



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Efectos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* var.
boulardii para minimizar la carga de aflatoxinas en maíz
destinado para consumo humano.**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
Ingeniero en Alimentos con mención en Nutrición**

Autor:

CRISTINA FERNANDA QUINTERO ÁLVAREZ

Director(a):

MARCO ANTONIO LAZO VÉLEZ

Co-Director(a):

SERGIO SERNA SALDIVAR

CUENCA, ECUADOR

2021

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mis amados padres Ricardo y Lucía, los verdaderos responsables y merecedores de este logro. Siempre me apoyaron, me cuidaron, me permitieron ser libre y elegir, trabajaron a mi lado para cumplir este y todos mis sueños; por ustedes soy la persona que soy y mi más grande anhelo es hacerlos sentir muy orgullosos.

Con amor para mamá y papá.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme alcanzar esta meta, por guiar cada paso y estar siempre conmigo.

A mi familia quien me ha apoyado todos los días de mi vida, siempre motivándome y sin dejarme decaer; han sido mi motor y mi más grande inspiración.

A la Universidad del Azuay y al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, lugar este último, en donde se realizaron todos los procedimientos de esta tesis. Además, a todas aquellas personas que contribuyeron con mucho y con poco para que pueda alcanzar este sueño. Marco, Sergio, Fernanda, Rodrigo, Alicia, Mónica, Diego, Johanna, siempre los llevaré en mi corazón.

Gracias

RESUMEN

Se determinó el efecto de la adición de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces var. boulardii* sobre la carga de aflatoxinas en granos de maíz contaminados. Granos de maíz blanco fueron inoculados con *A. flavus* en cantidad conocida y se le adicionó soluciones de pared celular de levaduras en concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/kg. Finalmente se evaluó la carga de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 mediante UPLC obteniendo que ambas levaduras son capaces de minimizar la carga de aflatoxinas en más del 80%. Los tratamientos más efectivos fueron *S. cerevisiae* y *S. boulardii* 1 mg/kg.

Palabras Claves: *Saccharomyces*; Aflatoxinas; Pared celular; UPLC.



Marco Antonio Lazo Vélez
Director de tesis



María Fernanda Rosales Medina
Directora de escuela



Cristina Quintero
Autora

ABSTRACT

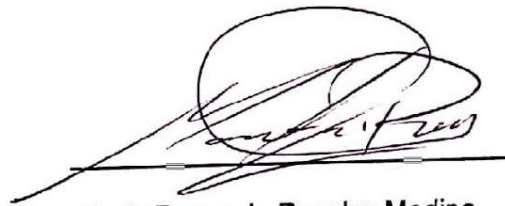
The effect of the addition of the cell wall of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces var. boulardii* on the aflatoxin load in contaminated corn kernels was determined. The white corn kernels were incubated with *A. flavus* in a known quantity and yeast cell wall solutions were added in concentration of 0.5, 1 and 2 mg / kg. Finally, the load of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 was evaluated by UPLC, obtaining that both yeasts can reduce the load of aflatoxins by more than 80%. The most effective treatments were *S. cerevisiae* and *S. boulardii* 1mg / kg.

Keywords: *Saccharomyces*; *Aflatoxins*; Cell wall; UPLC.



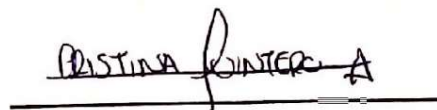
Marco Antonio Lazo Vélez

Thesis Director



María Fernanda Rosales Medina

Faculty Director



Cristina Quintero

Author



ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDO	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
CAPÍTULO II.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS	3
2.2. Diagrama de flujo para la obtención y aplicación de pared celular.....	3
2.3. Obtención de la pared celular de las levaduras.....	5
2.4. Aplicación de ultrasonidos para la ruptura de la pared celular.	5
2.5. Acondicionamiento de los granos de maíz.	5
2.6. Aplicación del tratamiento de pared celular liofilizada.	5
2.7. Determinación de Aflatoxinas.....	6
CAPÍTULO III.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIONES	8
3.1. Crecimiento de la biomasa de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i> bajo condiciones aerobias y anaerobias en biorreactores controlados.	8
3.2. Efecto de la aplicación de ultrasonidos para la ruptura de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> o <i>S. boulardii</i>, evaluando diferentes tiempos de exposición.....	10
3.3. Cuantificación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 mediante UPLC	11
CAPÍTULO IV	13
CONCLUSIÓN	13

REFERENCIAS 14

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tiempo de Sonicación vs Ruptura de PC de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. boulardii</i>	10
Tabla 2 Determinación de Aflatoxina B1, B2, G1 y G2	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de flujo 4

Figura 2 Crecimiento Biomasa de levaduras en condiciones aerobias y anaerobias 9

Cristina Fernanda Quintero Álvarez

Trabajo de Graduación

Dr. Marco Antonio Lazo Vélez / Dr. Sergio Serna Saldívar

Febrero, 2021

Efectos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* para minimizar la carga de aflatoxinas en maíz destinado para consumo humano.

**CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO**

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los productos alimenticios más consumidos a nivel mundial, siendo de gran importancia tanto para alimentación humana como animal. La demanda de este cereal es alta, y los grandes avances en el área tecnológica y de innovación, el crecimiento demográfico y las tendencias de consumo del mercado hacen que la demanda de maíz esté en crecimiento (Arteaga et al., 2004). No obstante, se estima que alrededor del 25% de las cosechas son afectadas por hongos toxigénicos (Gómez, 2017), los cuales contaminan los granos con micotoxinas. Infestaciones que representan un importante problema de salud pública (Escalona, 2009).

Las aflatoxinas (AF) se dividen en dos grupos: el grupo B (aflatoxinas B1 y B2) caracterizado por un anillo ciclopentanona y el grupo G (aflatoxinas G1 y G2) caracterizado por un anillo de lactona. Por otro lado, las aflatoxinas M1 y M2 son metabolitos hidroxilados de las aflatoxinas B1 y B2, las cuales se pueden encontrar en la leche de consumo procedente de animales que han ingerido alimento contaminado (Escalona, 2009). La aflatoxina B1 es la principal toxina producida por el *A. flavus*, siendo además el metabolito con mayor toxicidad debido a su radical epóxido, el cual interactúa con proteínas por conjugación y produce toxicidad (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015). La Unión Europea en el año 2001 estableció un límite máximo de aflatoxinas de 4 mg/kg en productos agrícolas, para la AF B1 un máximo de 2 mg/kg y para la AF M1 un rango de 0,05 a 0,5 mg/kg (Martínez-Larrañaga y Anadón, 2006).

Las micotoxinas se presentan en alimentos principalmente por infección de la planta en el campo por el hongo patógeno, infestación de insectos o pájaros, daño mecánico y/o crecimiento de hongos patógenos postcosecha sobre los frutos o granos almacenados debido a las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, madurez del grano, ventilación, etc.) (Gómez, 2017; Escalona, 2009). Cabe mencionar que los dos géneros de

hongos toxigénicos más estudiados y comunes en la infestación de cereales son *Aspergillus* y *Fusarium* (Martínez -Padrón, 2013).

Por otro lado, las levaduras son hongos unicelulares que se han utilizado durante siglos para la obtención de productos como el vino, la cerveza o el pan (Tomacic et al., 2016). Dentro de la industria de los alimentos, las levaduras más utilizadas pertenecen al género *Saccharomyces* (Frazier y Westhoff, 1993). Además de uso alimenticio, la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se utiliza para reducir la carga de micotoxinas en piensos para alimentación animal (Morales, 2007).

La pared celular representa entre el 26 - 32% de la célula (Morales, 2007) y en el caso de la *S. cerevisiae* su estructura química muestra un alto grado de antigenicidad debido a sus fracciones de β -glucanos y manosa; esta estructura tridimensional constituida principalmente de polisacáridos es capaz de llevar a cabo reacciones de absorción para ciertas micotoxinas (Jouany et al., 2005).

Varios estudios taxonómicos han revelado que la levadura *Saccharomyces boulardii* es una cepa de *S. cerevisiae*, por lo que esta levadura se denomina *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (*S. boulardii*) (Tomacic et al., 2016; Lazo-Vélez et al., 2019). Además, la levadura *S. boulardii* tiene propiedades nutricionales y farmacéuticas importantes. La Unión Europea (UE) la ha catalogado como un microorganismo seguro para su empleo en alimentación animal, así mismo, la FDA lo ha clasificado como microorganismo seguro grado GRAS (Generally Recognised As Safe) (Lazo-Vélez et al. 2019).

La finalidad de esta investigación fue evaluar si la pared celular de *S. boulardii* tiene la capacidad de inhibir aflatoxinas al igual que la pared celular de *S. cerevisiae*. El efecto sobre la carga de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 fue determinada mediante Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Levaduras

Saccharomyces cerevisiae se inoculó a partir de levadura comercial liofilizada marca Saf-instant Oro obtenida en México, mientras que *S. boulardii* se obtuvo a partir del medicamento comercial Floratil que contiene 10 sobres de 250 mg de *S. boulardii* CNCM I-745, (Axon Pharma®, México). Se utilizaron granos de maíz blanco (*Zea mays*) previamente sanitizados y almacenados siguiendo el manual de Ponce García et al. (2018). El hongo utilizado fue *Aspergillus flavus* el cual fue obtenido de granos contaminados, siguiendo el manual de Ponce García et al. (2018).

2.2. Diagrama de flujo para la obtención y aplicación de pared celular.

En la sección A de la figura 1 se presenta el proceso de obtención del polvo de pared celular a partir de levaduras comerciales en polvo *S. cerevisiae* y *S. boulardii*. En la sección C se presenta la obtención de una solución con concentración conocida de *A. flavus* a partir de granos de maíz contaminado. En la sección B se muestra la obtención de granos secos a partir de granos limpios, así como la aplicación de los diferentes tratamientos de pared celular (A) y la solución conocida de *A. flavus* (C) sobre los mismos, para la obtención de datos cuantitativos de AF.

