

Levaduras vínicas autóctonas: potencial fuente de prebióticos para formular alimentos funcionales.

Native wine yeasts: potential source of prebiotics to formulate functional foods.

María Silvina Cabeza^{1,2}, Cecilia Adriana Flores¹, Susana Gisela Ferreyra¹, Carolina Adriana Herrera¹, Mónica Alejandra Morant¹, Sara Mabel Evangelista¹, Marcela Paula Sangorrín^{3,4}, Alicia Lucía Ordoñez¹.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. CONICET. 3. PROBIEN. 4. CONICET-UNCo
mscabeza@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

En el presente trabajo se presenta la obtención de prebióticos: paredes celulares, β -glucanos y manoproteínas, a partir de levaduras vínicas autóctonas. La identificación de las levaduras se realiza mediante ITS1-5.8S-ITS2 PCR-RFLP y RFLP del ADN mitocondrial, para asegurar que son microorganismos GRAS. Para optimizar la producción de biomasa, se ensayó el efecto de 5 variables en las condiciones de cultivo (fuente de carbono: glucosa (2%) ó glicerol (3%); agitación: 0 y 100 rpm; temperatura: 28 y 37°C; pH del medio: 4 y 5; levadura: 8A-9 y 13A-5). Se obtuvieron paredes celulares mediante diferentes técnicas de desintegración celular: autólisis, ruptura mecánica (perlas cerámicas), ultrasonido, congelado-descongelado, hidrólisis con NaCl al 4% ó NaOH 0,1 N. Las manoproteínas fueron separadas por extracción térmica. Se analizaron 2 técnicas de extracción de β -glucanos: álcalis-ácido y álcalis. Se hidrolizaron las muestras para estudiar la concentración de azúcares reductores (DNS) y glucosa (ensayo enzimático). Se cuantificaron proteínas mediante la técnica de Bradford. La utilización de glucosa como fuente de carbono y temperatura de 28°C aumentó la obtención de biomasa; no se observaron diferencias significativas al evaluar las otras variables. Los tratamientos de ultrasonido y autólisis fueron elegidos para romper las células, lo que se verificó mediante observación en microscopio y azul de metileno. La mayor proporción de β -glucanos se alcanzó partiendo de levaduras autolizadas, a diferencia de las manoproteínas, donde su extracción se vio favorecida a partir de levaduras tratadas con ultrasonido. Se concluye que se debe emplear distinta ruptura celular dependiendo del producto deseado.

Palabras clave: levaduras vínicas autóctonas, paredes celulares de levaduras, β -glucanos, manoproteínas.

Abstract

This paper presents prebiotics obtention: cell walls, β -glucans and mannoproteins, from native wine yeasts. The identification of yeasts is done by ITS1-5.8S-ITS2 PCR-RFLP and RFLP of mitochondrial DNA, to ensure that microorganisms are GRAS. To optimize biomass production, the effect of 5 variables on culture conditions was tested (carbon source: glucose (2%) or glycerol (3%); stirring: 0 and 100 rpm; temperature: 28 and 37°C; pH of the medium: 4 and 5; yeast: 8A-9 and 13A-5). Cell walls were obtained by different cell disintegration techniques: autolysis, mechanical rupture (ceramic beads), ultrasound, frozen-thawed, hydrolysis with 4% NaCl or 0.1 N NaOH. Mannoproteins were separated by thermal extraction. Two techniques for the extraction of β -glucans were analyzed: alkali-acid and alkali. Samples were hydrolyzed to study the concentration of reducing sugars (DNS) and glucose (enzymatic assay). Proteins were quantified using Bradford technique. The use of glucose as source of carbon and a temperature of 28°C increased the obtaining of biomass; no significant differences were observed when evaluating the other variables. The ultrasound and autolysis treatments were chosen to break the cells, which was verified by microscopic observation and methylene blue. The highest proportion of β -glucans was achieved starting from autolysed yeasts, unlike mannoproteins, where their extraction was favored from yeasts treated with ultrasound. It is concluded that different cell rupture should be used depending on the desired product.

Keywords: native wine yeasts, yeast cell walls, β -glucans, mannoproteins.

