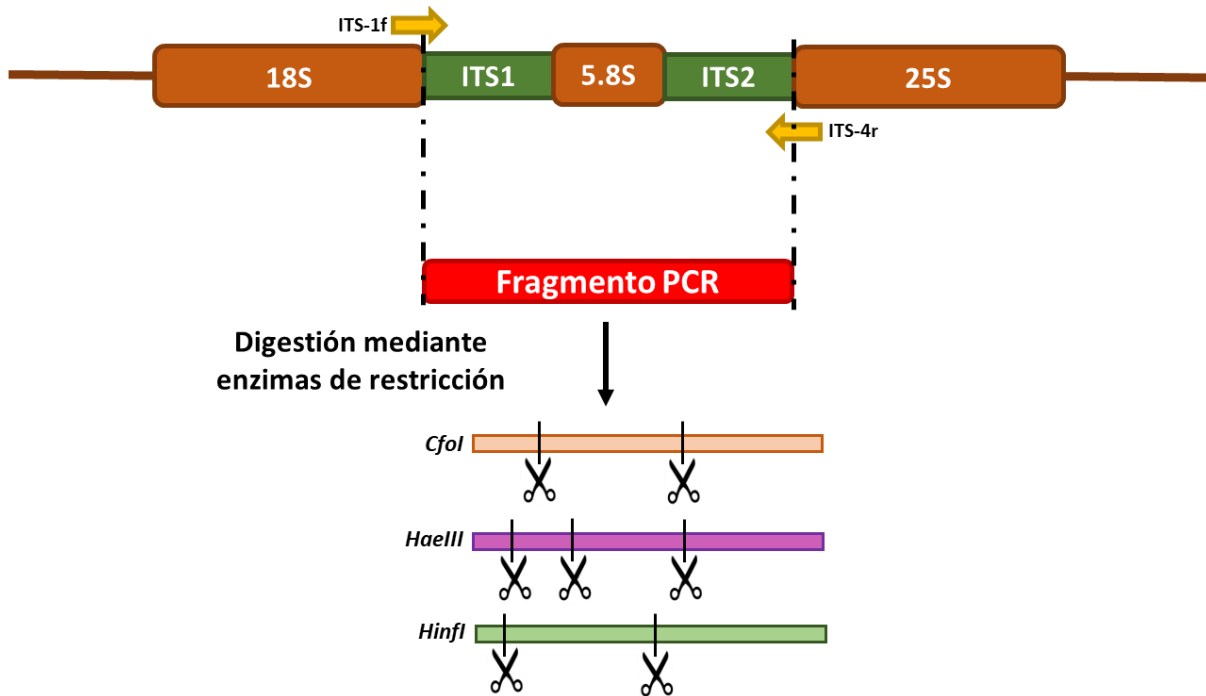
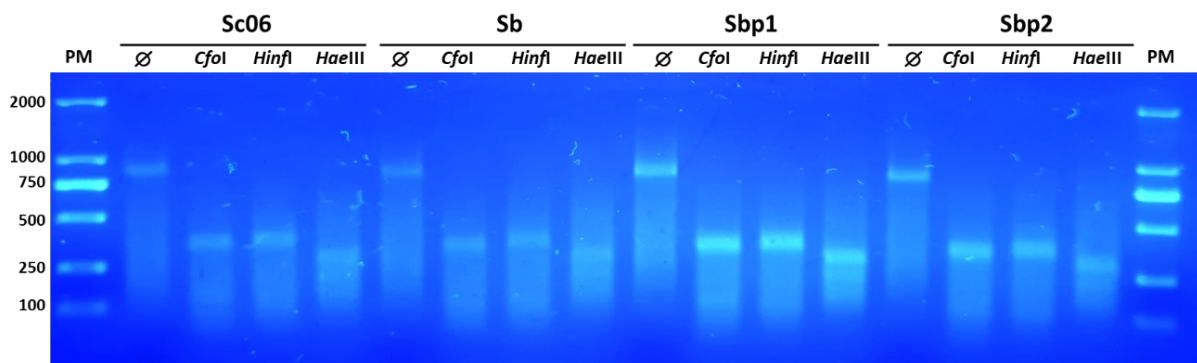