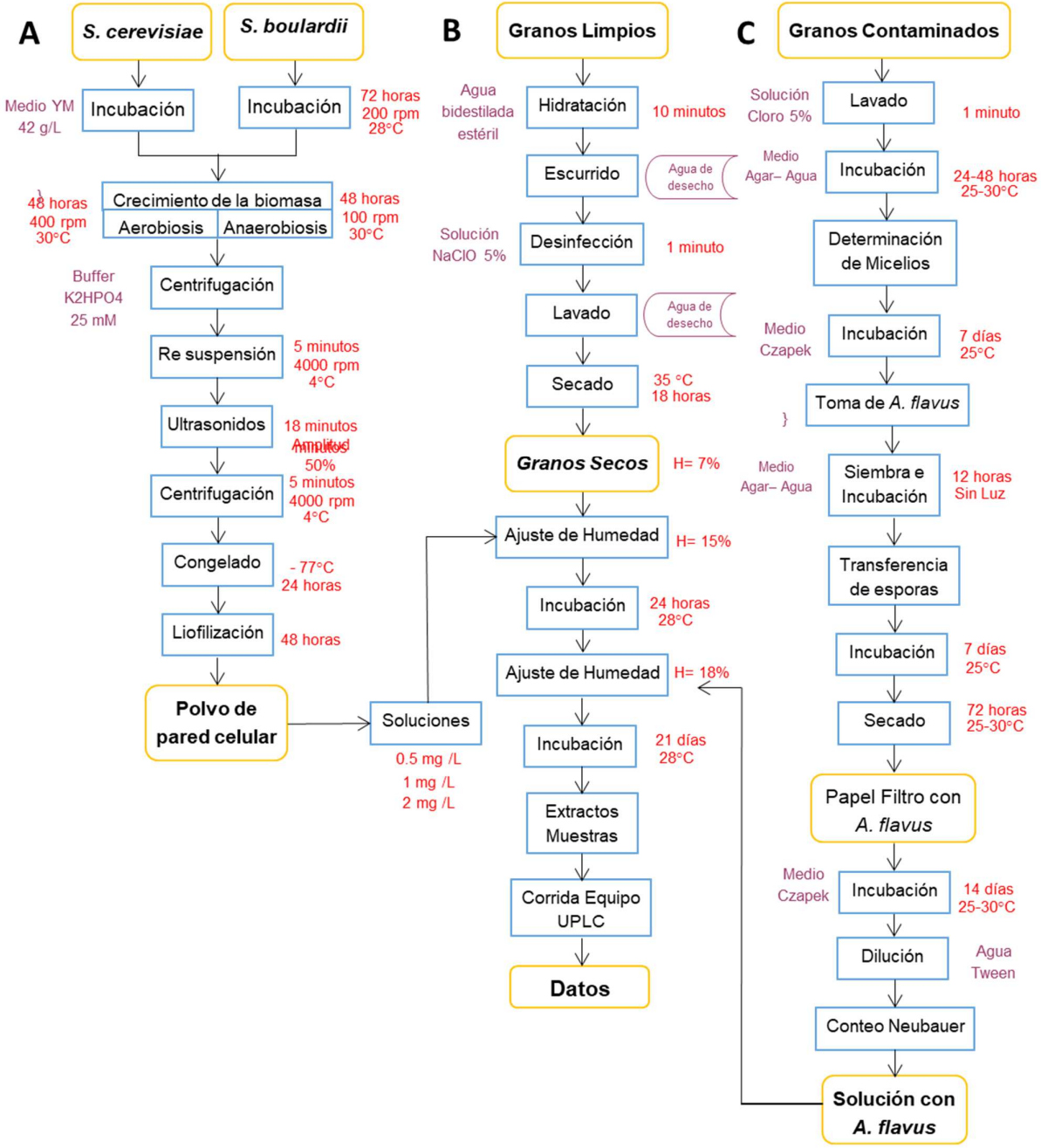


Figura 1 Diagrama de Flujo Obtención y Aplicación de Pared celular de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* sobre granos de maíz con *A. flavus*.

2.3. Obtención de la pared celular de las levaduras.

Un gramo de cada levadura liofilizada fue inoculado en un matraz de 500 mL con 200 mL de caldo de cultivo para levaduras (YM Broth, 500 g marca Himedia) a una concentración de 42 g/L (42 g de medio de cultivo por litro). Se dejó en el equipo de agitación (Thermo Scientific, EUA) durante 72 horas a 28 °C y a 200 rpm.

El crecimiento de biomasa se evaluó en dos condiciones: en un medio aerobio a 30 °C con agitación de 400 rpm y con alimentación de oxígeno al fondo del reactor, y en condiciones anaerobias a 30 °C con agitación de 100 rpm, ambas en un biorreactor/fermentador BIOSTAT® Aplus 2 L (Sartorius, Alemania). La densidad óptica se evaluó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10, Thermo Scientific, EUA) a 600 nm cada hora durante un día con un ajuste de densidad óptica inicial de 0.2.