1. Introducción

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de alimentos que afectan la salud del hospedador humano por estimulación selectiva de microorganismos potencialmente beneficiosos, es decir, modificando la composición de la microbiota del intestino (Duncan *et al.*, 2003; Roberfroid, 2001). Pueden reducir el crecimiento de organismos patogénicos o virulentos e inducir efectos que promuevan la salud (Duncan *et al.*, 2003). Para ser

más efectivos, deben ser capaces de alcanzar el intestino largo y ser utilizados específicamente por aquellos microorganismos que promueven efectos probados en la salud (Macfarlane y Cummings, 1999). Algunos ejemplos: mananligosacáridos, lactosa, galactoglucomanos, oligofructosa, inulina. Muchos son carbohidratos, principalmente cadenas cortas de 3 a 10 unidades de monosacáridos, derivados de plantas o componentes de paredes celulares de levaduras.

La pared celular de levadura (15-30% del peso seco de la misma), constituida principalmente por fibra dietética insoluble en agua: β -glucano y α -manano (prebiótico), y de proteína digerible unida al α -manano (manoproteínas), también considerada un componente beneficioso para la salud. Las paredes celulares de levadura pueden reducir el colesterol (Hitomi *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Htwe *et al.*, 2008), mejorar la hiperlipidemia (Hitomi *et al.*, 2002b), aumentar la actividad antioxidante (Jaehrig *et al.*, 2007), modificar la respuesta biológica del huésped, estimulando mecanismos de defensa del sistema inmune, frenando todo cambio producido por una agresión bacteriana, viral y fúngica (Swamy *et al.*, 2003; Akay y Dawson, 2003; Romero y Gómez Basauri, 2003). El mecanismo de acción de los mananoglicocáridos en la aglutinación de bacterias con fimbrias tipo 1, como *Salmonella* y *E. coli*, produce el bloqueo de la colonización y proliferación de estas poblaciones en el intestino (Bahurhoo *et al.*, 2007; Borowsky *et al.*, 2009).

La pared celular tiene una estructura dinámica que puede adaptarse a cambios fisiológicos y morfológicos. Además, se activan mecanismos compensatorios en la pared celular en respuesta a agentes perturbadores o mutaciones de la pared celular, lo que le permite remodelar la pared celular para combatir la lisis celular (Orlean, 1998; Klis *et al.*, 2002). El control de la composición de la pared celular podría ser relevante para propósitos tecnológicos, como en la producción de β -glucanos y mananos para producción de alimentos u otros (Donzis, 1996; Jozef *et al.*, 1999). Las condiciones de crecimiento afectan la composición de esa pared celular.

Los alimentos suplementados con manoproteínas inhiben la colonización por *Salmonella* y otras bacterias intestinales en animales (Ishihara *et al.*, 2000; Czerucka *et al.*, 2007; Naughton *et al.*, 2000). Las manoproteínas son todavía poco utilizados en la industria alimentaria, pese a su fácil obtención, bajo costo y numerosas propiedades. Algunas posibles aplicaciones tecnológicas e industriales: control de patógenos en la industria cárnica y avícola, aumento de la respuesta inmune y mejoras en la digestión y absorción de nutrientes en animales destinados al consumo humano, mejora de diversas características organolépticas del vino y diversos procedimientos enológicos (Gañán *et al.*, 2008). Extractos de manoproteínas obtenidos a partir de levaduras vínicas reducen significativamente la colonización de células intestinales por *Campylobacter* spp. (Gañán *et al.*, 2009). Los mananos no alteran sus propiedades por el calor, mejoran la viscosidad de preparaciones y pueden usarse como agentes ligantes en productos que contienen almidón (Wagner *et al.*, 2008).

Los β -glucanos de las levaduras presentan largas cadenas de glucosa con uniones β -(1-3) y (1-6) (Gardiner, 2004). Son ingredientes funcionales muy

valorados y existen varias técnicas para su extracción. La elección de la técnica de extracción apropiada es importante porque afecta la calidad, estructura, propiedades reológicas, peso molecular y otras propiedades funcionales del producto. Pueden aplicarse en varias matrices de alimentos (Ahmad *et al.*, 2012). Como función tecnológica (aditivos alimentarios), los β -glucanos obtenidos de levaduras pueden utilizarse en alimentos como espesantes, ligantes de agua y agentes ligantes de aceite, estabilizantes de emulsiones y como sustitutos de grasas, entre otras (Lee, 2002; Jong, 2002; Thammakiti *et al.*, 2004). Varios estudios indican la efectividad de los β -glucanos frente a varias enfermedades y desórdenes: tendencia a reducir el cáncer colorrectal (Dongowski *et al.*, 2002), evitan la constipación (Odes *et al.*, 1993), reducen el índice glucémico y los niveles de colesterol sérico (Delaney *et al.*, 2003), previenen enfermedades coronarias (Jinshui *et al.*, 2002), entre otros.

