



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Caracterización de la potencial capacidad probiótica de
aislados de levadura de masas madre

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Madroñal Galán, Carlos

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Cotutor/a externo: RANDEZ GIL, FRANCISCA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**“CARACTERIZACIÓN DE LA POTENCIAL
CAPACIDAD PROBIÓTICA DE AISLADOS DE
LEVADURA DE MASAS MADRE”**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica

i del Medi Natural

Trabajo Final de grado

Titulación: Biotecnología

Curso académico: 2022-2023

Convocatoria: Valencia, 3 de julio de 2023

Autor: Carlos Madroñal Galán

Tutor experimental: Dra. M^a Francisca Rández Gil

Tutor académico: Dr. Sergio González Nebauer



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Este trabajo está bajo una licencia Creative Commons; Reconocimiento-No Comercial - Sin
Obra Derivada 4.0 Internacional.



Resumen:

El interés hacia productos que contienen probióticos está en auge debido a su gran potencial beneficioso para la salud del hospedador, de ahí, la búsqueda de nuevos microorganismos con capacidad probiótica. Hay que tener en cuenta que el microbioma humano no solo consiste en especies bacterianas, sino que también actúan un gran número de levaduras implicadas en la homeostasis gastrointestinal.

El principal objetivo del proyecto es seleccionar cepas de levadura aisladas de ambientes naturales con capacidad probiótica para su aplicación como probiótico en alimentos funcionales. Concretamente en este trabajo nos hemos centrado en caracterizar diferentes cepas de levadura, específicamente 15 cepas procedentes de masas madre, utilizando como cepa control *Saccharomyces boulardii* (una levadura de conocida actividad probiótica). Para ello, se analizaron diferentes parámetros fisiológicos, entre ellos, su crecimiento a distintas temperaturas, incluida 37°C, la resistencia a antibióticos, la tolerancia a diferentes pHs, la capacidad de formación de biopelículas y la sensibilidad al paso gastrointestinal. Para completar la caracterización se estimó la hidrofobicidad de cada levadura, su capacidad antioxidante.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la agenda 2030: 3 Salud y bienestar (**Anexo 1**).

Título: Caracterización de la potencial capacidad probiótica de aislados de levadura de masas madre.

Palabras clave: Masas madre; Levadura; Probiótico; Actividad antioxidante; Caracterización.

Tutor académico: Dr. Sergio González Nebauer.

Tutor externo: Dra. M^a Francisca Rández Gil.

Autor: Carlos Madroñal Galán.

Valencia, 3 de Julio, 2023.

Abstract:

The interest in products that contain probiotics is growing due to their great beneficial potential for the health of the host, hence the search for new microorganisms with probiotic capacity. It must be taken into account that the human microbiome not only consists of bacterial species, but there are plenty of yeast which are involved in holding up the gastrointestinal homeostasis.

The project's main goal is to select yeast strains which reveal probiotic capacity, isolated from different natural environments for their application in functional foods as probiotic products. Specifically in this work we were focused on characterizing different yeast strains, to be precise 15 strains isolated from sourdough, using *Saccharomyces boulardii* (well known yeast due its probiotic properties) as control. In order to reach this objective, we analyzed different physiological parameters such as the growth at different temperatures, antibiotic resistance, tolerance to pHs, the biofilm formation capacity and sensibility to gastrointestinal transit. To complete the characterization, hydrophobicity and the antioxidant capacity of each yeast have been calculated.

This work is linked with the following SDG from the 2030 agenda: 3 Good health and well-being (**Anexo 1**).

Title: Characterization of the potencial probiotic capacity of yeast isolates sourdough.

Key words: Sourdough; Yeast, Probiotic, Antioxidant activity; Characterization.

Academic tutor: Dr. Sergio González Nebauer.

Experimental tutor: Dra. M^a Francisca Rández Gil.

Author: Carlos Madroñal Galán.

Valencia, 3rd July, 2023.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
3. Materiales y métodos.....	4
3.1. Procedencia de las cepas de levadura.....	4
3.2. Determinación del peso seco.....	5
3.3. Crecimiento a temperatura corporal humana.....	6
3.4. Resistencia a antibióticos.....	6
3.5. Capacidad de formación de biopelículas.....	6
3.6. Hidrofobicidad.....	7
3.7. Tolerancia a diferentes pHs.....	7
3.8. Tolerancia a ácidos.....	8
3.9. Resistencia al paso por el tracto gastrointestinal.....	8
3.10. Capacidad antioxidante.....	8
3.11. Análisis estadístico.....	10
4. Resultados y discusión.....	10
4.1. Crecimiento a temperatura corporal humana.....	10
4.2. Resistencia a antibióticos.....	11
4.3. Capacidad de formación de biopelículas.....	13
4.4. Hidrofobicidad.....	16
4.5. Tolerancia a diferentes pHs.....	17
4.6. Tolerancia a ácidos.....	21
4.7. Resistencia al paso por el tracto gastrointestinal.....	22
4.8. Capacidad antioxidante.....	23
5. Conclusiones.....	25
6. Bibliografía.....	25
7. Anexos.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento a diferentes temperaturas de aislados de masa madre.....	11
Figura 2. Crecimiento de levaduras en presencia de antibióticos.....	12
Figura 3. Comparación de la tolerancia a antibióticos de levaduras convencionales y no-convencionales.....	13
Figura 4: Comparación de la morfología de colonia de aislados de masa madre de <i>S. cerevisiae</i> en medios con bajo contenido de agar.....	14
Figura 5: Morfología de colonias de aislados de masa madre en medios con bajo contenido de agar.....	15
Figura 6: Tolerancia a diferentes pHs de aislados de masa madre.	18
Figura 7: Tolerancia a diferentes pHs de cepas de los géneros <i>Kazachstania</i> y <i>Torulaspóra</i> a temperatura permisiva.....	19
Figura 8: Comparación del crecimiento a diferentes pHs de aislados de masa madre frente a la cepa probiótica control.....	20
Figura 9: Tolerancia a ácidos de aislados de masa madre.	21
Figura 10: Comparación del crecimiento en presencia de ácidos orgánicos de aislados de masa madre frente a la cepa probiótica control.....	22
Figura 11: Tolerancia al paso por el tracto gastrointestinal de aislados de masa madre.....	23
Figura 12: Capacidad antioxidante de aislados de masa madre.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen de las cepas empleadas.....	5
Tabla 2. Ejemplos de ploidías de otras cepas aisladas	15
Tabla 3. Índice de hidrofobicidad de aislados de masa madre.....	16

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Objetivo de Desarrollo Sostenible 3 Salud y Bienestar.....	33
Anexo 2. Curvas de crecimiento aislados de masas madre a diferentes pHs.....	34
Anexo 3. Perfil de fragmentos de restricción de la región ITS del rDNA de colonias aisladas de Ultra-Levura®.....	35
Anexo 4. Peso seco de cada cepa.....	36
Anexo 5. Comparación del crecimiento a diferentes pHs de aislados de masa madre frente a la cepa control.....	37

Abreviaturas

Abs = Absorbancia.

CSIC = Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

DO₆₀₀ = Densidad óptica a 600nm.

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

EC50 = 50 % de la concentración efectiva máxima.

EFSA = Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Eu = Europa.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

GR = Ratio de crecimiento.

IATA = Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

IFIC = Consejo Internacional de Información Alimentaria.

ISAPP = International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics.

MATS = Microbial Adhesion To Solvents.

NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards.

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS = Tampón Salino Fosfato.

p.e. = Por ejemplo.

p.s. = Peso seco.

SCFA = Ácidos grasos de cadena corta.

SEMIPyP = Sociedad Española de Microbiota Probióticos y Prebióticos.

TEAC = Trolox Equivalents Antioxidant Capacity.

Tg = Tiempo de generación.

UV-VIS = Ultravioleta-Visible.

1. Introducción.

La microbiota humana se define como el conjunto de microorganismos que viven en la superficie y el interior de nuestro cuerpo. Estos microorganismos están muy involucrados en la acción de desintoxicación, respuestas inmunológicas y en la fisiología humana (D'Argenio and Salvatore, 2015). En el tracto gastrointestinal humano, la microbiota está representada por alrededor de 1.000 especies bacterianas. Los hongos también están presentes pero en un porcentaje muy bajo (<0,1 %) (Każmierczak-Siedlecka *et al.*, 2020), siendo especies de *Candida* y *Saccharomyces* las más habituales (Murkejee *et al.*, 2015). Esta microbiota tan compleja es reconocida como un elemento activo de la fisiología intestinal, con múltiples funciones, siendo las principales: funciones metabólicas, de efecto barrera y tróficas. Su composición se ve condicionada por numerosos factores (p.e. estilo de vida, edad, dieta, consumo de antibióticos o fármacos) y cualquier desequilibrio de su biodiversidad y riqueza (disbiosis) puede causar enfermedades importantes, entre ellas, atopias, síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias, cáncer e incluso algunos trastornos de la conducta (Butel, 2014; Álvarez *et al.*, 2021).

El concepto de consumo oral de microorganismos como un medio para inducir beneficios para la salud ha intrigado a los humanos durante siglos. El término 'probióticos' apareció por primera vez en este contexto en 1974 y ha evolucionado conceptualmente hasta su definición actual como microorganismos vivos que confieren un beneficio para la salud cuando se consumen en cantidades adecuadas, sugerida por la FAO/OMS en 2002 (Suez *et al.*, 2019, Pineiro *et al.*, 2008) y aceptada y recogida en los consensos de la Asociación Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMIPyP) y la International Society for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) en el año 2014 (Hill *et al.*, 2014). Esta definición implica que la viabilidad y efecto beneficioso de los probióticos debe asegurarse hasta alcanzar su lugar de interacción con el hospedador. A su vez, esta definición diferencia con claridad a los probióticos de prebióticos o postbióticos, también utilizados para modificar la composición de la microbiota intestinal. Recientemente, el concepto de prebiótico ha sido revisado y definido por la ISAPP como “un sustrato que es selectivamente utilizado por microorganismos del hospedador y confiere beneficios para la salud” (Gibson *et al.*, 2017). Por su parte, los postbióticos hacen referencia a los microorganismos muertos, sus componentes o sustancias producidas por probióticos (Salminen *et al.*, 2021).

En las últimas décadas, el desarrollo de microorganismos probióticos, su producción y comercialización están en constante crecimiento siendo uno de los complementos alimenticios más consumidos en todo el mundo. En efecto, los preparados dispensados en farmacias españolas representaron ventas que ascendieron a 7,9 millones de euros en el mes de febrero de 2023 (IQVIA.com, 2023) y su utilización para desarrollar alimentos funcionales no para de crecer. Aunque no existe un consenso para definir

estos alimentos, el Consejo Internacional de Información Alimentaria (IFIC), establece que son: alimentos que pueden proporcionar beneficios para la salud más allá de la nutrición básica (Longoria-García *et al.*, 2018). De hecho, alimentos como el yogur, el queso, los helados, los snacks, los cereales para el desayuno y las fórmulas infantiles se complementan con probióticos (Suez *et al.*, 2019), debido a su impacto positivo en la salud humana (Álvarez *et al.*, 2021).