2.4. Aplicación de ultrasonidos para la ruptura de la pared celular.

Para obtener la pared celular las levaduras fueron separadas del caldo por centrifugación (Eppendorf 5804R, EUA) durante 5 minutos a 4 °C y a 4000 rpm. Una vez recuperado el pellet de la levadura se re suspendieron 2 gramos de esta biomasa húmeda en 28 mL de buffer de ruptura (O_4K_2HP 25 mM) y se sonicaron con una amplitud del 50% (50 kHz) durante 18 minutos en un equipo sonicador (Sonicator Q500, Qsonica, EUA). Se tomaron muestras en tubos de 1.5 mL estériles (Eppendorf, USA) a los 3, 6, 12, 15 y 18 minutos, en condiciones asépticas y se sembraron en placas con medio YM para levaduras. Luego de la lisis celular, los pellets de ambas levaduras se sometieron a centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se almacenaron a - 77 °C durante 24 horas. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas durante 48 horas, obteniendo un polvo de pared celular listo para su uso.

2.5. Acondicionamiento de los granos de maíz.

El acondicionamiento del grano fue realizado con el procedimiento sugerido por Ponce García et al. (2018). Los granos de maíz (1.2 kg) fueron sumergidos en agua bidestilada estéril por 10 minutos y tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 1 minuto. A continuación, se lavaron 3 veces y se secaron en una estufa con recirculación de aire precalentado a 35 °C durante 18 horas hasta que el grano alcanzó una humedad de 7%.

2.6. Aplicación del tratamiento de pared celular liofilizada.

Se prepararon 24 frascos con 50 g de maíz acondicionados, se midió la humedad inicial y se determinó la cantidad de agua necesaria para ajustarla al 15% (Ecuación 1). Se evaluaron 8 muestras por triplicado distribuidas como sigue: a) una muestra de CP: control positivo (grano con hongo y sin tratamiento); b) una muestra de CN: control negativo (grano sin hongo ni tratamiento); c) 3 muestras con el tratamiento de pared celular de *S. cerevisiae* conteniendo 0.5 mg/kg (SC05), 1 mg/kg (SC1) y 2 mg/kg (SC2) y d) 3 muestras con el tratamiento de pared

celular de *S. bouldarii* conteniendo 0.5 mg/kg (SB05), 1 mg/kg (SB1) y 2 mg/kg (SB2). Los valores de pared celular usados en los tratamientos fueron los mismos propuestos por Morales (2007), puesto que estas concentraciones de pared celular son eficientes para la absorción de aflatoxinas.

(Ecuación 1)

$$mL \text{ de agua} = \frac{\text{Peso del maíz seco (\% H final deseada - \% H maíz seco)}}{(100 - \% H \text{ final deseada})}$$

Luego de 24 horas se reajustó la humedad de los granos de maíz de cada tratamiento hasta el 18% (Ecuación 1) con una solución de *Aspergillus flavus* de concentración conocida. Para determinar la cantidad de inóculo por mL de suspensión se utilizó la Ecuación 3, previo al conteo de células de *A. flavus* en una placa de Neubauer (Ecuación 2). Finalmente, se homogenizó de manera manual hasta que el agua fue absorbida por los granos de maíz y se almacenaron a 28 °C durante 7 días (Ponce-García et al. 2018).

(Ecuación 2)

$$CCM = \frac{\left[\left(\frac{\text{Células del cuadrante A} + \text{Células del cuadrante B}}{2} \right) \times (50) \times (50.000) \right]}{1'000.000}$$

$$mL \text{ de inóculo necesarios} = \frac{1000}{CCM} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde CCM es número de células de *A. flavus*.

Luego de 7 días los granos de maíz se lavaron tres veces con agua bidestilada estéril durante un minuto, se secaron en estufa con recirculación de aire y se molieron. Se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis.

2.7. Determinación de Aflatoxinas.

La extracción de las aflatoxinas de las muestras de maíz previo a su detección en un UPLC (Waters, Inglaterra), se realizó de acuerdo con el Kit de ELISA (Romer, México). Brevemente, se tomaron 10 g de cada muestra molida de maíz tratado y se diluyeron en 50 mL de metanol (70:30 v/v). Luego fueron licuadas por 3 minutos y filtradas con un filtro cualitativo grado 1 (WHATMAN®, España). Dos mL del filtrado fueron llevados a sequedad por evaporación a 45 °C durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se re-suspendieron en 2 mL de acetonitrilo grado HPLC, se agitaron en un vortex por 1 minuto y se sonicaron por 5 minutos. Finalmente, las muestras se volvieron a filtrar en un filtro para jeringa de 0.45 µm (LABOLAN,

España), y 5 μL de esta solución fueron inyectados al UPLC. Se cuantificó las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Crecimiento de la biomasa de las levaduras *S. cerevisiae* y *S. boulardii* bajo condiciones aerobias y anaerobias en biorreactores controlados.

Ambas levaduras fueron sometidas a un crecimiento controlado en biorreactores bajo condiciones aerobias y anaerobias. En la Figura 2 se presentan los resultados para *S. cerevisiae* (A) y *S. boulardii* (B).