El trabajo se enfoca en obtener ingredientes de origen regional (a partir de levaduras ecotípicas de San Rafael) con propiedades funcionales (prebióticas) que permitan dar valor agregado a materias primas regionales y contribuir a la salud humana, reforzando el potencial económico de la región.

2. Materiales y métodos

2.1 Análisis molecular para identificación de levaduras y discriminación de cepas

Se identificarán mediante biología molecular (ITS1-5.8S-ITS2 PCR-RFLP y RFLP de ADN mitocondrial) las levaduras empleadas con el objetivo de asegurar que se trata de microorganismos GRAS.

La identificación taxonómica de las levaduras autóctonas se realizó por análisis del polimorfismo en los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción (RFLP) con endonucleasas específicas de la región génica ITS1-ADNr 5.8S-ITS2, previamente amplificada por PCR, como describe Esteve-Zaroso *et al.* (1999). La identificación de las levaduras se realizó comparando los tamaños de los amplificadores y de los fragmentos de restricción obtenidos experimentalmente con aquellos reportados en la base de datos www.yeast-id.com para cepas tipo de colección.

Por otra parte, se analizaron patrones de mtADN-RFLP para todos los aislados identificados como pertenecientes al género *Saccharomyces*. La extracción de ADN total se realizó de acuerdo a Querol *et al.* (1992) modificado por López *et al.* (2001). El ADN total de las levaduras fue digerido con enzima de restricción HinfI (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo TAE (Tris-acetato-EDTA).

2.2 Obtención de biomasa de levaduras vínicas autóctonas:

Se realizó una prueba rápida para determinar las variables significativas que afectan la obtención de biomasa de levaduras. Se estudió el efecto de 5 variables, en dos niveles cada una, utilizando un diseño estadístico factorial completo (25 ensayos), basado en los trabajos de Bzducha-Wróbel *et al.* (2013, 2015) y Aguilar-Uscanga y François (2003):

- Temperatura de incubación: 28 y 37°C
- pH del medio de cultivo: 4 y 5
- Agitación: sin agitación y a 100 rpm
- Fuente de carbono: glucosa (2%) ó glicerol (3%)
- Levadura empleada: 8A-9 y 13A-5

2.3 Extracción de paredes celulares de levaduras.

Las células se resuspendieron y se lisaron mediante 6 métodos diferentes:

- Autólisis: 55°C y pH 5,0 durante 24 h (Thanardkit *et al.*, 2002). Luego, se lleva el autolisado a 80°C durante 15 minutos para inactivar las enzimas endolíticas (Varelas *et al.*, 2016)
- Ruptura mecánica: con esferas cerámicas de 1/4" y ultrasonido, en 3 ciclos de 7 minutos de trabajo y 7 minutos de descanso (modificado de Bzducha-Wróbel *et al.*, 2015)
- Ultrasonido: se prepara una suspensión de levaduras en pH 7 y se lo trata en el lavador ultrasónico (Testlab –potencia ultrasónica: 80 W, frecuencia: 40 Hz) durante 14 minutos. Luego se lo lleva a 121°C durante 1,5 hs (modificado de Tam *et al.*, 2013)
- Hidrólisis con una solución salina hipertónica: la suspensión de levaduras se trata con NaCl al 4% y se las deja a 45°C durante 24 horas (Giraudó *et al.*, 2009)
- Hidrólisis con NaOH 0,1 N: la suspensión de levaduras es tratada con la base hasta pH 9,25 y se las deja a 45°C durante 24 horas (Giraudó *et al.*, 2009)
- Congelado-descongelado: se llevó la suspensión de levaduras en agua a -40°C durante 24 hs. Y posteriormente se lo descongela a temperatura ambiente.

Para la separación de la pared celular, se homogeniza la suspensión acuosa de levaduras, se centrifuga posteriormente (13.000 rpm/4°C/10 min) y se lava dos veces con agua destilada para retirar los componentes del citosol (insoluble: pared celular y soluble: extracto de levadura). Se asume que los precipitados obtenidos por centrifugación contienen la pared celular de levaduras.

La efectividad de la obtención de paredes celulares y su purificación de los componentes citosólicos fue observada al microscopio por tinción con azul de metileno (Bzducha-Wróbel, 2014).

2.4 Caracterización de los ingredientes y/o principios activos la pared celular de la levadura.

2.4.1 Manoproteínas:

Las manoproteínas son obtenidas por extracción térmica. Para ello, se prepara una suspensión de pared de levaduras (pH 7,2), y se calienta a 80-85°C en un baño termostático con agitación durante 24 h. Se centrifuga a 13.000 g durante 10 min y 4°C (Gañán *et al.*, 2009).