Numerosos datos clínicos confirman los efectos profilácticos y terapéuticos de los probióticos en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (trastornos gastrointestinales, eliminación de *Helicobacter pylori*, diarreas) y de numerosas infecciones respiratorias y urogenitales (Markowiak-Kopeć and Śliżewska, 2017; Mallappa *et al.*, 2019). Además, los probióticos juegan un papel importante en las reacciones alérgicas como la dermatitis atópica y en la regulación de enfermedades metabólicas comunes (obesidad, síndrome de resistencia a la insulina, diabetes tipo 2) (Mallappa *et al.*, 2019). Los estudios científicos también informan sobre su actividad anticancerígena y la mejora de la respuesta inmunitaria del organismo (immunomodulación) mediante la activación de genes específicos de células huésped (Kerry *et al.*, 2018). En definitiva, los probióticos son capaces de modular la composición de la microbiota intestinal, compitiendo con la microflora endógena y previniendo el crecimiento de bacterias patógenas mediante la competencia por los sitios de adhesión, la producción de sustancias antimicrobianas y la modulación del sistema inmunitario (De Almada *et al.*, 2015).

No todos los microorganismos pueden ser catalogados como probióticos, ya que éstos deben cumplir ciertos requisitos; por ejemplo, es muy importante su identificación a nivel de cepa para poder vincularla con un efecto concreto sobre la salud (Ganguly *et al.*, 2011). Además, la OMS, la FAO y la EFSA han definido una serie de características ideales que deberían presentar estas comunidades para ser definidos como microorganismos probióticos, clasificados en base a 3 criterios (Markowiak and Śliżewska, 2017). El primero de ellos la seguridad, se refleja en su resistencia a antibióticos (Siesto *et al.*, 2022; McFarland, 2015) o en la ausencia de asociación con organismos patógenos. El siguiente criterio se basa en su utilidad tecnológica y el último define una serie de propiedades funcionales, como son el crecimiento a la temperatura corporal humana (37°C), y la capacidad de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal (resistencia a pH ácido, jugos gástricos, etc.) y de permanecer en el intestino (McFarland, 2015). Esta es la principal razón por la que la mayoría de los probióticos comercializados actualmente son de origen bacteriano, mayoritariamente bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.*) que se encuentran en el tracto gastrointestinal humano, generalmente ingeridas mediante alimentos fermentados (Pais *et al.*, 2020). Por el contrario, la mayoría de levaduras son particularmente sensibles a las condiciones del tracto gastrointestinal (Rodríguez *et al.*, 2018), por lo que no han sido consideradas históricamente en el aislamiento de microorganismos con efectos beneficiosos para la salud. No

obstante, se han encontrado cepas de levadura con gran potencial probiótico como *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la cepa *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, también denominada como *Saccharomyces boulardii* (Sb) la única levadura reconocida y comercializada como probiótico, cuya caracterización está bien documentada (Hatoum *et al.*, 2012; Czerucka *et al.*, 2007).

S. boulardii fue descubierta por el microbiólogo francés Henri Boulard en 1920 durante una visita a Indochina (Czerucka and Rampal, 2019). Se trata de una levadura aislada de la epidermis del lichi cultivado en la península de Indochina (Fu *et al.*, 2022). Es similar a *S. cerevisiae* (99 % de homología a nivel genómico) pero difiere en muchas de sus características metabólicas, genéticas y taxonómicas (Khatri *et al.*, 2017). Entre las características más interesantes de *S. boulardii* se ha demostrado, utilizando modelos de rata y ratón, que aumenta significativamente la concentración de IgA intestinal, mejorando así la respuesta inmunitaria frente a la toxina A de *Clostridium difficile* (Buts *et al.*, 1990; Qamar *et al.*, 2001), también tiene la capacidad de degradar las toxinas producidas por esta bacteria y *Escherichia coli* mediante la síntesis de proteasas (Valdés-Varela *et al.*, 2018; Buts *et al.*, 2006). Además, *S. boulardii* libera poliaminas en la luz intestinal, lo que incrementa la secreción de enzimas, entre ellas disacaridasas como lactasa, sacarasa o isomaltasa, promoviendo el crecimiento de las vellosidades intestinales y mejorando los procesos de digestión y la absorción, así como la acción de los anticuerpos contra los patógenos (Buts *et al.*, 1999). Finalmente, *S. boulardii* muestra una alta capacidad de sobrevivir a pH 2,5 en presencia de sales biliares, además de presentar una elevada actividad antioxidante y antibacteriana (Fu *et al.*, 2022), también modula la microbiota intestinal y aumenta la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que desempeñan diversas funciones en la bioquímica y fisiología de diferentes tejidos (Staniszewski and Kordowska-Wiater, 2021). Estas propiedades han convertido a *S. boulardii* en un probiótico eficaz para el tratamiento del síndrome del intestino irritable y la diarrea, entre otras enfermedades bacterianas (Fu *et al.*, 2022; Lazo-Vélez *et al.*, 2018).

Los beneficios terapéuticos de *S. boulardii* podrían extenderse a otras estirpes y especies de levaduras. Otros estudios han demostrado el potencial probiótico de *Wickerhamomyces anomalus* (García-Hernández *et al.*, 2012) o *Pichia kudriavzevii* (Chelliah *et al.*, 2016). También se ha encontrado que la gran mayoría de cepas de *Torulaspota delbrueckii* muestran una gran tolerancia a altas concentraciones de sales biliares y capacidad de inhibición del crecimiento de ciertos patógenos (Psani *et al.*, 2006). Cabe pensar por tanto, que es posible aislar de fuentes naturales o de nichos de ambientes industriales, nuevas cepas con propiedades únicas que permitan ampliar los beneficios actuales de los probióticos, atender la necesidad de los consumidores y hacer frente a la enorme demanda de estos complementos. En este trabajo, hemos llevado a cabo una evaluación inicial del potencial probiótico de una colección de aislados de levaduras de masas madre. Propiedades como hidrofobicidad, termotolerancia y

capacidad antioxidante han sido analizadas utilizando *S. boulardii* como cepa de referencia. Los resultados indican que varios de los aislados exhiben propiedades compatibles con su uso como probióticos.

2. Objetivos:

Como se indicó anteriormente, existe un enorme interés del sector industrial por el desarrollo de nuevos usos, aplicaciones y funcionalidades de los probióticos, al igual que una creciente concienciación de los consumidores del efecto beneficioso de estos complementos. Todo ello, justifica la necesidad de identificar nuevas especies con características probióticas. Nuestra hipótesis en este trabajo es que la masa madre es una fuente no convencional para el aislamiento de bacterias y levaduras con potencial probiótico. Con la idea de corroborar esta hipótesis hemos desarrollado este trabajo experimental con el siguiente objetivo:

- Examinar el potencial probiótico de una colección de cepas de levadura procedentes de aislados de masas madre mediante ensayo in vitro de sus características fenotípicas.

3. Materiales y Métodos:

3.1. Procedencia de las cepas de levadura:

Durante este trabajo se han evaluado 17 cepas de levadura, cuya identificación taxonómica, origen y denominación se describe en la **Tabla 3.1**. Todas ellas se almacenaron en placas con medio YPD (1 % extracto de levadura, 2 % dextrosa, 2 % peptona) a 4°C y antes de la realización de cada experimento las cepas de levadura se dejaron crecer en agitación (180 rpm) en medio YPD líquido a 30° C durante 24 horas.

Tabla 1: Origen de las cepas empleadas.

Cepas	Especie	Origen	Referencia
Sbp	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Comercial	Marca comercial Ultra-levura ®
Sb	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Colección (IATA-CSIC)	Cesión Dra. Amparo Querol
Sc06; S13; Sc16; Sc31; Sc51; Sc121; Sc129; Sc132	<i>Saccharomyces cerevisae</i>	Aislado de masas madre	Sánchez-Adriá <i>et al.</i> , 2023
Td04; Td29	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Aislado de masas madre	Sánchez-Adriá <i>et al.</i> , 2023
Kh08; Kh07; Kh24	<i>Kazachstania humilis</i>	Aislado de masas madre	Sánchez-Adriá <i>et al.</i> , 2023
Pa	<i>Pichia anomala</i>	Aislado de masas madre	Colección de laboratorio
Wa	<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	Aislado de masas madre	Sánchez-Adriá <i>et al.</i> , 2023

3.2. Determinación del peso seco:

Para realizar este análisis se utilizaron filtros de nitrocelulosa que se pesaron en una balanza de precisión previamente. Se filtró 1 ml de una suspensión de células de DO₆₀₀ conocida utilizando un matraz kitasato acoplado a un equipo de filtración a vacío. Los filtros se dejaron secar en una estufa a 55°C durante 20 h, se pesaron de nuevo y se calculó el peso seco como diferencia entre el peso final y el inicial. Los datos se expresan como mg/unidad de DO₆₀₀.

3.3. Crecimiento a temperatura corporal humana:

Este procedimiento fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Kong *et al.* (2018), con ligeras modificaciones. Todas las levaduras fueron cultivadas en YPD líquido a 30°C y 180 rpm en un incubador orbital. Después de 18-24 h, se midió la DO₆₀₀ de cada cultivo en un espectrofotómetro (UV-VIS-1280, Shimadzu, Eu) y la densidad de células se ajustó a un valor inicial de 1,0. Finalmente, se llevaron a cabo diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y se depositaron alícuotas de 2,5 µl de cada una de ellas en placas de YPD-agar. Las placas se incubaron a 37°C (temperatura corporal humana) o a 30°C (control) durante 48 horas. Por último, las placas se escanearon para tener un registro del crecimiento de capa cepa en las diferentes condiciones.

3.4. Resistencia a antibióticos:

Este test se realizó de acuerdo con el protocolo de Kirby-Bauer aprobado por el NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (Siesto *et al.*, 2022), con ligeras modificaciones. Se utilizaron 2 antibióticos: Kanamicina y Cloranfenicol. Cada ensayo fue realizado en medio YPD-agar añadiendo concentraciones crecientes de cada antibiótico (40, 80, 100 y 150 µg/ml). Posteriormente se depositaron gotas de 3 y 6 µl de una suspensión de células (DO₆₀₀ inicial = 1; 10^7 células/ml). Todas las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. Por último, las placas se escanearon como se mencionó anteriormente.

3.5. Capacidad de formación de biopelículas.

Para analizar la capacidad de generación de biopelículas de cada cepa se siguió el protocolo propuesto por Reynolds and Fink (2001). Brevemente, se prepararon placas de YPD sólido conteniendo un 0,3 % o un 2 % de agar, sobre las que se depositó una muestra de 5 µl de una suspensión diluída de células de cada cepa ($Abs_{600} = 1$). A continuación, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 25°C. Finalmente, se documentó el crecimiento mediante escaneado de las placas tras 7, y 14 días de incubación. La formación de biopelículas se evaluó siguiendo la aparición de estructuras con apariencia de estrías en las colonias inoculadas.

3.6. Hidrofobicidad:

Este test se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cheriiah *et al.* (2016) con ligeras modificaciones. Para ello, se prepararon cultivos de levadura en condiciones standard (YPD; 18-24 h; 30°C/180 rpm), de los que se tomó una alícuota correspondiente a 4 unidades de DO₆₀₀ (4.10⁷ células/ml). La suspensión se centrifugó (4.000 rpm; 4°C), se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en PBS frío con la idea de eliminar los restos de medio de cultivo. Los lavados se repitieron dos veces, hasta obtener finalmente una suspensión de células en PBS de Abs₆₀₀ ~ 1,0 (Abs₆₀₀ inicial; A0). Muestras de 1 ml de cada suspensión se repartieron en tubos eppendorf, se adicionó 200 µl de tolueno a cada una de ellas, y la mezcla se agitó en un vortex durante 2 min y se incubó a 37°C durante 30 min. Finalmente, se midió la Abs₆₀₀ final (At). El test se realizó para cada una de las cepas por duplicado.

La hidrofobicidad de cada cepa se evaluó mediante el cálculo del índice MATS (Microbial Adhesion To Solvents) que refleja la capacidad de la envoltura celular para adherirse a un solvente orgánico. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{MATS}(\%) = ((\text{Abs}_0 - \text{Abs}_t) / \text{Abs}_0) \times 100$$

Donde Abs₀ representa la absorbancia a tiempo inicial y Abs_t corresponde con la absorbancia a tiempo final medida.