Al comparar el crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae*, notamos que la diferencia entre condiciones aerobias y anaerobias no es significativa ($p > 0.5$). Los estudios de Otterstedt et al. (2004) revelan que un crecimiento controlado anaerobio produce hasta un 30% más biomasa que un crecimiento en condiciones aérobicas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en nuestro caso solo hubo un incremento del 5% de biomasa en condiciones aerobias. Hauf, Zimmermann y Muller (2000) explican que, debido al metabolismo de la levadura en medios ricos azucarados en condiciones aerobias, espontáneamente el proceso se vuelve anaerobio porque *S. cerevisiae* consume grandes cantidades de oxígeno el cual se agota rápidamente. Además, con el crecimiento de biomasa se producen grandes cantidades de CO₂ el cual desplaza el oxígeno disponible hacia la atmósfera, dificultando su disolución y contribuyendo a una fermentación anaeróbica (Otterstedt et al., 2004).

En cuanto a la fase estacionaria del crecimiento de las levaduras, Buitrago-Estrada y Tenjo-Camacho (2007) determinaron que *S. cerevisiae* alcanzó esta fase luego de 16 horas de incubación, utilizando como medio de cultivo el caldo YGC a una concentración de 20 g/L. Mientras que Aguilar et al. (2015) observaron que la fase estacionaria se alcanzó luego de 8 horas de incubación en el mismo medio. En nuestro caso dicha fase se alcanzó luego de 7.5 horas, aunque cabe mencionar que utilizamos medio YGC, pero con una concentración de 40 g/L. Las diferencias en estos tiempos pueden deberse a los azúcares del medio de cultivo utilizado en cada caso, así como la concentración inicial de levaduras y las condiciones de crecimiento.

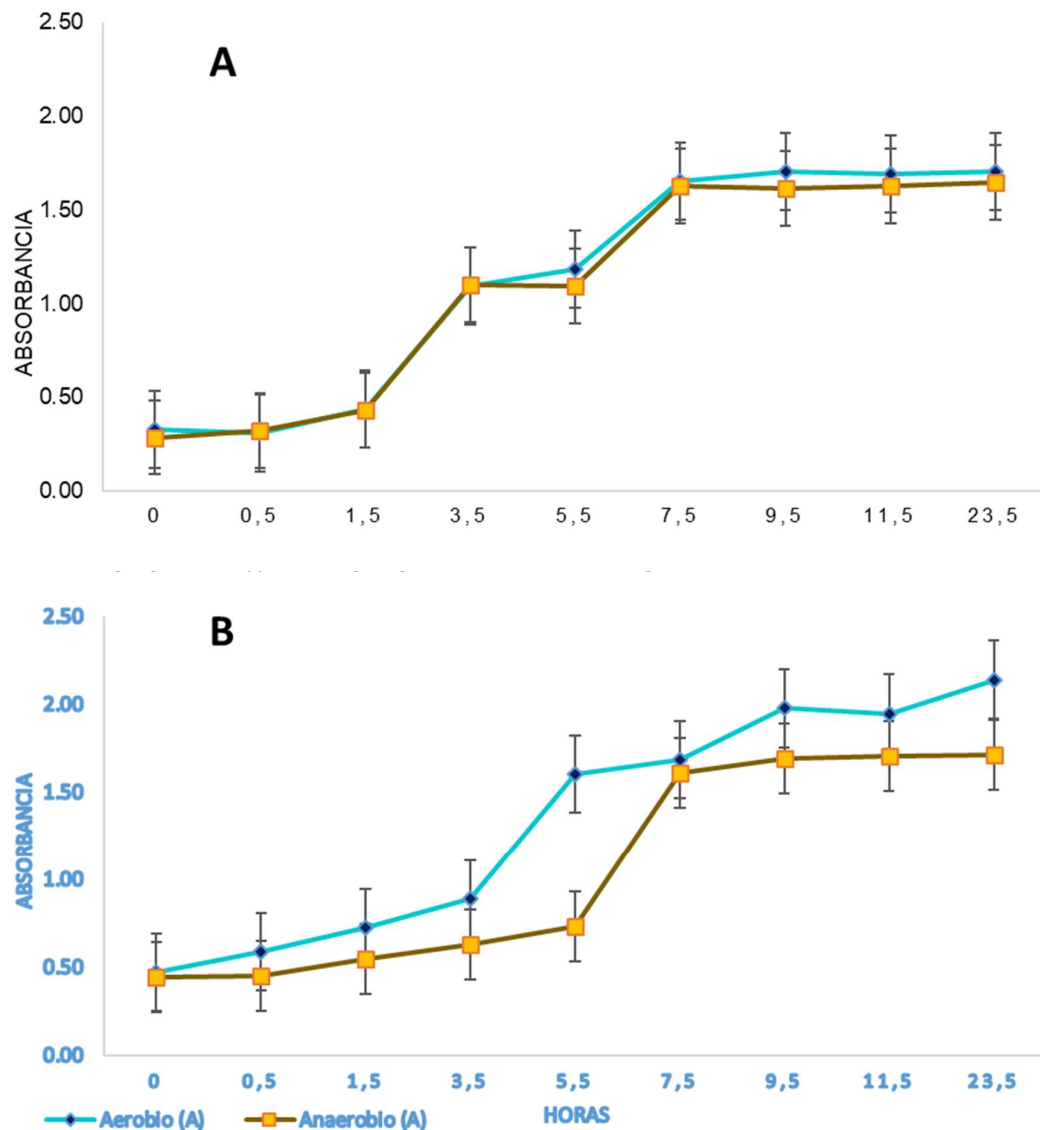


Figura 2 Crecimiento de Biomasa. Figura A: Crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae* en condiciones aerobias y anaerobias; Figura B: Crecimiento de biomasa de *S. boulardii* en condiciones aerobias y anaerobias.