2.4.2 β -Glucanos:

Los β -Glucanos se obtienen por dos métodos diferentes, con el objetivo de determinar cuál es el más efectivo.

A – Alcalino: 5 volúmenes de NaOH 1 N a 90°C por 2 h (Suphantharika *et al.*, 2003). Enfriar a temperatura ambiente.

B – Álcis-Ácido: 5 volúmenes de 1,0 N NaOH a 80±5°C por 2 h, seguido de 5 volúmenes de 0,5 N Ácido acético a 75±5°C por 1 h (Thammakiti *et al.*, 2004).

Los preparados de manoproteínas y los de β -Glucanos, se centrifugan a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante. El residuo se lava 3 veces y se recuperó por centrifugación.

2.5 Determinación de proteínas, azúcares reductores y glucosa

Los precipitados obtenidos se secaron en estufa a 30°C durante 24 hs.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford (1976) empleando suero albúmina bovina como patrón.

Para la cuantificación de azúcares y glucosa, se realiza una hidrólisis previa por adición de 50% H₂SO₄ hasta que la concentración de muestra sea 2 mg/ml durante 24 h a 50°C. Luego se neutraliza con 2 M NaOH (Javmen *et al.*, 2012). Se determina la concentración de azúcares reductores con DNS (Miller *et al.*, 1959) utilizando glucosa como estándar; y glucosa por el método de glucosa oxidasa (GOD-PAP, GT Lab).

3. Resultados y Discusión

3.1 Identificación molecular de levaduras vínicas autóctonas

Se estudiaron 56 cepas de levaduras vínicas autóctonas de la región vitícola San Rafael aisladas anteriormente como *Saccharomyces* por las características macroscópicas desarrolladas en medio WL. Se confirmó que pertenecían a este género mediante los patrones de restricción generados de la región interna entre ITS 1 y 2 y el gen rRNA 5.8S y YeastID.com como base de datos. Mediante RFLP del ADN mitocondrial se identificaron las cepas diferentes de *Saccharomyces* autóctonas, determinadas por poseer un perfil de restricción diferente, como puede observarse en la Figura 1.

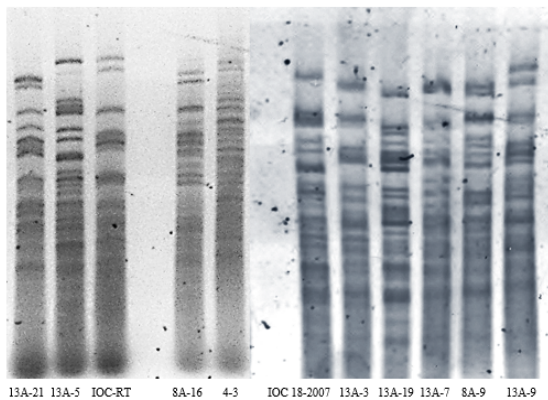


Figura 1. Perfiles de restricción de RFLP del ADN mitocondrial de levaduras vínicas autóctonas y levaduras comerciales

4.2 Biomasa

Distintos investigadores han observado que el uso de medio de cultivo con 2-3% de glicerol aumentaba la cantidad de β -(1,3/1,6)-glucano e intensificaba la biosíntesis de manoproteínas en la pared celular de levaduras. Esto se debe a una adaptación de las células al medio ambiente y al mismo tiempo señala diferente estructura de la pared en células procedentes de diversos cultivos. La respuesta de las células en diferentes condiciones de cultivo parece ser una característica individual de cada cepa, dependiendo de la concentración de glicerol y el pH del medio utilizado (Bzducha-Wróbel *et al.*, 2013). El incremento del espesor de la capa de manoproteínas en levaduras cultivadas en medio con la adición de glicerol se debería a la biosíntesis de glicoproteínas necesarias durante el metabolismo del glicerol y la regulación de los cambios de la presión osmótica causados por la fuente de carbono. Las manoproteínas sirven de protección a las células de levadura frente al estrés osmótico (Bzducha-Wróbel *et al.*, 2015).

Aguilar-Uscanga y François (2003) encontraron mayor velocidad de crecimiento, cantidad de quitina, de β -glucanos totales y relación β -1,6-glucano/glucano total cuando la levadura crecía a 37°C.