3.7. Tolerancia a diferentes pHs:

Este test fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Siesto *et al.* (2014). Para ello, se preparó YPD líquido con valores de pH = 3,0; 3,5; 4,0 o 7,2. Se utilizó un pHmetro (CRISON basic 20), y el volumen necesario en cada caso de 1M de HCl o 1M de NaOH. A continuación, los medios se esterilizaron por filtración (0,2 µm) en una cabina de flujo laminar, y se inocularon a una DO₆₀₀ inicial de 0,1 (~10⁶ células/ml) a partir de un preinóculo en YPD (pH ~ 5,95) de cada cepa incubado a 30°C y 180 rpm. Alícuotas de cada suspensión (200 µl) se vertieron por triplicado en una placa microtiter de 96 pocillos que se incubó durante 24 h a 37°C o a 30°C, para aquellas cepas termosensibles, en un equipo lector de placas (POLAstar Omega, BMG Labtech). Se registraron lecturas de Abs₆₀₀ cada 30 s durante 50 ciclos, con una agitación de 10 s previa a cada lectura. Los resultados se expresaron como Tiempo de generación (Tg) siguiendo la relación:

$$Tg = \ln 2 / \mu$$

Siendo el Tg el tiempo de generación que es el tiempo en el que tarda en duplicarse un microorganismo y µ la pendiente en fase exponencial calculada para cada cepa a los diferentes pHs.

También se evaluó el crecimiento final de cada cepa de levadura a los pHs ensayados. Para ello, se midió la Abs₆₀₀ tras 24 horas de incubación en un agitador orbital durante 24 a 37°C o a 30°C y 180 rpm. Los análisis de los resultados se evaluaron como ratio de crecimiento (GR) (Bevilacqua *et al.*, 2009) y se expresó como:

$$GR = (Abss/Absc)$$

Siendo Abss la absorbancia de la cepa a analizar y Absc la absorbancia de la cepa de referencia (Sb) para cada condición de pH.

3.8. Tolerancia a ácidos:

Para la realización de este análisis, se procedió a preparar cultivos en YPD líquido de las cepas bajo estudio en las condiciones habituales (18-24 h; 30°C/180rpm), que se utilizaron para inocular a una DO₆₀₀ inicial de 0,1 un volumen del mismo medio conteniendo 300 mM de ácido láctico, 60 mM de ácido acético, o una mezcla de ácido láctico y ácido acético, a concentraciones de 200 y 20 mM, respectivamente. El crecimiento de cada cepa en los diferentes medios se analizó por triplicado en placas de microtiter, siguiendo las condiciones descritas anteriormente. De la misma forma, se examinó el GR a 30 o 37°C de cada cepa y medio de cultivo. Al igual que en el apartado anterior los resultados se expresaron en función del tiempo de generación y como ratio de crecimiento.

3.9. Resistencia al paso por el tracto gastrointestinal:

La tolerancia de las cepas bajo estudio a las condiciones impuestas por su paso por el tracto gastrointestinal fue ensayada siguiendo el protocolo propuesto por Arévalo Villena *et al.* (2018) con algunas modificaciones. En primer lugar, se centrifugaron a 3.500 rpm/2 min/4°C, 10 unidades de DO₆₀₀ de cada cepa cultivada en YPD en condiciones habituales. El sobrenadante se descartó y el correspondiente pellet de células se lavó y se centrifugó 2 veces utilizando agua destilada a 4°C. Finalmente, dicho pellet se trató de la siguiente manera:

- Simulación estomacal (fase estática) donde el pellet se resuspendió en 1 ml de una solución que contenía 3 g/l de pepsina y 5 g/l de NaCl en 0,1N de HCl ajustado a pH 2 con 1N de NaOH, y se incubó a 37°C durante 3 h.
- Digestión intestinal (fase cinética de crecimiento): Se traspasa 10µl de la reacción anterior (correspondiente a 10⁶ células) y se resuspende en 1ml de una solución intestinal que contenía 0,5 % de sales biliares y 1mg/ml de pancreatina (pH 8). Por último, se siguió el crecimiento de las levaduras en este medio en un lector de placas termostaticado.

3.10. Capacidad antioxidante:

Para determinar la actividad antioxidante de cada cepa se implementó el protocolo descrito por Chen *et al.* (2010) y Capece *et al.* (2018) con ciertas modificaciones. Primero se preparó una solución de trabajo conteniendo una concentración de 120 mM de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en metanol. A partir de un precultivo de cada una de las cepas bajo estudio (YPD; 30°C/180 rpm), se prepararon diluciones que contenían cantidades decrecientes de unidades de DO₆₀₀. Cada una de ellas se centrifugó, se lavó con agua destilada fría para eliminar restos de medio de cultivo y el pellet se resuspendió en 0,25 ml de etanol. A esta suspensión se le añadió 0,5 ml de la solución de DPPH, se mezcló bien y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Por último, se volvió a centrifugar a 4.000 rpm y se midió la absorbancia a 517 nm del sobrenadante. Con estos valores, se calculó el porcentaje de inhibición de cada dilución de células y se representó el % de inhibición frente a la concentración de células, y se calculó el EC₅₀, que se define como aquella concentración de células expresada como mg de células (p.s.)/ml que reduce la Abs₅₁₇ de la solución de DPPH en un 50 %.

$$\% \text{ de Inhibición} = 1 - (\text{Abs}_s / \text{Abs}_b) \times 100 \%$$

Siendo Abs_s la absorbancia de las cepas y Abs_b la absorbancia del blanco medidas a 517nm.

Paralelamente, se determinó la EC₅₀ de Trolox (ácido 6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2 carboxílico), un standard habitualmente utilizado para relativizar y poder comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras. Con este fin, se preparó primero un stock del standard en etanol (50 mM; 12,5 mg/ml), que se almacenó a -20°C hasta su utilización. El stock se atemperó y se utilizó para preparar diluciones de Trolox a concentraciones de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 y 15,0 µg/ml. Como en el caso de las suspensiones de células, se midió para cada dilución la reducción de Abs₅₁₇ de la solución de DPPH y se representó el % de inhibición frente a la concentración de Trolox con el fin de calcular la EC₅₀ del patrón. Con todos estos datos se calculó la capacidad antioxidante de cada cepa de levadura ensayada en equivalentes Trolox, TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{TEAC} = \text{EC}_{50} (\text{Trolox}) / \text{EC}_{50} (\text{Muestra})$$

En todos los casos, se utilizó metanol puro como blanco. Este experimento se realizó por triplicado para cada cepa.

3.11. Análisis estadístico:

La significación estadística de las diferencias de las cepas respecto a *S. boulardii* se calculó a través de diferentes estudios estadísticos (prueba-T) mediante la plataforma de Microsoft Excel. Las diferencias se consideraron significativas únicamente cuando presentaron un valor de p-value inferior a 0,01.

4. Resultados y discusión.

4.1. Crecimiento a temperatura corporal humana.

La tolerancia y crecimiento a la temperatura del cuerpo humano es uno de los requisitos básicos para valorar el potencial probiótico de cualquier microorganismo, ya que permite verificar si puede ejercer una función beneficiosa en el intestino humano (Czerucka *et al.*, 2007). Por ello, se inició el estudio siguiendo el crecimiento de los aislados de masa madre en medio sólido a 30°C y 37°C. Como se puede apreciar en **la Figura 1-A** todas las cepas correspondientes al género *Saccharomyces*, incluida la cepa de *S. cerevisiae var boulardii* (Sb) utilizada como control en este trabajo, crecen a ambas temperaturas ensayadas, tal y como se había descrito previamente en otros trabajos (Phong *et al.*, 2019; Fernández-Pacheco *et al.*, 2021). De manera similar, las levaduras *Pichia anomala* y *Wickerhamomyces anomalus*, proliferaron a 37°C, aunque esta última muestra un ligero defecto de crecimiento (**Figura 1-B**), que fue más acusado en las dos cepas de *Torulaspota delbrueckii* analizadas, lo que indica una menor termotolerancia de estas a altas temperaturas. Los resultados son consistentes con lo descrito previamente para una colección de cepas de levadura de esta especie, aisladas de masas madre en el norte de Portugal (Almeida and Pais, 1996). Éstas fueron caracterizadas por su buen crecimiento a bajas temperaturas (12°C) y resistencia a congelación, lo que ha llevado a proponer su utilización en masas dulces congeladas (Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). Así pues, nuestros resultados confirman este rasgo fenotípico distintivo de cepas de *Torulaspota delbrueckii* aisladas de masas madre. Finalmente, Las 3 cepas de *Kazachstania humilis* fueron incapaces de crecer a 37°C (**Figura 1-C**). Resultados similares se han descrito por Jacques *et al.*, (2016) respecto a la caracterización fenotípica de cepas de *K. humilis* aisladas de restos forestales en Brasil. La extrema sensibilidad a la temperatura corporal humana de las cepas de levaduras de las especies *Kazachstania humilis* y *Torulaspota delbrueckii* analizadas, las hace poco idóneas para su posible uso como probióticos.

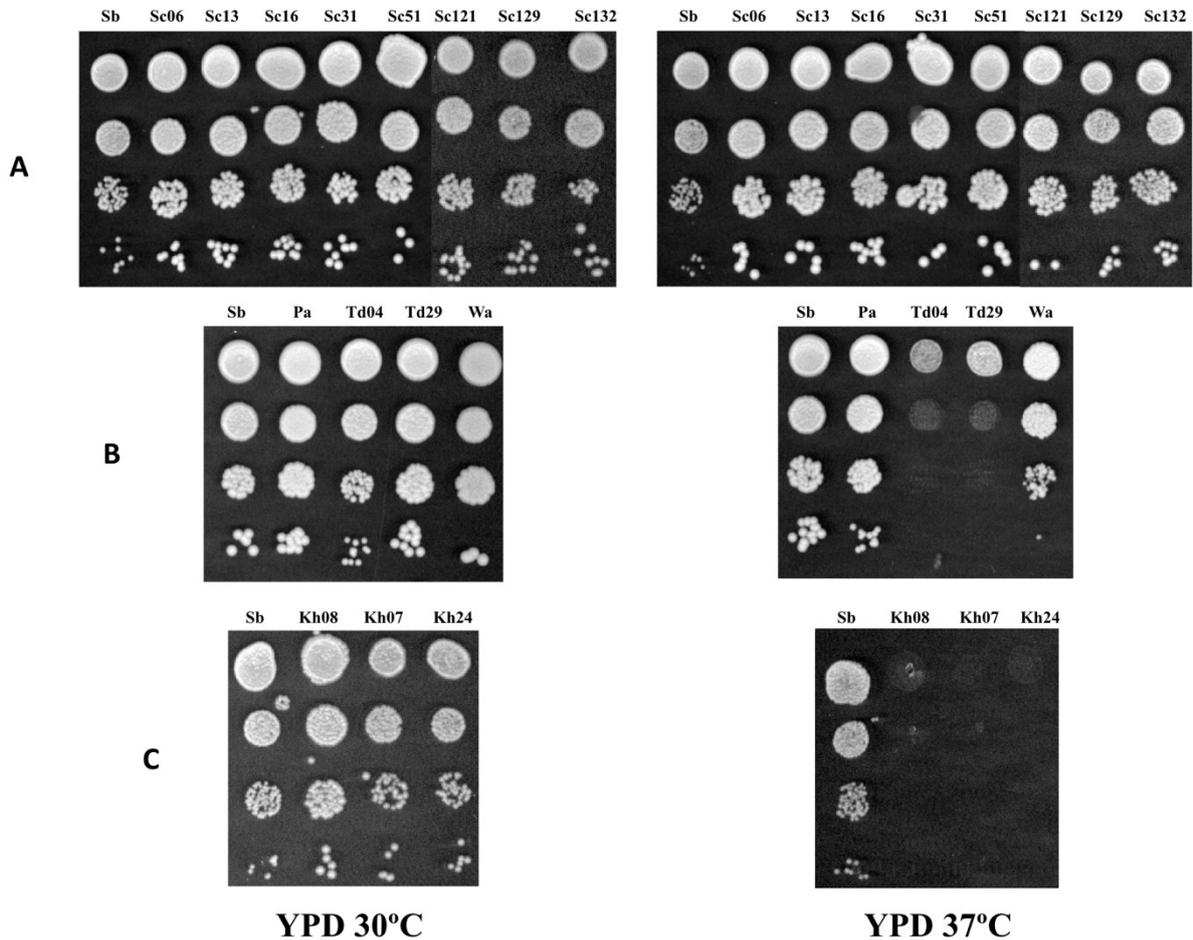


Figura 1. Crecimiento a diferentes temperaturas de aislados de masa madre. Cultivos saturados de las levaduras estudiadas, se llevaron a una DO_{600} inicial de 0,5 y se prepararon las correspondientes diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} . Tras depositar 2,5 μ l de cada dilución en placas de YPD, estas se incubaron a la temperatura indicada durante 48h previamente a recoger las imágenes en un escáner de laboratorio.