Los datos son medias \pm desviación estándar de dos réplicas. Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente distintos ($p < 0.05$). La comparación de medias se realizó con una prueba HSD de Tukey-Kramer.

En el caso de *S. boulardii* se observó una diferencia significativa en el crecimiento de biomasa ($p < 0.05$) (Figura 2). En condiciones aerobias se obtuvo un 20% más de biomasa que en condiciones anaerobias. Por otro lado, la fase estacionaria en condiciones anaerobias se alcanzó a partir de las 7.5 horas. Mientras que la fase estacionaria en condiciones aerobias no fue alcanzada incluso hasta cumplir las 24 horas de fermentación. Esto resultados

coinciden con los presentados por Chin et al. (2015), quienes cultivaron *S. boulardii* en condiciones aerobias, sin alcanzar la fase estacionaria dentro de las 24 horas de fermentación. Por lo que, el crecimiento aerobio es el indicado para para obtener la mayor biomasa de esta levadura. Cabe señalar que el experimento se realizó durante 24 horas ya que, tiempos superiores producen grandes cantidades de alcohol, obteniendo resultados desfavorables y afectando el costo del crecimiento de levadura y la producción de biomasa (Chin et al., 2015).

3.2. Efecto de la aplicación de ultrasonidos para la ruptura de la pared celular de *S. cerevisiae* o *S. boulardii*, evaluando diferentes tiempos de exposición.

Tabla 1. Tiempo de sonicación vs ruptura de pared celular de *S. cerevisiae* o *S. boulardii*

Tratamientos ¹	Tiempo	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. boulardii</i>	
	Minutos	ufc/g		ufc/g	
T1	3	MNPC ²	MNPC	MNPC	MNPC
T2	6	95	108	245	189
T3	9	38	45	108	99
T4	12	20	18	34	31
T5	15	13	10	12	12
T6	18	2	0	0	1

¹T= tiempo de exposición a ultrasonidos en minutos a una intensidad de 50KHz

² MNPC muy numerosas para ser contadas

Los valores de tiempo necesarios para lograr la ruptura celular de las dos levaduras se presentan en la Tabla 1. Se determinó que el tratamiento más efectivo fue con una exposición de 18 min. Los procesos de cavitación con frecuencias entre 18 y 100 kHz provocan cambios de presión y temperatura, causando la ruptura de la pared celular (Pérez- Rodríguez y Pérez-Azahuanche, 2019; Ercan y Soysal, 2013). Por otro lado, Pérez-Rodríguez y Pérez-Azahuanche, (2019) determinaron que con una sonicación de 40 kHz el tiempo ideal de exposición es de 30 minutos en baño ultrasónico; sin embargo, con una mayor amplitud el tiempo de ruptura disminuye.

3.3. Cuantificación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 mediante UPLC.

El resultado de la cuantificación de los 4 tipos de aflatoxinas analizadas en los granos de maíz control y tratados con las diferentes soluciones de pared celular de las levaduras *S. boulardii* y *S. cerevisiae* se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en granos de maíz tratadas con soluciones de pared celular de *S. cerevisiae* o *S. boulardii*.

Muestras ¹	Aflatoxinas (ppm/g)				
	B1	B2	G1	G2	Total
CN	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CP	46.00 ± 9.89 ^a	1.90 ± 0.55 ^a	16.80 ± 10.59 ^a	1.98 ± 0.47 ^a	65.50 ± 21.70 ^a
SC05	11.30 ± 7.63 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	1.21 ± 1.16 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	12.50 ± 8.04 ^b
SC1	6.77 ± 4.05 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^b	1.33 ± 1.13 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	8.10 ± 5.18 ^b
SC2	5.90 ± 0,81 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^b	0.88 ± 0.09 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	6.78 ± 0,87 ^b
SB05	2.88 ± 2.23 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^b	0.40 ± 0.49 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	3.27 ± 2.69 ^b
SB1	8.28 ± 0.57 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^b	1.63 ± 0.29 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	9.90 ± 0.73 ^b
SB2	7.17 ± 3.02 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^b	1.93 ± 1.74 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	9.53 ± 5.32 ^b

¹Tratamientos: CN Control Negativo (sin hongo ni tratamiento), CP: Control Positivo (con hongo y sin tratamiento); SC05; con pared celular de *S. cerevisiae* conteniendo 0.5 mg/kg; SC1 con pared celular de *S. cerevisiae* conteniendo 1 mg/kg; SC2: con pared celular de *S. cerevisiae* conteniendo 2 mg/kg; SB05: con pared celular de *S. boulardii* conteniendo 0.5 mg/kg ; SB1: con pared celular de *S. boulardii* conteniendo 1 mg/kg y SB2: con pared celular de *S. boulardii* conteniendo 2 mg/kg.