8. Anexos.

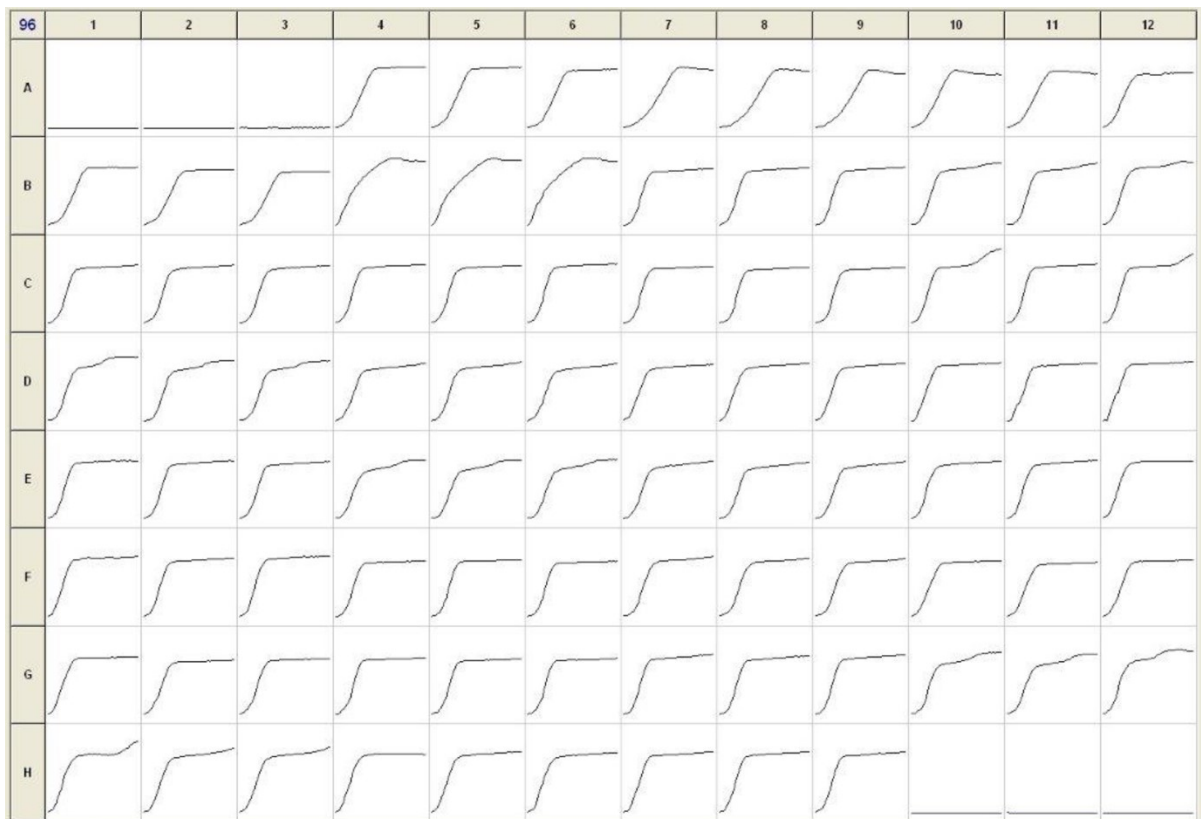
Anexo 1. Objetivo de Desarrollo Sostenible 3 Salud y Bienestar. Este trabajo se relaciona con el objetivo de desarrollo sostenible 3 salud y bienestar de la agenda de 2030 ya que la intención del trabajo es la de evaluar cepas con potencial probiótico que puedan actuar para la obtención de un beneficio en la salud humana.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

A**B**

Anexo 2. Perfil de fragmentos de restricción de la región ITS del rDNA de colonias aisladas de Ultra-Levura®. (A) Esquema de amplificación del rDNA de levadura: Tras la extracción del DNA de Sc06 (como control de *S. cerevisiae*), de la cepa colección *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Sb) y de dos colonias aisladas de la cápsula probiótica (Sbp1 y Sbp2), se amplificó por PCR su región ITS. (B) Los fragmentos se digirieron con las enzimas de restricción mencionadas en la imagen y los productos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El tamaño de cada fragmento se estimó por comparación con los de un marcador de peso molecular conocido, el cual se muestra en los extremos del gel.