4.2. Resistencia a antibióticos.

La resistencia a antibióticos es una propiedad probiótica interesante, ya que determina su potencial uso como probiótico para pacientes que consumen estos fármacos de forma terapéutica (Siesto *et al.*, 2022). Por ello, las diferentes cepas de levadura fueron testadas frente a concentraciones crecientes de dos antibióticos, la kanamicina y el cloranfenicol. La kanamicina es un aminoglucósido con capacidad bactericida que interviene en la síntesis de proteínas bacterianas gracias a su unión con la subunidad ribosomal 30S, mientras que el cloranfenicol es antibiótico bacteriostático de amplio espectro capaz de unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano impidiendo la formación en enlaces peptídicos (Vademecum.es, 2015).

A modo de ejemplo en la **Figura 2** se muestra el crecimiento de la cepa control (Sb) y dos aislados de *S. cerevisiae* (Sc06 y Sc13). Como se puede observar, las levaduras crecieron a todas las concentraciones de antibiótico ensayadas. Por ello, el experimento se decidió continuar utilizando sólo las 2 concentraciones más altas (130 y 150 µg/ml) de ambos antibióticos.

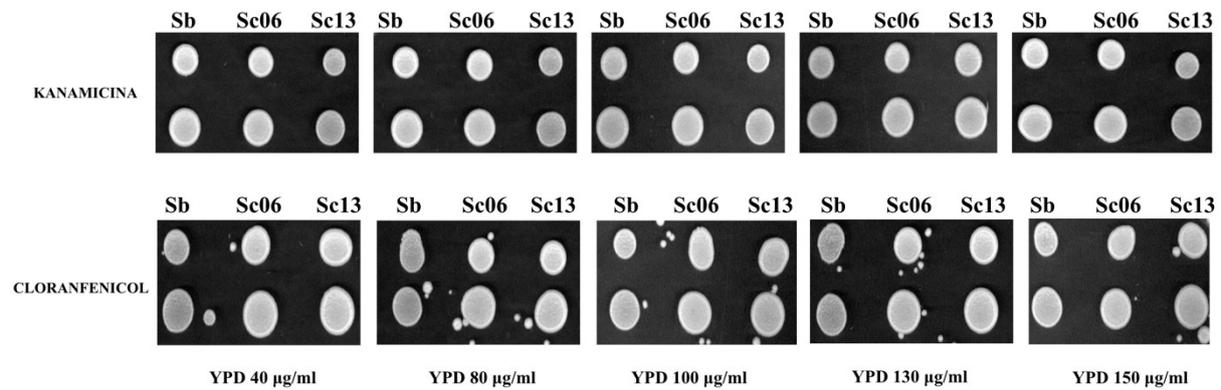


Figura 2. Crecimiento de levaduras en presencia de antibióticos. Cultivos saturados de *S. bouldardi* (Sb) y *S. cerevisiae* (Sc06 y Sc13) se diluyeron a una OD₆₀₀ de 1 y alícuotas de 3 o 6 µl se depositaron en placas de YPD con concentraciones crecientes de kanamicina y cloranfenicol, tal y como se indica en la imagen. Tras 48 horas de incubación a 30°C, las placas se escanean para su registro digital.

Cabe destacar que la tolerancia a kanamicina y cloranfenicol es común a la colección de aislados de masa madre analizados en este trabajo, incluidas las levaduras no convencionales *P. anomala* y *W. anomalus* (**Figura 3**). Los resultados obtenidos coinciden con los de otros autores, ya que la mayoría de las levaduras son resistentes a antibióticos (Każmierczak-Siedlecka *et al.*, 2020). Czerucka *et al.*, (2007) destacan que esta resistencia supone una ventaja, ya que está asociada a genes incapaces de ser transferidos a microorganismos patógenos.

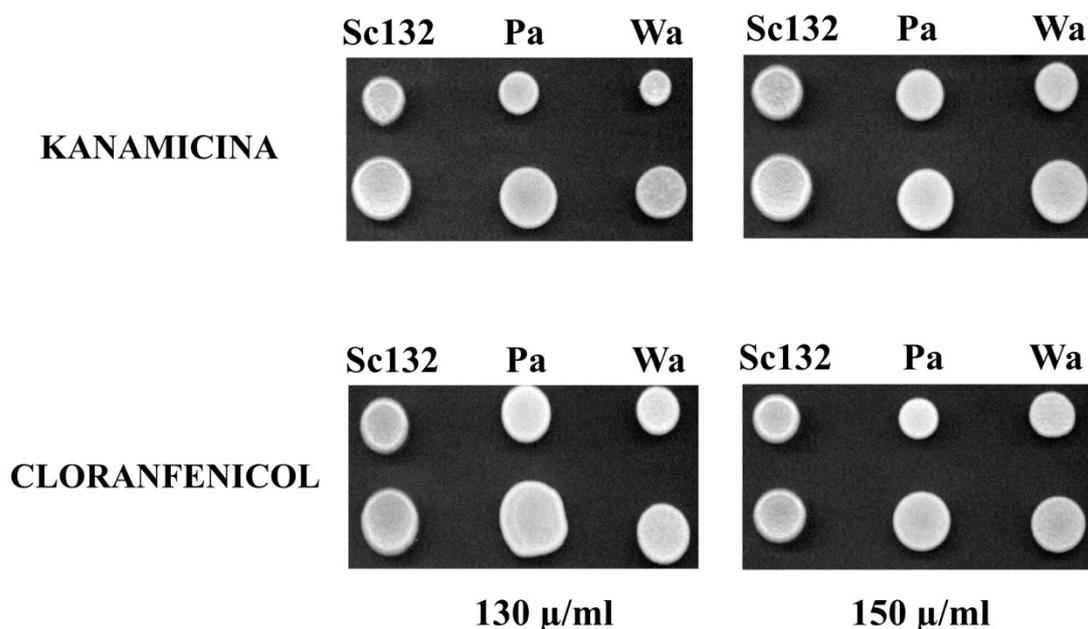


Figura 3. Comparación de la tolerancia a antibióticos de levaduras convencionales y no-convencionales. Utilizando cultivos saturados de las cepa de *S. cerevisiae* (Sc132) y las no-convencionales *P. anomala* (Pa) o *W. anomalus* (Wa), se procedió tal y como se ha explicado en la **Figura 2**.

4.3. Capacidad de formación de biopelículas.

Una biopelícula se define como un consorcio de microorganismos en el que las células se adhieren entre sí y a una superficie. En estas condiciones, las células generan estructuras en las que están embebidas y protegidas por una matriz extracelular, compuesta por polímeros de azúcares (Harding *et al.*, 2009). Por ello, no es de extrañar que sea un atributo a tener en consideración a la hora de seleccionar una cepa como probiótico (Speranza *et al.*, 2020).

Se ha descrito que la formación de biofilms se ve acelerada en medios con niveles reducidos de glucosa (Reynolds and Fink, 2001), por lo que en este caso se prepararon placas de YPD con 0.1 % de glucosa a las que se añadió agar al 2 (control) o al 0.3 % para solidificar el medio.

La **Figura 4** recoge los resultados del crecimiento de dos aislados de *S. cerevisiae*, Sc121 y Sc132, después de 7 y 14 días de incubación, en los mencionados medios de cultivo. En placas con un 2 % de agar y tras una semana a 25°C, se observa en las dos cepas, colonias de color blanco mate y bordes lisos. Después de 14 días, Sc121 presenta colonias de mayor tamaño, pero de bordes rugosos, mientras Sc132 mantiene colonias de bordes lisos. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en medios con 0,3 % de agar, lo primero que llama la atención es el aspecto diferente de la colonia. En estas condiciones las levaduras dan lugar a colonias blancas brillantes, que cuando se tocan con un palillo estéril, se

arrastra una capa mucosa, que podría ser atribuida a la producción de un mucopolisacárido (datos no mostrados). No obstante, no se observó en ningún caso la aparición de estrías radiales en las colonias, característico de levaduras con capacidad de producir biopelículas (Reynolds y Fink, 2001).

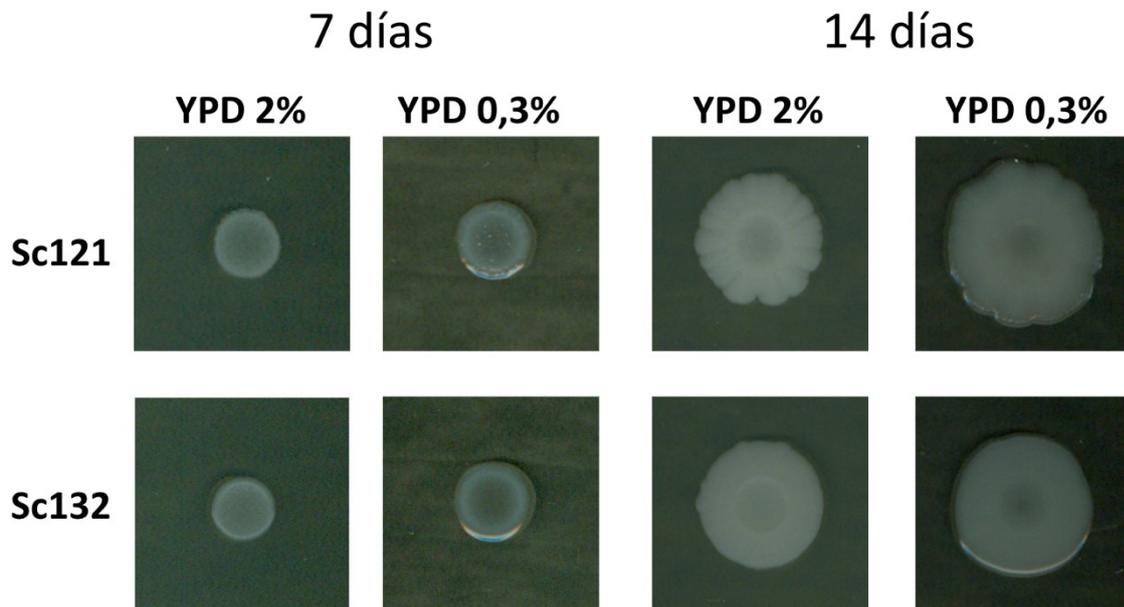


Figura 4. Comparación de la morfología de colonias de aislados de masa madre de *S. cerevisiae* en medios YPD con diferentes contenidos de agar.