Los resultados obtenidos durante el ensayo se registraron en la Tabla 1:

Tabla 1. Análisis de Varianza para Biomasa - Suma de Cuadrados Tipo I

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Agitación	0,0011	1	0,0011	0,01	0,9073
B: Fuente de Carbono	1,7340	1	1,7340	22,43	0,0001
C: Levadura	0,0336	1	0,0336	0,43	0,5155
D: pH	0,0183	1	0,0183	0,24	0,6308
E: Temperatura	2,5634	1	2,5634	33,16	0,0000
RESIDUOS	2,0102	26	0,0773		

TOTAL (corregido)	6,3606	31			
-------------------	--------	----	--	--	--

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, con un 95,0% de nivel de confianza) en la obtención de biomasa cuando se utilizó diferente fuente de carbono y temperatura. En oposición a lo anteriormente expuesto, ambas levaduras no fueron capaces de crecer a 37°C y prefirieron como fuente de carbono a la glucosa. De acuerdo a estos resultados, se decide proseguir los estudios empleando los siguientes parámetros: temperatura de incubación: 28°C; pH del medio de cultivo: 5; sin agitación; fuente de carbono: glucosa (2%); levadura empleada: 13-A-5.

4.3 Extracción de pared

La localización de β -glucanos en la estructura de la pared celular requiere su disrupción lo que habilita a la producción de paredes celulares y luego al aislamiento del polímero buscado. La pérdida de manoproteínas no afectaría la integridad de la pared, sino más bien su porosidad (Hernawan y Fleet, 1995). La observación directa en microscopio permite estimar el número de células lisadas o desintegradas.

En la Figura 2 se observan diferencias en la cantidad y en el tamaño de levaduras muertas (inferior al de las células vivas) según el tratamiento de disrupción celular. La reducción del tamaño se debe a que las levaduras han perdido su citoplasma porque sus paredes están dañadas.

Al utilizar el método de congelación-descongelación, pese a que se trabajó a muy baja temperatura, prácticamente no se obtuvieron paredes de levaduras, lo que puede ser atribuido a que sólo se realizó un ciclo de congelado-descongelado.

El método de ruptura mecánica tampoco fue efectivo. Probablemente las perlas cerámicas empleadas son muy grandes (0,625 cm) para el objetivo propuesto y el método de agitación empleado no sea el más apropiado (ultrasonido de baja frecuencia).

La autólisis no afecta las paredes celulares pero es útil para descartar las sustancias intracelulares durante la preparación de las paredes celulares. El tratamiento con agua caliente (en nuestro caso, ultrasonido seguido de autoclave) provoca un aumento significativo de la pared celular mientras que las células tienen mucho menor tamaño (Liu *et al.*, 2008).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se eligieron 2 métodos de disrupción celular: ultrasonido y autólisis para proseguir el estudio y determinar la mejor técnica de extracción de β -glucanos y de manoproteínas.

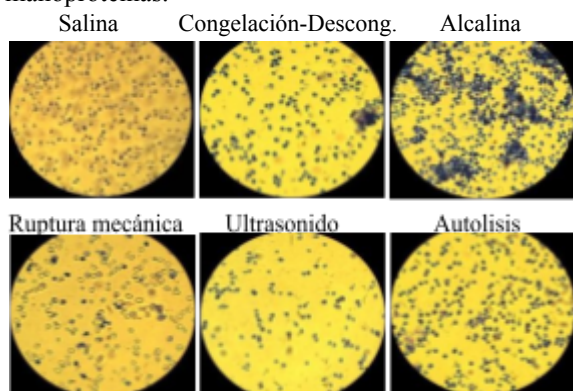


Figura 2. Distintas metodologías de disrupción celular vistas en microscopio (1000X)

4.4 Caracterización de los ingredientes y/o principios activos la pared celular de la levadura

Varelas *et al.* (2015) reportan que todos los métodos y patentes publicadas para la extracción de β -glucanos de la pared celular de levaduras se basan en la misma idea, primero, obtener las paredes celulares de levaduras y luego debe quitarse gradualmente los otros componentes de la pared celular. Las diferencias radican en las técnicas aplicadas en la disrupción y la extracción para la producción de β -glucano. La elección del método apropiado depende de la combinación de parámetros tales como el uso adicional de β -glucano soluble o insoluble producido (incorporación en medicamentos y alimentos funcionales), la pureza, el rendimiento, el costo, el tiempo, el equipo necesario, etc. Las lías de vino y la levadura de cerveza agotada tras la finalización de la fermentación alcohólica se pueden utilizar para la producción de β -glucano de levadura.