Los datos son medias ± desviación estándar de tres réplicas. Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente distintos ($p < = 0.05$). La comparación de medias se realizó con una prueba HSD de Tukey-Kramer.

El tratamiento con *S. boulardii* en concentración 0.5 mg/kg presentó una alta variabilidad (Tabla 2). Sin embargo, los valores de reducción alcanzado por este tratamiento fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) que CP. Un comportamiento similar en la reducción de las aflatoxinas totales fue observado en los restantes tratamientos, registrándose una reducción muy marcada en todos estos, con valores mayores al 80%. Cuando se compararon los tratamientos con los porcentajes por tipo de aflatoxinas presentes inicialmente en CP, las aflatoxinas B2 y G2 fueron indetectables, mientras que la aflatoxina B1 y G1 disminuyeron sobre el 75% de la carga inicial registrada. CP presentó valores del 70% para aflatoxinas B1, de un 25% de G1, y de menos del 5% para la suma de las aflatoxinas B2 y G2. De acuerdo con Serrano-Coll y Cardona-Castro, (2015) la aflatoxina B1 es la toxina más producida por el hongo *Aspergillus flavus*, lo cual concuerda con los datos obtenidos aquí.

De esta manera, podemos determinar que una concentración mayor al 0.5 mg/kg de pared celular, de cualquiera de las levaduras, adicionadas al grano de maíz posterior a su contaminación con el hongo y previo lavado antes de su determinación, sería adecuado para

la reducción de aflatoxinas en granos de maíz contaminados a cantidades reportadas como adecuadas para consumo humano. De acuerdo con la FAO (2003) el límite para aflatoxinas totales en alimentos en Latinoamérica es de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por otro lado, Fochesato et al. (2020) determinó que mientras mayor sea el contenido de pared celular de *S. cerevisiae*, mayor es la capacidad de eliminar la aflatoxina B1 en medios de cultivo. Sin embargo, las cantidades finales de aflatoxina presentes en los diferentes tratamientos (concentraciones y tipo de levaduras) aplicados en la presente tesis no fueron significativamente diferentes (Tabla 2).

Por otro lado, la pared de *S. cerevisiae* es utilizada para la inhibición de aflatoxinas en piensos elaborados con granos contaminados. Concentraciones de 1 y 2 mg/kg de pared celular de *S. cerevisiae* son capaces de reducir la absorción de aflatoxinas a escala digestiva en pollos de engorde alimentados con piensos contaminados (Morales., 2007). Para este fin, la pared celular de la levadura es mezclada con los granos previo a la ingesta del pienso por el animal. Esto supone una diferencia con los procedimientos realizados en la presente investigación, ya que, la pared celular en este caso es adicionada al grano previo su inoculación con el hongo, y posterior lavado de los granos antes de su cuantificación. Esto provoca el arrastre de las aflatoxinas encapsuladas en los componentes de la pared celular evitando el ingreso de estos componentes al tracto digestivo. Ciertamente, esta eliminación de las aflatoxinas en el agua de lavado es importante para el tratamiento de granos destinados para consumo humano. Además, cabe recalcar aquí, que *S. boulardii* es un microorganismo seguro considerado un probiótico y lo más importante, apto para consumo humano (Lazo-Vélez et al. 2018). Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos la pared de *S. boulardii* puede ser usada para la reducción de la carga de aflatoxinas en granos de maíz, al igual que la pared de *S. cerevisiae* la cual es ampliamente usada en piensos contaminados con estas aflatoxinas.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que la pared celular de *S. boulardii* inhibe las aflatoxinas de maíz inoculado con *A. flavus* a niveles comparables con *S. cerevisiae*. Esta inhibición se logró con una pared celular obtenida a partir de las levaduras que crecieron en condiciones aerobias y su posterior sonicación a 50 KHz por 18 minutos. Los tratamientos sobre 0.5 mg/kg de la pared celular de ambas levaduras reducen sobre el 75% de la carga de aflatoxinas, indicando que el uso de estas paredes durante el almacenamiento del grano y posterior lavado del mismo, antes del consumo, podría ayudar a minimizar la carga de estas toxinas en granos de cereales a valores inferiores a los recomendados para consumo humano. Además, considerando que la *S. boulardii* es un microorganismo GRAS podría recomendarse este tratamiento para el acondicionamiento del grano previo al consumo humano. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* para poder determinar el efecto de estos granos, así tratados, en el organismo.