Cabe destacar que la morfología de las colonias del aislado Sc121 es característico de levaduras que carecen de *FLO11*, un gen que codifica para una glicoproteína (floculina) involucrada en adherencia y formación de biopelículas (yeastgenome.org, 2023). Reynolds and Fink (2001) indican que las colonias de estos mutantes tienen un menor diámetro y no producen estrías radiales visibles. Además, estos autores describen una correlación negativa entre este fenotipo (formación de estrías radiales) y el nivel de ploidía de la cepa analizada, de tal manera que las cepas haploides son en las que más fácil se detectan.

La mayoría de las levaduras aisladas de la naturaleza o de fermentaciones espontáneas, son diploides, frente a las cepas industriales, domesticadas por el hombre durante siglos, que son tetraploides (Wnuk *et al.*, 2015; Bigey *et al.*, 2021). Si bien la ploidía de alguno de los aislados con los que trabajamos es desconocida, compañeros del laboratorio disponen de información de otros procedentes de la misma masa madre. Como se recoge en la **Tabla 2**, la mayoría son diploides o triploides. Así, teniendo en cuenta este dato, la elevada ploidía de las levaduras ensayadas, podría explicar la ausencia de un fenotipo tan sencillo de visualizar. No obstante, habría que determinar su ploidía en futuros experimentos, para poder confirmar los resultados.

Tabla 2. Ploidía de aislados de masa madre.

Cepas	Ploidía	Especie
Kh02	3,24 ± 0,11	<i>Kazachstania humilis</i>
Kh08	3,17 ± 0,04	<i>Kazachstania humilis</i>
Kh11	3,48 ± 0,50	<i>Kazachstania humilis</i>
Kh13	3,09 ± 0,41	<i>Kazachstania humilis</i>
Kh18	4,09 ± 0,22	<i>Kazachstania humilis</i>
Td03	1,79 ± 0,02	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Td04	0,98 ± 0,03	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

*Datos proporcionados por Isabel Sánchez-Adriá.

De manera similar a lo expuesto para las cepas de *S. cerevisiae*, tras 14 días de incubación en placas con 0,3 % de agar, en el resto de aislados de masa madre testados, no se observó la aparición de las típicas estructuras radiales características de la producción de biopelículas (**Figura 5**). De nuevo algunas de las cepas ensayadas dan lugar a colonias de bordes rugosos, distintivo de cepas con mutaciones en los genes que codifican para floculinas, como por ejemplo la cepa Kh07.

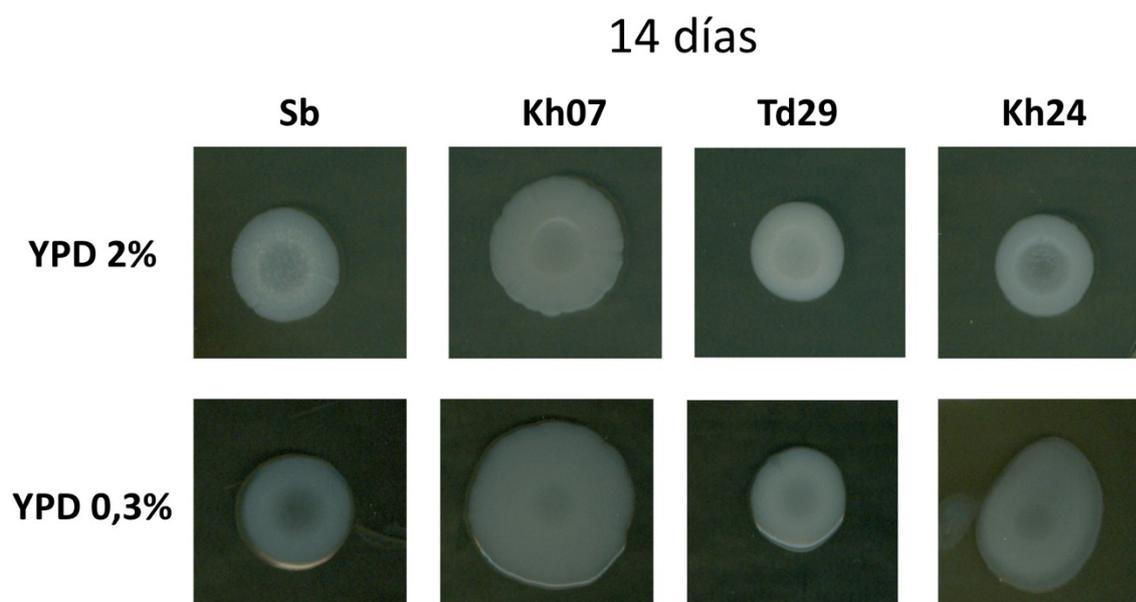


Figura 5. Morfología de colonias de aislados de masa madre en medios con bajo contenido de agar.

4.4. Hidrofobicidad.

La hidrofobicidad de la superficie celular es una de las características más destacadas de los microorganismos probióticos ya que les confiere la capacidad de colonización, paso vital para la adhesión de estos para mantenerse en el intestino (Orłowski and Bielecka, 2006). De hecho, cuanto mayor sea la capacidad hidrofóbica, mejor será la adherencia a la mucosa intestinal (Siesto *et al.*, 2022), siendo también muy importante para establecer interacciones con las células intestinales del hospedador.

Se ha examinado la hidrofobicidad de la envoltura celular mediante la determinación del índice MATS (Microbial Adhesion To Solvents), habitualmente empleado como una medida del comportamiento adherente y la capacidad de agregación microbiana (ver la sección de Materiales y Métodos)

La **Tabla 3** muestra los valores del índice MATS, expresado como porcentaje, de las cepas de levadura analizadas en este estudio. Como vemos, existe una gran variabilidad entre ellas, incluso cuando pertenecen a una misma especie. Resultados similares fueron descritos por otros autores (Siesto *et al.*, 2022), que encontraron, en una colección de cepas de *S. cerevisiae*, valores de hidrofobicidad entre el 10 y el 90 %. Cabe destacar que ninguno de los aislados de masa madre mostró una elevada hidrofobicidad, siendo los valores más altos para Kh08 y Sc51, con un 54 % y un 48 %, respectivamente. Indicar también que la cepa de *S. boulardii* utilizada como control, mostró valores de hidrofobicidad inferiores a los descritos en la bibliografía (Fu *et al.*, 2022; Fadda *et al.*, 2017), lo que nos hizo cuestionarnos si el control seleccionado, obtenido de una colección privada, era el adecuado para este estudio.

Tabla 3. Índice de hidrofobicidad de aislados de masa madre.

Cepas	MATS %
Sb	16,45 ± 0,81
Sc06	34,31 ± 0,16
Sc13	33,52 ± 6,74
Sc16	9,12 ± 5,04
Sc31	48,36 ± 2,76
Sc51	26,97 ± 9,74
Sc121	30,57 ± 6,43
Sc129	38,57 ± 8,03
Sc131	41,77 ± 1,64
Td04	36,94 ± 2,97
Td29	18,73 ± 1,53
Kh07	54,58 ± 6,620
Kh08	31,98 ± 7,93
Kh24	36,21 ± 7,52
Pa	28,96 ± 10,06
Wa	28,34 ± 1,86

Llegados a este punto, se procedió a aislar, a partir de un preparado comercial (Ultra-levura ® (Ultralevura.com, 2022) una nueva cepa de esta levadura, (que abreviamos como Sbp) que utilizamos en posteriores análisis como organismo de referencia. Para ello, se suspendió en YPD líquido durante 30 min a 30°C (5 mg) y tras realizar sucesivas diluciones seriadas, se procedió a plaquear 100 µl de las correspondientes a 10⁻⁴ y 10⁻⁵, con el objeto de conseguir colonias individuales. Se observó una única morfología de colonia y se escogió 3 colonias al azar, cuya identificación taxonómica inicial, mediante RFLP, sólo permitió verificar la especie *S. cerevisiae*, pero no la variedad *boulardii*, aunque el patrón de fragmentos de digestión fue idéntico al de la cepa cedida de la colección privada (consultar **Anexo 2**).

Cuando se analiza el índice de hidrofobicidad del probiótico comercial, se obtienen niveles de 25,99 ± 2,40 %. Otros autores han descrito valores de hidrofobicidad del 30-40 % como el umbral para establecer interacciones con la mucosa y promover su adherencia (Ilavenil *et al.*, 2015). Siguiendo este criterio, los aislados Sc06, Sc31, Sc132, Td04 y Kh08 muestran niveles en el rango indicado. Teniendo en cuenta que el nivel de hidrofobicidad aumenta con el tiempo de exposición al solvente orgánico y, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, la exposición a tolueno en estos experimentos ha sido de 30 min, es muy probable que la lista de aislados que cumplan este criterio aumente si el análisis se repitiera con un tiempo de exposición de 1h.

4.5. Tolerancia a diferentes pH.

La tolerancia, especialmente a pHs ácidos, es una característica importante a evaluar ya que ayuda a predecir el valor probiótico de una levadura. Recordar que durante el recorrido por el tracto gastrointestinal los microorganismos están sometidos a unas condiciones de pH muy extremas (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010).

Se procedió a evaluar la tasa de crecimiento de cada levadura bajo estudio, en medio YPD ajustado a diferentes pHs, concretamente a 3,0; 3,5; 4, y 7,2. Para facilitar la recopilación de datos, los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, incubadas a 37°C en un lector Polarstar (consultar **Anexo 3**).

El seguimiento durante 24h de dichos cultivos permitió calcular la tasa de crecimiento, como la pendiente en el tramo lineal para cada levadura y condición ensayada, cuyo valor se transformó en tiempo de generación (Tg) con un sencillo cálculo. Para facilitar la interpretación de los resultados, se construyó el correspondiente gráfico Heatmap (**Figura 6**) utilizando la plataforma MetaboAnalyst (MetaboAnalyst, 2023).

Como se observa en la **Figura 6** las levaduras de este estudio se distribuyen en dos grupos. A la derecha de la imagen se agrupan las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia* o *Wickerhamomyces*,

siendo estas dos últimas las que más lentamente crecen a pH 3,0 y 3,5. En el otro grupo (**Figura 6**; izquierda), se engloban cepas de los géneros *Kazachstania* y *Torulaspota*, que muestran tiempos de generación muy elevados en estas condiciones de cultivo. Debido a esto, el crecimiento a diferentes pHs de estas levaduras se ensayó también a 30°C utilizando como control la cepa de referencia Sb.

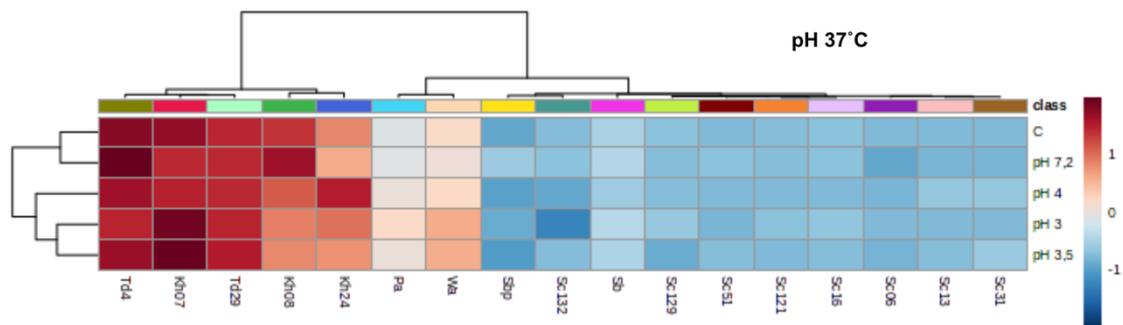


Figura 6. Tolerancia a diferentes pHs de aislados de masa madre. Cultivos saturados de levadura, se utilizaron como preinóculo para seguir sus curvas de crecimiento a 37°C en medio YPD a diferentes pHs. Tras calcular el tiempo de generación de cada levadura, los datos se analizan en la plataforma MetaboAnalyst (MetaboAnalyst.ca, 2023).