La mayor presencia proteínas se observa en las paredes de levadura obtenidas por autólisis (Tabla 2). Sin embargo, el tratamiento de extracción de manoproteínas más efectivo se advierte partiendo de paredes de levadura obtenidas con ultrasonido, eligiéndose esta técnica para estudios posteriores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bzducha *et al.* (2014). No hay diferencias significativas en las muestras de β -glucano, exhibiendo valores cercanos a 0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ muestra, resultado esperable.

En relación a azúcares reductores y glucosa, la mayor cantidad se encuentra en las muestras de β -glucano, lo que demostraría una buena obtención de este polisacárido de glucosa. Para ambas técnicas

de extracción, se observaron mejores resultados al emplear paredes celulares obtenidas por autólisis. Bzducha *et al.* (2014) también observaron que el tratamiento con autoclave conduce a una pérdida de parte de los β -glucanos solubles bajo tales condiciones.

Tabla 2. Caracterización de los productos obtenidos

	Azúcares reductores (mg Glu/mg muestra)		Glucosa (mg/mg muestra)		Proteína (mg/mg muestra)	
	Media	GH	Media	GH	Media	GH
PCL Autólisis	0,047	X X	0,023	X	15,97	X
PCL Ultrasonido	0,045	X X	0,176	X X	9,23	X
M Autólisis	0,059	X	0,073	X	7,33	X
M Ultrasonido	0,041	X	0,216	X X	14,14	X
β -g técnica a Autólisis	0,187	X	0,215	X X	0	X
β -g técnica a Ultrasonido	0,037	X	0,098	X X	0,88	X
β -g técnica b Autólisis	0,172	X	0,268	X	0,86	X
β -g técnica b Ultrasonido	0,054	X X	0,081	X	0,06	X

GH: Grupos homogéneos; PCL: Pared celular de levadura; M: Manoproteína; β -g: β -glucano

4. Conclusiones

Se identificaron distintas cepas de levaduras vínicas autóctonas del género *Saccharomyces*, asegurando que se trabajaba con microorganismos GRAS.

Se optimizaron las condiciones de cultivo para obtención de mayor cantidad de biomasa: 28°C; pH: 5; sin agitación; fuente de carbono: glucosa (2%); levadura empleada: 13-A-5.

Se logró obtener paredes celulares utilizando diferentes técnicas de desintegración celular, eligiendo como más adecuadas ultrasonido y autólisis.

Se extrajeron los ingredientes funcionales buscados con elevado grado de rendimiento.

Se debe emplear distinta metodología de ruptura celular de las levaduras de acuerdo al ingrediente funcional que se desee obtener: β -glucano o manoproteína.

5. Referencias

Aguilar-Uscanga, B.; François, J.M. (2003). *A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of*

