. (2013). Caracterización de levaduras y lactobacilos nativos con potencial probiótico aislado del estiércol de gallinas ponederas (*Gallus gallus*) Lhomann, en Montería – Córdoba. [Tesis de Maestría] Universidad de Córdoba, 84p.
- Relling, A. y Mattioli, G. (2003). *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. EDULP.
- Rodríguez AC, Nardi RM, Bambirra EA, Vieira EC, Nicoli JR. (1996). Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(3):251-6.
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición hospitalaria*, 31(s01), 33-47.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ránilla, M. J., y otros. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Rev. Somenta*, 6(1), 56-63.
- Rubio, M. A., Hernández, E. M., Aguirre, R. A., & Pouto, P. R. (2008). Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 13(1), 1157-1169.
- Salazar Alzate, B. C., Cortés Rodríguez, M., & Montoya Campuzano, O. (2016). Identification of some kefir microorganisms and optimiza-

- tion of their production in sugarcane juice. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 69(2), 7935-7943.
- Salvatierra, M. A., Gamboa, M., & Arias, M. L. (2004). Evaluación del efecto de cultivos de probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. *Arch Latinoam Nut*, 54(3), 298-302.
- Seyis & N. Aksoz. (2004). Production of Lactase × *Trichoderma* sp. *Food Technol. Biotechnology*, 42 (2) 121-124.
- Van Vuuren, A. (2003). Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. International One-Day Seminar.
- Viegas C, Almeida, P., Cavaco, M., Correia, I. (1998). The H1-ATPase in the plasma membrane of *Sacharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in Octanoic Acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:5.
- Yang, Chun; Hu, Shenglin; Zhu, Songli; Wang, Dongmei; Gao, Xiaolian; Hong, Jiong. (12 July 2015). "Characterizing yeast promoters used in *Kluyveromyces marxianus*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- You, S., Cho, J., Ha, C., & Kim, C. (2006). Probiotic Properties of the *Candida kefyr* Isolated from kefir. *Journal of Animal Science and Technology*, 48(2), 307-314.
- Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Pérez, P., & De Antoni, G. (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal Food Protection*, 61:865-873.