Como se observa en la **Figura. 7**, las dos cepas de *Torulaspota* son las que presentaron un tiempo de generación más largo en comparación con las de *K. humilis* o la cepa control (Sb). En estas condiciones de cultivo, destacar que Kh08 es la levadura que crece más rápido en todos los medios ensayados, lo cual indica una mejor tolerancia a todo el rango de pHs testados. Además, Kh07 y Kh24 se agruparon junto a la cepa control (Sb), lo que sugiere que tienen una resistencia similar.

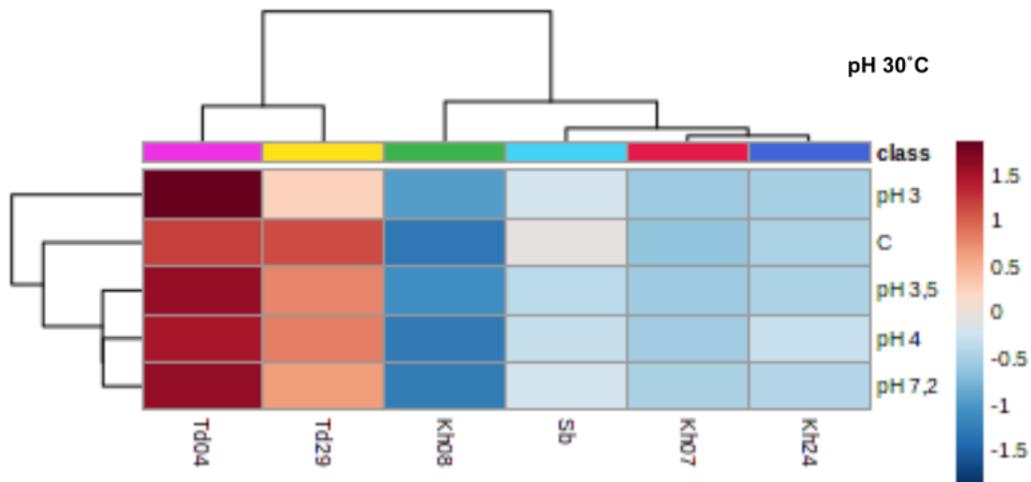


Figura 7. Tolerancia a diferentes pHs de cepas de los géneros *Kazachstania* y *Torulasporea* a temperatura permisiva. En este caso se siguió el mismo protocolo que el explicado en la **Figura 6**, pero en este caso la cinética de crecimiento se realizó a 30°C.

Otra metodología empleada para determinar la tolerancia a diferentes pHs, fue el registro de la Abs_{600} tras 24h de incubación a 37°C en los medios estudiados, que en este caso se realizó con mayor volumen de cultivo y en un agitador orbital a 180 rpm.

Para comparar la tolerancia a diferentes pHs, se normalizó los resultados de los diferentes aislados respecto al crecimiento de la cepa *Sbp*, en las mismas condiciones de cultivo. A 37°C en medio YPD (pH 5,95) la mayoría de los aislados de masa madre crecen de forma similar al control, excepto *W. anomalus* que mostró un claro defecto, un resultado que se acrecentó a pHs más bajos (**Figura 8**). Respecto a la otra levadura no-convencional, indicar que *P. anomala* presenta sensibilidad a pH ácidos, mientras a pH 7,2 esta tendencia se invierte respecto a la cepa control. Cuatro de los aislados de *S. cerevisiae* (S06, Sc31, Sc51 y Sc129) exhibieron un menor crecimiento (aproximadamente un 25 % inferior) a pH 3,0, que va mejorando con el incremento del pH del medio, excepto para la cepa Sc31 que en todas las condiciones ensayadas presentó un crecimiento menor al de la cepa control. Por su parte, destacar el comportamiento de los aislados Sc13 y Sc131, que mostraron una mayor tolerancia que la cepa control de *S. boulardii* en el rango de pH 3,0-3,5 (**Figura 8**).

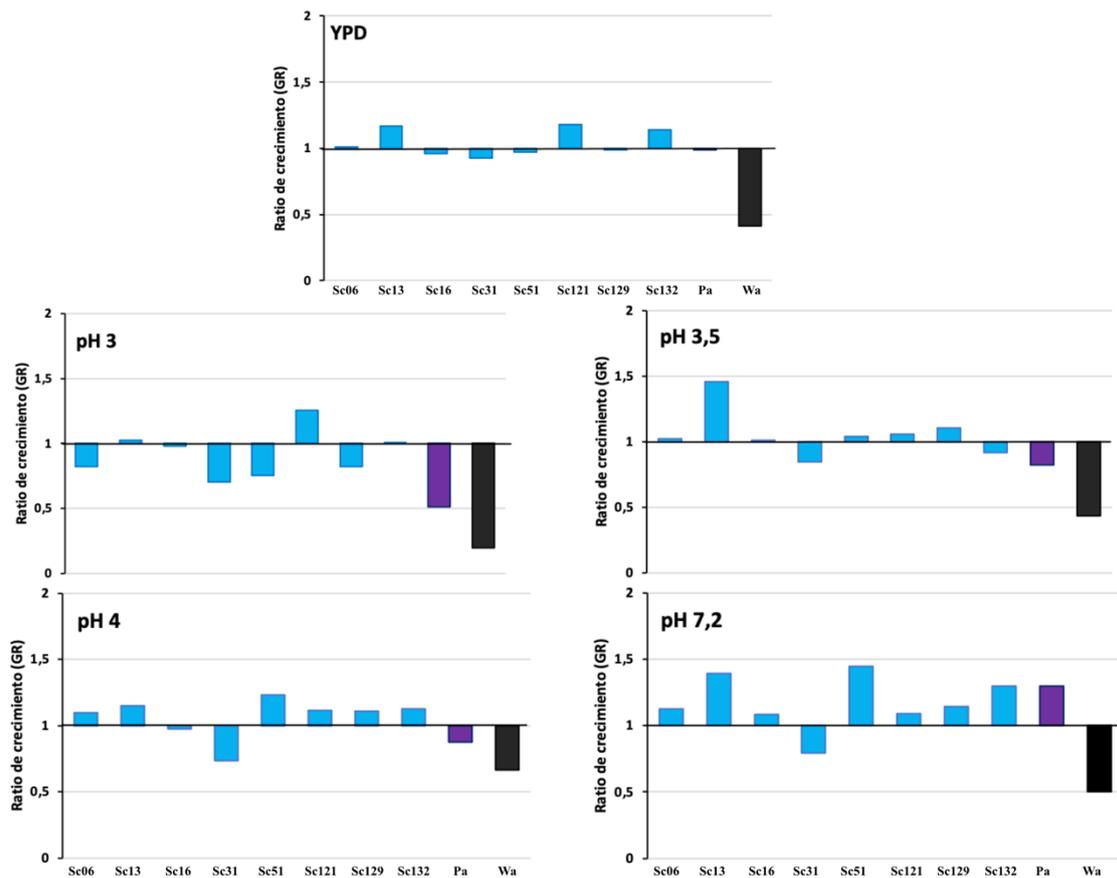


Figura 8. Comparación del crecimiento a diferentes pHs de aislados de masa madre frente a la cepa probiótica control. Tras registrar la Abs_{600} de cultivos en YPD a diferentes pHs, incubados a 37°C durante 24 h, se calculó el ratio de crecimiento de cada cepa frente al control en las mismas condiciones de cultivo. En azul se representan los valores para las cepas *S. cerevisiae* indicadas en la figura y en morado y negro las correspondientes a las cepas de *P. anomala* y *W. anomalus* respectivamente.

Los resultados obtenidos suscitaron una cuestión al margen del objetivo específico de este trabajo, que se decidió abordar para discernir entre tolerancia a pH bajo y tolerancia a ácidos. La colección de levaduras de este trabajo se corresponde con aislados de masas madre, nicho en el que estas levaduras están expuestas a la presencia de ácido láctico y acético (Lau *et al.*, 2021) que dan lugar a un pH entorno a 3,5-4,0.

4.6. Tolerancia a ácidos.

En este apartado del trabajo, se comparó la capacidad de proliferación en medios de cultivo conteniendo ácido acético, láctico o una mezcla de ambos. Señalar que la presencia de estos ácidos en masas madre ayuda a inhibir el crecimiento de organismos competidores (Perricone *et al.*, 2014), haciendo de esta propiedad un rasgo adicional interesante.

Una vez calculado el tiempo de generación, para aquellas levaduras termo-tolerantes de la colección bajo estudio, se procedió a representar dichos datos a través de un heatmap (**Figura 9**)

El heatmap refleja que la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* toleran los ácidos de forma similar, mostrando un buen crecimiento en todas las condiciones, lo que da lugar a una única agrupación y muy próxima a la cepa Sc31, que al ser incapaz de crecer en mezclas de láctico con acético se separa de este cluster. La levadura probiótica aparece en el heatmap en un brazo independiente del cluster jerárquico, ya que su tiempo de generación en estas condiciones de cultivo es entre 2 y 7 veces superior al de los aislados de masas madre.

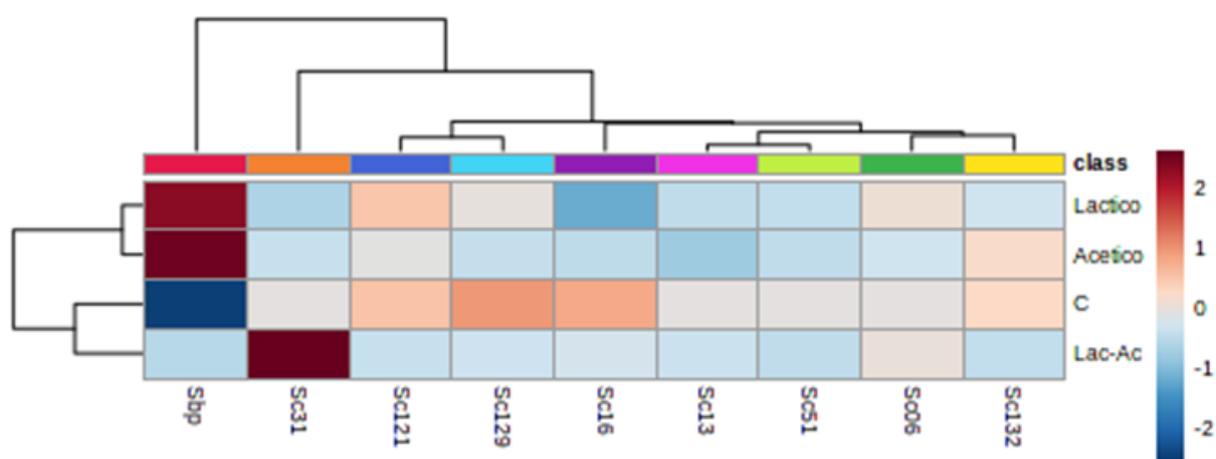


Figura 9. Tolerancia a ácidos de aislados de masa madre. Cultivos saturados de levadura, se utilizaron como preinóculo para seguir sus curvas de crecimiento a 37°C en medio YPD con adición de 60 mM de acético o 300 mM de láctico o una mezcla de 20 mM de acético más 200 mM de láctico. Tras calcular el tiempo de generación de cada levadura en cada condición de cultivo, los datos se analizaron en la plataforma MetaboAnalyst (MetaboAnalyst.ca, 2023).