- cultivation, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 268-274.
- Ahmad, A.; Anjum, F.M.; Zahoor, T.; Nawaz, H.; Dilshad S.M.R. (2012). *Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 201-212.
- Akay, V.; Dawson, D. (2003). *Mycotoxins and milk safety*, *Proceeding of Alltech 19th Annual Symposium*.
- Baurhoo, B.; Phillip, L.; Ruiz-Feria, C.A. (2007). *Effects of purified lignin and mannanoligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens*, *Poultry Science*, 86, 1070-1078.
- Borowsky, L.; Corção G.; Carsoso M. (2009). *Mannan oligosaccharide agglutination by Salmonella enterica strains isolated from carrier pigs*, *Braz. J. Microbiol.*, 40 (3), 458-464.
- Bradford, M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding*, *Anal. Biochem.*, 72, 248-255.
- Bzducha-Wróbel, A.; Błażej, S.; Kawarska, A.; Stasiak-Róžańska, L.; Gientka, I.; Majewska, E. (2014). *Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for β -Glucan Isolation*, *Molecules*, 19, 20941-20961.
- Bzducha-Wróbel, A.; Błażej, S.; Molenda, M.; Reczek, L. (2013). *Biosynthesis of $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol*, *Eur. Food Res. Technol.*, 240, 1023-1034.
- Bzducha-Wróbel, A.; Kieliszek, M.; Błażej, S. (2013). *Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source*, *Eur. Food Res. Technol.*, 237, 489-499.
- Czerucka, D.; Piche, T.; Rampal, P. (2007). *Yeast as probiotics*, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 26 (6), 767-778.
- Delaney, B.; Nicolosi, R.J.; Wilson, T.A.; Carls, T.; Frazer, S.; Zheng, G.H.; Hess, R.; Ostergren, K.; Haworth, J.; Knutson, N. (2003). *β -Glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters*, *J. of Nutr.*, 133, 468-475.
- Dongowski, G.; Huth, M.; Gebhardt, E.; Flamme, W. (2002). *Dietary fiber rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats*, *J. of Nutr.*, 132, 3704-3714.
- Donzis, R.A. (1996). *Substantially purified beta (1,3) finely ground yeast cell wall glucan composition with dermatological and nutritional uses*, US Patent 5576015.
- Duncan, S.H.; Scott, K.P.; Ramsay, A.G.; Harmsen, H.J.M.; Welling, G.W.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. (2003). *Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentator system*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1136-1142.
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. (1999). *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers*, *Int J. Syst. Bacteriol.*, 49, 329-337.
- Gañán, M.; Carrascosa, A.V.; Martínez-Rodríguez, A. (2008). *Manoproteínas derivadas de la pared celular de levaduras y su aplicación en la industria alimentaria*, *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 396, 70-74.
- Gañán, M.; Carrascosa, A.V.; De Pascual-Teresa, S.; Martínez-Rodríguez, A.J. 2009. *Inhibition by Yeast-Derived Mannoproteins of Adherence to and Invasion of Caco-2 Cells by *Campylobacter jejuni**, *Journal of Food Protection*, 72 (1), 55-59.
- Gañán Martínez-Ballesta, M. (2009). *Estudio de diferentes estrategias encaminadas a la disminución de la incidencia de *Campylobacter* spp. en la cadena alimentaria*, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Gardiner, T. (2004). *Beta-glucan biological activities: A review*, 1-39- Accessed on August 7, 2005 from Internet: www.usa.glycoscience.com.
- Giraud, M.; Vicente, F.; Scollo, D.; Ugarte, M.; Kulhawiuk, D.; Fomicz, S.; Mora, V. (2009). *Determinación de glucomananos en pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* por electroforesis capilar de zona*, *ACE: Revista de enología*, 104.
- Hernawan, T.; Fleet, G. (1995). *Chemical and cytological changes during the autolysis of yeast*, *J. Ind. Microbiol.*, 14, 440-450.

- Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Mizutani, M.; Nakamura, T.; Shirasu, Y. (2002). *Effects of brewer's yeast cell wall on fecal steroid excretion in rats*, J. Oleo Sci., 51, 335-346.
- Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Mizutani, M.; Nakamura, T.; Shirasu, Y. (2002b). *Effects of brewer's yeast cell wall on serum lipid levels in rats fed a high cholesterol and fat diet*, J. Oleo Sci., 51, 141-144.
- Htwe, K.; Yee, K.S.; Tin, M.; Vandenplas, Y. (2008). *Effect of Saccharomyces boulardii in the treatment of acute watery diarrhea in Myanmar children: a randomized controlled study*, Am. J. Trop. Med. Hyg., 78, 214-216.
- Ishihara, N.; Chu, D.C.; Akachi, S.; Juneja, L.R. (2007). *Preventive effect of partially hydrolyzed guar gum on infection of Salmonella enteritidis in young and laying hens*, Polt. Sci., 79, 689-697.
- Jaehrig, S.C.; Rohn, S.; Kroh, L.W.; Fleischer, L.G.; Kurz, T. (2007). *In vitro potential antioxidant activity of (1-N3), (1-N6)-b-D-glucan and protein fractions from Saccharomyces cerevisiae cell walls*, J. Agric. Food. Chem., 55, 4710-4716.
- Javmen, A.; Grigiškis, S.; Gliebutė, R. (2012). *β -glucan extraction from Saccharomyces cerevisiae yeast using Actinomyces rutgersensis 88 yeast lysing enzymatic complex*. Biologija, 58 (2), 51–59.
- Jinshui, W.; Cristina, M.R.; De-Barbera, C.B. (2002). *Effect of the addition of different fibers on wheat dough performance and bread quality*, Food Chem., 79, 221-226.
- Jong, S.C. (2002). *Fungal cell-wall glycans* In Biopolymers, 6 (polysaccharides 2) by Vandamme, E.J.; De Baets, S.; Steinbuchel, A. (Eds.), pp. 159-177. Wiley VCH Verlag, Weinheim.
- Jozef, S.; Kogan, G.; Kačuroková, M.; Machová, E. (1999). *Microbial (1,3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity*, Carbohydrate Polymers, 38, 247-253.
- Kim, K.S.; Yun, H.S. (2006). *Production of soluble β -glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 496-500.
- Klis, F.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. (2002). *Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiology Reviews, 26, 239-256.
- Lee, I.Y. (2002). *Curdlan* In Biopolymers, 5 (Polysaccharides 1), by Vandamme, E.J., De Baets, S.; Steinbuchel, A. (Eds.), pp. 135-158. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Liu, X.-Y.; Wang, Q.; Cui, S.W.; Liu, H.-Z. (2008). *A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast Saccharomyces cerevisiae*, Food Hydrocolloids, 22, 239-247.
- López, V.; Querol, A.; Ramón, D.; Fernández-Espinar, M.T. (2001). *A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts*, Int. J. Food Microbiol., 68, 75-81.
- Macfarlane, G.T.; Cummings, J.H. (1999). *Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?* West J. Med., 171, 187-191.
- Miller, G.L. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*, Analytical Chemistry, 31 (3), 426-428.
- Morales López, R. (2007). *Las paredes celulares de levadura de Saccharomyces cerevisiae: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde*, Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Nakamura, T.; Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Shirasu, Y.; Tsukui, T.; Shimasaki, H. (2002). *Effect of yogurt supplemented with brewer's yeast cell wall on levels of blood lipids in normal and hypercholesterolemic adults*, Journal of Oleo Science, 51 (5), 323-334.
- Naughton, P.J.; Grant, G.; Bardicz, S.; Pusztai, A. (2000). *Modulation of Salmonella infection by the lectins of Canavalia ensiformis (Con A) and Galanthus nivalis (GNA) in a rat model in vivo*, J. Appl. Microbiol., 88, 720-727.
- Odes, H.S.; Lazovski, H.; Stern, I.; Madar, Z. (1993). *Double-blind trial of high dietary fiber, mixed grain cereal in patients with chronic constipation and hyperlipidaemia*, Nut. Res., 13, 979-985.
- Orlean, P. (1988). *Cell Wall Biogenesis* In The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, pp. 229-362. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Otero Rambla, M.A.; Cabello Balbín, A.J. (2007). *Procesamiento de levadura para la obtención de derivados. Diferentes alternativas*, ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, XLI (1), 2-11.

- Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. (1992). *A comparative study of different methods of yeast-strain characterization*, Syst Appl Microbiol, 15, 439-446.
- Roberfroid, M.B. (2001). *Prebiotics: preferential substrates for specific germs?*, Am. J. Clin. Nutr., 73, 406S-409S.
- Romero, R.; Gómez Basuri, J. (2003). *Yeast and yeast products, past, present and future*, Proceeding of Alltech 19th Annual Symposium.
- Suphantharika, M.; Khunrae, P.; Thanardkit, P.; Verduyn, C. (2003). *Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon**, Bioresource Technology, 88, 55–60.
- Swamy, H.; Smith, T.K.; Macdonald, E.J.; Karrow, N.A.; Woodward, B.; Boermans, H.J. (2003). *Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent*, Journal of Animal Science, 81, 2792-2803.
- Tam, T.M.; Duy, N.Q.; Minh, N.P.; Dao, D.T.A. (2013). *Optimization of Beta-Glucan extraction from waste brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme-ultrasonic treatment*, American Journal of Research Communication, 1 (11), 149-158.
- Thammakiti, S.; Suphantharika, M.; Phaesuwan, T.; Verduyn, C. (2004). *Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry*, Int. J. Food Sci. Technol., 39, 21-29.
- Thanardkit, P.; Khunrae, P.; Suphantharika, M.; Verduyn, C. (2002). *Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed*, World J Microbiol Biotechnol, 18, 527–539
- Torabizadeh, H.; Shojaosadati, S.A.; Tehrani, H.A. (1996). *Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products*, Lebensm.-Wiss. u-Technol., 29, 734-737.
- Varelas, V.; Liouni, M.; Calokerinos, A.C.; Nerantzis, E.T. (2015). *An evaluation study of different methods for the production of β -D-glucan from yeast biomass*, Drug Test. Analysis, 8, 46-55.
- Varelas, V.; Tataridis, P.; Lioni, M.; Nerantzis, E.T. (2016). *Application of different methods for the extraction of yeast β -glucan*. e-Journal of Science & Technology, 11.
- Vasallo, M. del C.; Puppo, M.C.; Palazolo, G.G.; Otero, M.A.; Beress, L.; Wagner, J.R. (2006). *Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*: Surface and emulsifying properties*, LWT – Food Science and Technology, 29, 729-739.
- Wagner, J.R.; Otero Rambla, M.A.; Guerrero Legarreta, I. (2008). *Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos*, Buenos Aires, Universidad Nacional de Quilmes.