REFERENCIAS

- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Tacanga, D., 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.
- Arteaga, E., Torres, L. y Tobalina, C. (2004). Análisis de la cadena productiva y comercializadora del maíz y como fuente de exportación. tesis [en línea]. Escuela Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Boukaew, S., Petlamul, W. Prasertsan, P. (2020). Efficacy of *Streptomyces philanthi* RL-1-178 culture filtrate against growth and aflatoxin B1 production by two aflatoxigenic fungi on maize seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 1041–1051. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01955-5>.
- Buitrago-Estrada, J.C., Tenjo-Camacho, D. (2007). Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libre de *Saccharomyces Cerevisiae*, tesis [en línea]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota Colombia.
- Chin, T. S., Othman, Z., Malek, R. A., Elmarzugli, N., Leng, O. M., Ramli, Musa, N., Aziz, R., S., El Enshasy, H. (2015). Bioprocess optimization for biomass production of probiotics yeast *Saccharomyces boulardii* in semi-industrial scale. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), 122–132.
- Ercan, S.S, Soysal, C. (2013). Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science* 5(8A2), 5–13. <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2013.58A2002>.
- Escalona, A. (2009). Micotoxinas. El Cid Editor | apuntes. pp. 1–15.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2003). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. [http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e05.htm#TopOfPage\[CQ1](http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e05.htm#TopOfPage[CQ1)
- Fochesato, A. S., Cristofolini, A., Poloni, V. L., Magnoli, A., Merkis, C. I., Dogi, C. A., Cavaglieri, L. R. (2020). Culture medium and gastrointestinal environment positively influence the *Saccharomyces cerevisiae* RC016 cell wall polysaccharide profile and aflatoxin B1 bioadsorption. *LWT - Food Science and Technology*, 126, 109306 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109306>
- Frazier, W. C., Westhoff, D. C. (1993). Microbiología de los alimentos (4th ed.). Zaragoza: Editorial Acribia. <http://148.206.53.233/tesiuami/Libros/L33.pdf>.
- Gómez, A. (2017). Alimentos y micotoxinas: implicaciones en la seguridad alimentaria. *Nutrifarmacia*, 21 (8), pp. 49–53.

- Hauf, J., Zimmermann, F.K., Muller, S. (2000). Simultaneous genomic over expression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbiol Technology*, 26, 688–698. doi:10.1016/s0141-0229(00)00160-5.
- Jouany, J.-P., Yiannikouris A., Bertin, G. (2005). The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archivos de Zootecnia*, 8, 26–50.
- Lazo-Vélez, M. A., Serna-Saldívar, S. O., Rosales-Medina, M. F., Tinoco-Alvear, M., Briones-García, M. (2018). Application of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* in food processing: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 943–951. <https://doi.org/10.1111/jam.14037>.
- Martínez-Padrón, H. Y., Hernadéz-Delgado, S.J., Reyes, C. A., Carrillo, G. V. (2013). The genus *Aspergillus* and their mycotoxins in maize in Mexico: problems} and perspectives. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126–146. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=98738733&lang=hu&site=ehost-live>
- Martínez-Larrañaga, M.R. y Anadón, A, (2006). Micotoxinas. En Cameán, A.M. & Repetto (Ed.), *Toxicología alimentaria* (pp. 289-305). ISBN: 84-7978-727-9. Díaz de Santos. Madrid-Buenos Aires
- Morales López, R. (2009). Las paredes celulares de levadura *Saccharomyces Cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde, tesis [en línea]. Universidad Autónoma De Barcelona, Barcelona, España. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5689/rml1de1.pdf>
- Muñoz de Malajovich, M.A. (2012) *Biotecnología*. 2a ed., Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina, pp 1-44. https://www.academia.edu/41573207/Biotecnologia_2ed_esp_Maria_Antonia_Munoz_Malajovich
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L. (2004). Switching the Mode of Metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports*, 5,522–537, doi:10.1038/sj.embor.7400132.
- Pérez-Rodríguez, C.V., Pérez-Azahuanche, F.R., (2019). Efecto del tiempo de exposición al ultrasonido y la temperatura en las propiedades fisicoquímicas, contenido de vitamina C y recuento de mohos y levaduras del mesocarpio de “Zarzamora” *Rubus Floribundus* Kunth (Rosaceae). *Arnaldoa*, 26(1), 297–304, <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26113>.
- Ponce-García, N., Serna-Saldívar, S.O., García-Lara S. (2018). Manejo, preparación y conservación de cepas de *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides* e inoculación de granos de maíz para producción de aflatoxinas y fumonisinas. *Tecnológico de Monterrey*. pp. 1–42. Monterrey, México.

- Pontonioa, E., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., Dousset, X., Clément, H., Filannin, P., Onno, B., Gobbettia, M. (2016). How organic farming of wheat may affect the sourdough and the nutritional and technological features of leavened baked goods. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.013>
- SAGARPA (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación). (2017). Planificación Agrícola Nacional 2017-2030. 1,1–22. <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/planeacion-agricola-nacional-2017-2030-126813>
- Serrano-Coll, H.A., Cardona-Castro, N. (2015). Mycotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Revista CES Medicina*, 29(1), 143–152.
- Tomičić, M., Čolović, R., Čabarkapa, I., Vukmirović, Đ., Đuragić, O., Tomičić, R. (2016). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43(2), 103–110. doi:10.5937/FFR1602103T.
- Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simioli, M., Rizzi, L. (2005). Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs and aflatoxin B1 levels in liver. *Poultry Science*, 84, 825–832. <https://academic.oup.com/ps/article-abstract/84/6/825/1603349>.
- Zolfaghari, H., Khezerlou, A., Ehsani, A., Khosroushahi, A.Y. (2020). Detoxification of aflatoxin B1 by probiotic yeasts and bacteria isolated from dairy products of Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 482–487. doi:10.34172/apb.2020.060.