De manera similar a lo descrito en el apartado anterior, para comparar la tolerancia a ácidos de los aislados, se normalizó los valores de Abs_{600} alcanzados tras 24 h de incubación, frente a los de la cepa control en cada medio ensayado (**Figura 10**). Como cabía esperar, todas las cepas de *S. cerevisiae* exhibieron una mayor tolerancia a ácidos, tanto láctico o acético, que la cepa de referencia; mientras que la mezcla de láctico y acético confirió sensibilidad a la cepa Sc31.

En cuanto a los aislados de Pa y Wa aunque estos provienen de masas madre, cuando se inocularon en un medio de laboratorio con adición de ácidos, mostraron una clara sensibilidad a la presencia de estos compuestos. Para explicar este resultado hay que tener en cuenta la baja actividad de agua que hay en una masa madre en comparación con los medios de cultivo utilizados en este trabajo. Por tanto, en una masa madre la difusión de estos ácidos es inferior, lo que favorece la presencia de levaduras con reducida tolerancia. Además, recordar que los experimentos se han llevado a cabo a 37°C, temperatura a la que la cepa Wa ya mostró cierta sensibilidad (**Figura 1 y Figura 10**).

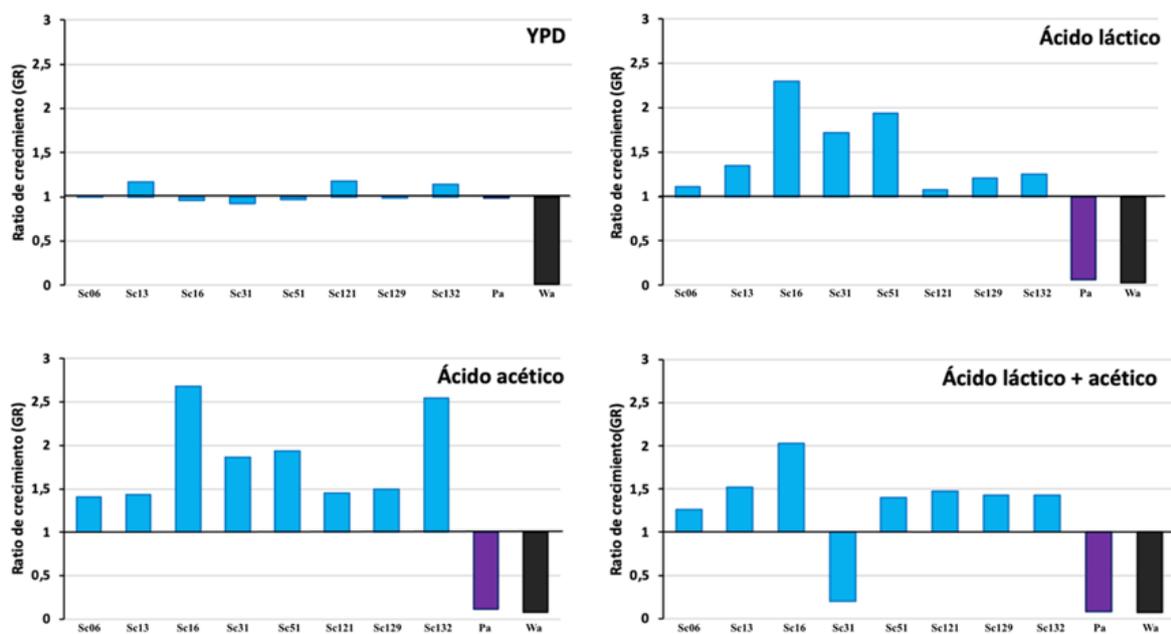


Figura 10. Comparación del crecimiento en presencia de ácidos orgánicos de aislados de masa madre frente a la cepa probiótica control. Tras registrar la Abs₆₀₀ de cultivos en YPD a diferentes ácidos, incubados a 37°C durante 24 h, se calculó el ratio de crecimiento de cada cepa frente al control en las mismas condiciones de cultivo. En azul se representan los valores para las cepas *S. cerevisiae* indicadas en la figura y en morado y negro las correspondientes a las cepas de *P. anomala* y *W. anomalus* respectivamente.

4.7. Resistencia al paso por el tracto gastrointestinal.

Los microorganismos probióticos necesitan atravesar el tracto gastrointestinal para ejercer su función en el intestino, por lo que además de tolerar condiciones ácidas deben también resistir las sales biliares. La bilis tiene un pH alcalino para neutralizar el ácido estomacal y funciona como agente emulsionante que facilita la actividad de lipasas pancreáticas, además se le atribuye actividad bactericida (Merritt and Donaldson, 2009; Menezes *et al.*, 2019).

Como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, la simulación del paso de microorganismos por el tracto gastrointestinal se ha realizado en dos etapas, la segunda de las cuales consiste en el seguimiento de la proliferación de las levaduras durante 24 h en presencia de sales biliares, lo que permitió calcular el tiempo de generación para cada levadura bajo estudio en estas condiciones (**Figura 11**). Las cepas del género *Saccharomyces* presentaron un tiempo de generación en el intervalo de 4 a 7 h, excepto la cepa Sc121 que es de 11,5 h; lo que sugiere una menor tolerancia a las sales biliares por parte de esta levadura. Las cepas Wa y Pa mostraron un tiempo de generación similar al del aislado Sc121, aunque no se puede descartar que este resultado sea consecuencia del defecto de crecimiento a 37°C de la cepa de Wa.

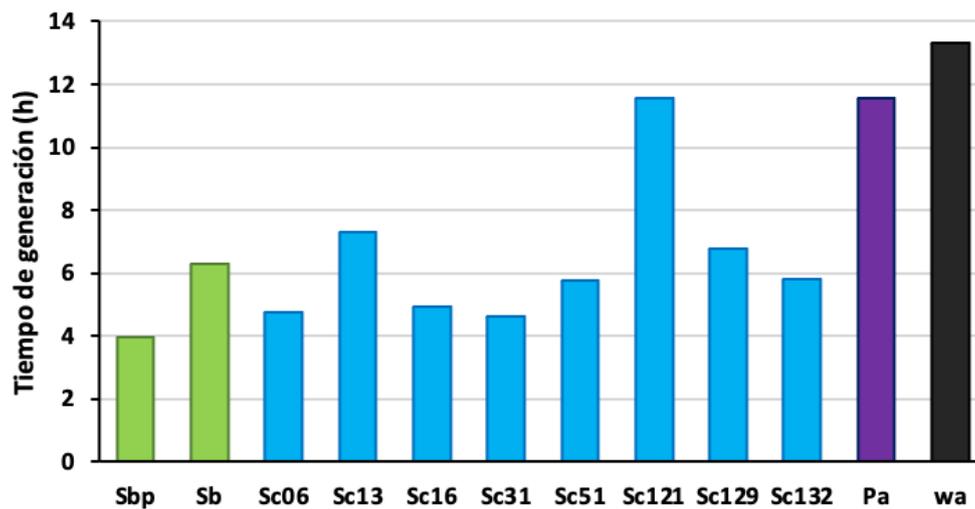


Figura 11. Tolerancia al paso por el tracto gastrointestinal de aislados de masa madre. Tiempo de generación calculado para las cepas termo-tolerantes de este estudio, tras ser expuestas a ácido durante 3h, seguido de un tratamiento con sales biliares a 37°C durante 24h.

4.8 Capacidad antioxidante:

Una de las características funcionales de mayor interés cuando se trabaja con aislados de masa madre, es su capacidad antioxidante.

Para poder comparar esta propiedad entre los diferentes aislados, los resultados se normalizaron respecto al peso seco de cada aislado, cuyos valores se recogen en el **anexo 5**.

Existen numerosas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de un microorganismo y la combinación de resultados de 3 o más de dichas técnicas, aportan las evidencias suficientes para establecer el nivel de esta actividad para cada cepa. En este trabajo, se ha puesto a punto la metodología

para determinar la reducción o captación de radicales libres por parte de DPPH, siguiendo el protocolo propuesto por Ye *et al.*, (2020) con ligeras modificaciones. En la **Figura 12** se muestran los resultados de la actividad antioxidante, expresados como mg de equivalentes de Trolox/mg levadura (peso seco).

En general las cepas de género *Saccharomyces* tienen una capacidad antioxidante mayor que el resto de géneros ensayados (de 3 a 5 mg de Trolox/mg levadura p.s.), destacando la cepa Sc51 que exhibió el valor más elevado ($6,59 \pm 0,59$ mg de Trolox/mg levadura p.s.), lo que supone un incremento aproximadamente de un 25 % respecto a la actividad antioxidante detectada en la cepa de referencia ($5,14 \pm 0,19$ mg de Trolox/mg levadura p.s.). Respecto a las levaduras no convencionales, merece la pena destacar a *W. anomalus*, la cual presentó valores similares a los controles. Este resultado contrasta con trabajos anteriores de otros autores donde sugieren que *W. anomalus* presenta ciertas propiedades probióticas interesantes ligadas a una elevada capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Helmy *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Si bien los datos obtenidos son preliminares, estos sugieren que las cepas Wa, Sc06, Sc16, Sc51, Sc121, Sc129 y Sc132, son buenas candidatas para seguir con una determinación más completa de su actividad antioxidante.

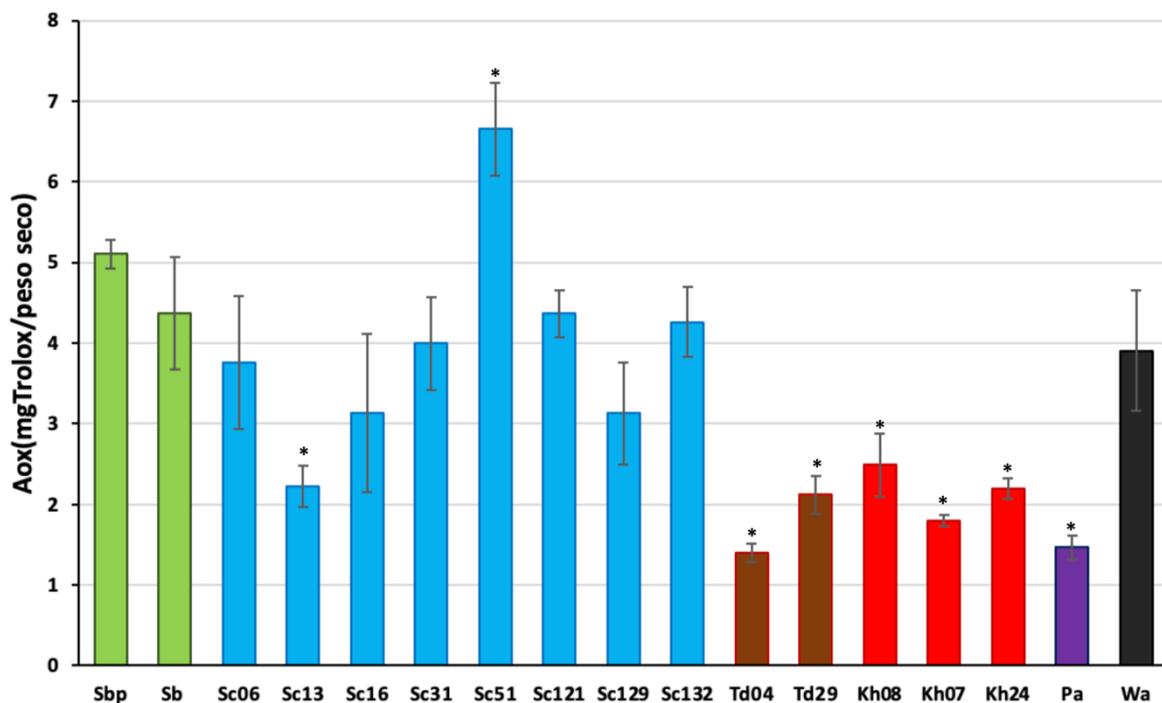


Figura 12. Capacidad antioxidante de aislados de masa madre. La gráfica recoge los valores de actividad antioxidante, expresada como equivalentes Trolox/mg levadura p.s.; Las barras verdes se corresponden con las cepas de referencia *S. boulardii* (Sb y Sbp), las azules a los aislados de *S. cerevisiae* indicados en la figura, las marrones de *T. delbruekii*, las naranjas de *K. humilis*, morado con *P. anomala* y negro con *W. anomalus*. Los resultados significativos, p-value < 0,01 se expresaron en el gráfico como (*).