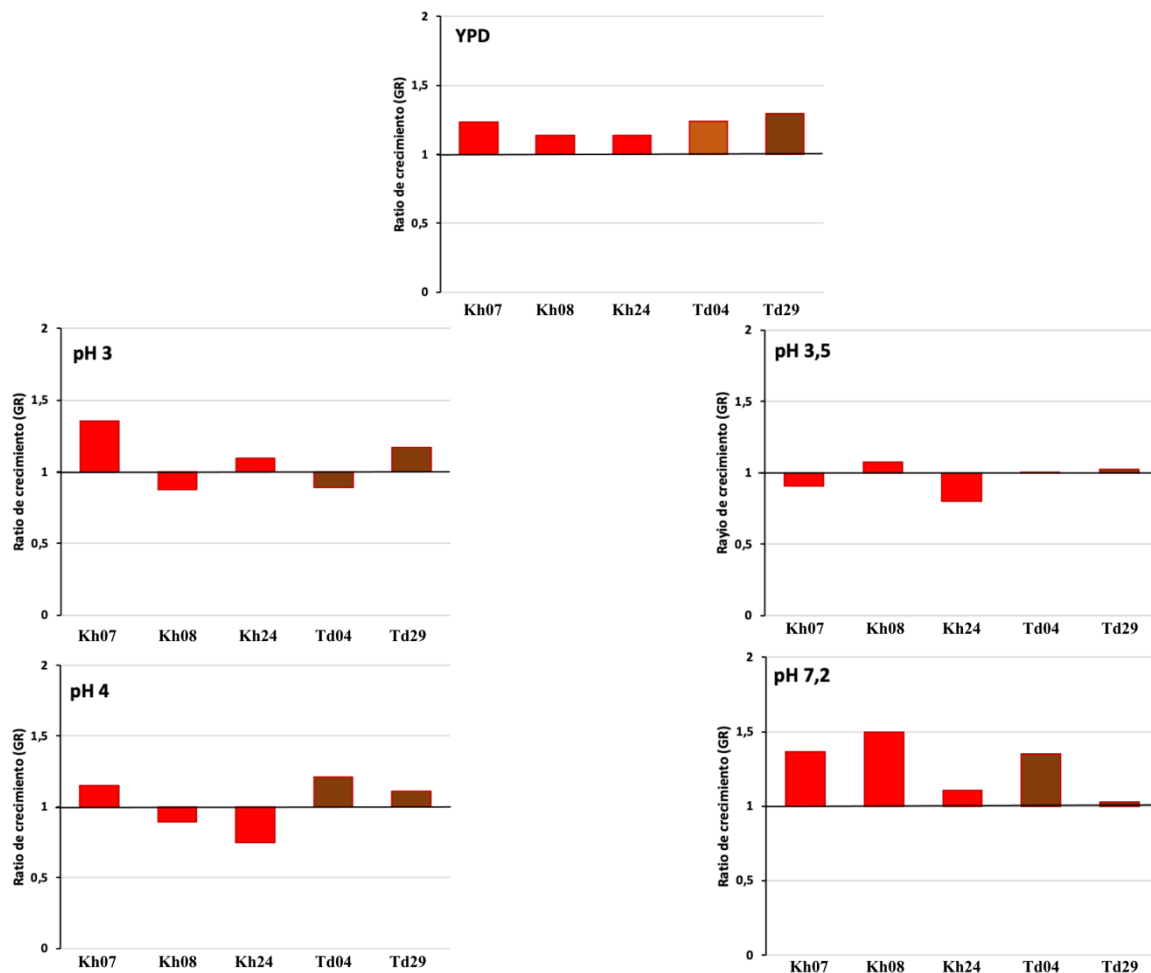
El patrón de fragmentos de restricción es igual en las cuatro cepas analizadas, verificando que los aislados pertenecen a la misma especie (*S. cerevisiae*). Para determinar con exactitud si son var. *boulardii* se ha enviado el fragmento de ITS amplificado, al servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia.



Anexo 3. Curvas de crecimiento aislados de masas madre a diferentes pHs. Ejemplo del seguimiento del crecimiento de las levaduras en un lector de placas microtiter (Polarstar). Posteriormente los datos se procesaron en Excel para calcular la pendiente, del tramo lineal de cada curva (μ) y con ello, el tiempo de generación.

Anexo 4. Peso seco de cada cepa de levadura.

Cepa	Peso seco (mg/uOD₆₀₀)
Sbp	0,210
Sb	0,253
Sc06	0,333
Sc13	0,337
Sc16	0,359
Sc31	0,432
Sc51	0,320
Sc121	0,316
Sc129	0,354
Sc132	0,284
Td04	0,386
Td29	0,363
Kh07	0,308
Kh08	0,290
Kh24	0,286
Pa	0,421
Wa	0,432



Anexo 5. Comparación del crecimiento a diferentes pHs de aislados de masa madre frente a la cepa control.

Tras registrar la Abs_{600} de cultivos en YPD a diferentes pHs, incubados a 30°C durante 24 h, se calculó el ratio de crecimiento de cada cepa frente al control en las mismas condiciones de cultivo. En naranja se representan los valores para las cepas *K. humilis* indicadas en la figura y en marrón las correspondientes a las cepas de *T. delbrueckii*.

Los aislados testados muestran un nivel de crecimiento similar a la cepa control (Sb) en medio YPD y a pH ácidos, sólo la cepa Kh24 mostró una ligera sensibilidad en estas condiciones de estrés. Curiosamente, todas las levaduras, excepto Td29, alcanzaron una Abs_{600} mayor que el control a pH 7,2. Con este experimento, se ha comprobado que el defecto de crecimiento descrito en la Figura 6 responde a la temperatura de incubación utilizada.