5. Conclusiones:

- Las cepas non-*Saccharomyces* analizadas en este estudio, presentan en general propiedades alejadas de los estándares considerados como adecuados para un organismo probiótico.

-Por el contrario, las cepas Sc06, Sc51, Sc121 y Sc129 exhiben características fisiológicas en línea con esta propiedad. En particular, la cepa Sc51 muestra valores superiores de actividad antioxidante, tolerancia a ácidos y resistencia al paso por el tracto gastrointestinal, respecto a los observados para las cepas de referencia de *S. boulardii*.

6. Bibliografía:

ALMEIDA, M., and PAIS, C. (2008). Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Letters in Applied Microbiology*, 23(3), 154-158. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1996.tb00053.x>

ÁLVAREZ, J., REAL, J. A., GUARNER, F., GUEIMONDE, M., RODRÍGUEZ, J. M., DE PIPAON, M. S., and SANZ, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44(7), 519-535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>

ARÉVALO-VILLENA, M., FERNÁNDEZ-PACHECO, P., CASTILLO, N. G., BEVILACQUA, A., and PÉREZ, A. G. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 89, 657-665. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.047>

BEVILACQUA, A., PERRICONE, M., CANNARSI, M., CORBO, M. R., AND SINIGAGLIA, M. (2009). Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(11), 2198-2207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02060.x>

BIGEY, F., SEGOND, D., FRIEDRICH, A., GUEZENEC, S., BOURGAIS, A., HUYGHE, L., AGIER, N., NIDELET, T., and SICARD, D. (2021). Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes. *Current Biology*, 31(4), 722-732.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.016>

BUTEL, M. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>

BUTS, J., BERNASCONI, P., VAERMAN, J., and DIVE, C. (1990). Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive Diseases and Sciences*, 35(2), 251-256. <https://doi.org/10.1007/bf01536771>

BUTS, J., DE KEYSER, N., MARANDI, S., HERMANS, D., SOKAL, E., CHAE, Y. E., LAMBOTTE, L., CHANTEUX, H., and TULKENS, P. M. (1999). *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut*, 45(1), 89-96. <https://doi.org/10.1136/gut.45.1.89>

BUTS, J., DE KEYSER, N., STILMANT, C., DELEM, E., SMETS, F., and SOKAL, E. (2006). *Saccharomyces boulardii* Produces in Rat Small Intestine a Novel Protein Phosphatase that Inhibits *Escherichia coli* Endotoxin by Dephosphorylation. *Pediatric Research*, 60(1), 24-29. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000220322.31940.29>

CAPECE, A., ROMANIELLO, R., PIETRAFESA, A., SIESTO, G., PIETRAFESA, R., ZAMBUTO, M., and ROMANO, P. (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028>

CHELLIAH, R., RAMAKRISHNAN, S. R., PRABHU, R., and ANTONY, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401. <https://doi.org/10.1002/yea.3181>

CHEN, L., MA, Y., MAUBOIS, J., CHEN, L., LIU, Q., and GUO, J. (2010). Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 47-54. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00548.x>

CZERUCKA, D., PICHE, T., and RAMPAL, P. (2007). Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and therapeutics*, 26(6), 767-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>

CZERUCKA, D., and RAMPAL, P. (2019). Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. *World Journal of Gastroenterology*, 25(18), 2188-2203. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i18.2188>

D'ARGENIO, V., and SALVATORE, F. (2015). The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*, 451, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>

DE ALMADA, C. N., MARTINEZ, R. C. R., and SANT'ANA, A. S. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4175-4199. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6582-5>

Evolución del Mercado de la Farmacia Española (febrero, 2023). IQVIA. <https://www.iqvia.com/es-es/locations/spain/library/publications/evolucion-del-mercado-de-la-farmacia-espanola-con-datos-de-febrero-2023>.

FADDA, M. E., MOSSA, V., DEPLANO, M., PISANO, M. B., and COSENTINO, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 75, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020>

FERNÁNDEZ-PACHECO, P., MONGE, I. M. R., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., POVEDA, J., and ARÉVALO-VILLENA, M. (2021). Safety Evaluation of Yeasts With Probiotic Potential. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.659328>

FU, J., LIU, J., WEN, X., ZHANG, G., CAI, J., ZONGWEI, Q., AN, Z., ZHENG, J., and LI, L. (2022). Unique Probiotic Properties and Bioactive Metabolites of *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09953-1>

GANGULY, N. K., BHATTACHARYA, S., SESIKERAN, B., NAIR, G. B., RAMAKRISHNA, B. S., SACHDEV, H. P. S., BATISH, V. K., KANAGASABAPATHY, A. S., MUTHUSWAMY, V., KATHURIA, S., KATOCH, V. M., SATYANARAYANA, K., TOTEJA, G. S., RAHI, M., RAO, S., BHAN, M. K., KAPUR, R., and HEMALATHA, R. (2011). ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *Indian Journal of Medical Research*, 134(1), 22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171912/>

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y., RODRÍGUEZ, Z., BRANDÃO, L. P. M., ROSA, C. A., NICOLI, J. R., IGLESIAS, A. E., PÉREZ-SÁNCHEZ, T., SALABARRÍA, R. B., and HALAIHEL, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 798-802. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.005>

GIBSON, G. R., HUTKINS, R. W., SANDERS, M. E., PRESCOTT, S. L., REIMER, R. A., SALMINEN, S., SCOTT, K. P., STANTON, C., SWANSON, K. S., CANI, P. D., VERBEKE, K., and REID, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

HARDING, M. E., MARQUES, L. L., HOWARD, R. A., and OLSON, M. E. (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology*, 17(11), 475-480. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>

HATOUM, R., LABRIE, S., and FLISS, I. (2012). Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>

HELMY, E. A., SOLIMAN, S. A., ABDEL-GHANY, T. M., and GANASH, M. (2019). Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese. *Heliyon*, 5(5), e01649. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01649>

HERNANDEZ-LOPEZ, M. J., PRIETO, J. L., and RANDEZ-GIL, F. (2003). Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 84(2), 125-134. <https://doi.org/10.1023/a:1025413520192>

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H. J., SALMINEN, S., CALDER, P. C., and SANDERS, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

ILAVENIL, S., VIJAYAKUMAR, M., KIM, D. S., ARASU, M. V., PARK, H., RAVIKUMAR, S., and CHOI, K. C. (2015). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 593-601. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7128>

JACQUES, N., SARILAR, V., URIEN, C., LOPES, M. S., MORAIS, C. G., UETANABARO, A. P. T., TINSLEY, C., ROSA, C. A., SICARD, D., and CASAREGOLA, S. (2016). Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5192-5200. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001495>

KERRY, R. G., PATRA, J. K., GOUDA, S., PARK, Y., SHIN, H., and DAS, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>

KHATRI, I., TOMAR, R., GANESAN, K., PRASAD, G., and SUBRAMANIAN, S. (2017). Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00414-2>

KONG, I. D., TURNER, T., KIM, H. J., KIM, S., and JIN, Y. (2018). Phenotypic evaluation and characterization of 21 industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Fems Yeast Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy001>

LAU, S. T., CHONG, A. Q., CHIN, N. L., TALIB, R. A., and BASHA, R. K. (2021). Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms*, 9(7), 1355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>

LAZO-VÉLEZ, M. A., SERNA-SALDÍVAR, S. O., ROSALES-MEDINA, M. A., TINOCO-ALVEAR, M., and BRIONES-GARCIA, 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>

LONGORIA-GARCÍA, S., CRUZ-HERNANDEZ, M., FLORES-VERÁSTEGUI, M. I. M., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., MONTAÑEZ-SAÉNIZ, J. C., and BELMARES, R. (2018). Potential functional bakery products as delivery systems for prebiotics and probiotics health enhancers. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 833-845. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2987-8>

MALLAPPA, R. H., SINGH, D., ROKANA, N., PRADHAN, D., BATISH, V. K., and GROVER, S. (2019). Screening and selection of probiotic Lactobacillus strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 105, 272-281. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.002>

MARKOWIAK-KOPEĆ, P., AND ŚLIŹEWSKA, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>

MCFARLAND, L. V. (2015). From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl 2), S85-S90. <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>

MENEZES, A. C., RAMOS, C. L., CENZI, G., DE SOUSA MELO, D., DIAS, D. R., and SCHWAN, R. F. (2019). Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 280-288. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9518-z>

MERRITT, M. E., and DONALDSON, J. R. (2009). Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 58(12), 1533-1541. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.014092-0>

MetaboAnalyst. (2023). <https://www.metaboanalyst.ca/>

ORŁOWSKI, A., and BIELECKA, M. (2006). Preliminary characteristics of Lactobacillus and Bifidobacterium strains as probiotic candidates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15(3), 269-275. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063223518>

PAIS, P., ALMEIDA, V., YILMAZ, M., and TEIXEIRA, M. (2020). *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *Journal of Fungi*, 6(2), 78. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>

PERRICONE, M., BEVILACQUA, A., CORBO, M. R., and SINIGAGLIA, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.006>

PHONG, H. X., KLANRIT, P., DUNG, N. T., YAMADA, M., and THANONKEO, P. (2019). Isolation and characterization of thermotolerant yeasts for the production of second-generation bioethanol. *Annals of Microbiology*, 69(7), 765-776. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01468-5>

PINEIRO, M., ASP, N., REID, G., MACFARLANE, S., MORELLI, L., BRUNSER, O., and TUOHY, K. (2008). FAO Technical Meeting on Prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(Supplement 3), S156-S159. <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e31817f184e>

PSANI, M., and KOTZEKIDOU, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1329-1336. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9180-y>

QAMAR, A. A., ABOUDOLA, S., WARNY, M., MICHETTI, P., POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J. T., and KELLY, C. P. (2001). *Saccharomyces boulardii* Stimulates Intestinal Immunoglobulin A Immune Response to *Clostridium difficile* Toxin A in Mice. *Infection and Immunity*, 69(4), 2762-2765. <https://doi.org/10.1128/iai.69.4.2762-2765.2001>

REYNOLDS, T. B., and FINK, G. R. (2001). Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. *Science*, 291(5505), 878-881. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878>

RIVERA-ESPINOZA, Y., and GALLARDO-NAVARRO, Y. T. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>

RODRÍGUEZ, P., ARÉVALO-VILLENA, M., ROSA, I. M., and PÉREZ, A. G. (2018). Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Research International*, 112, 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.008>

Saccharomyces Genome Database. (2023). <https://www.yeastgenome.org/locus/S000001458>

SALMINEN, S., COLLADO, M. C., ENDO, A., HILL, C., LEBEER, S., QUIGLEY, E. M., SANDERS, M. E., SHAMIR, R., SWANN, J. R., SZAJEWSKA, H., and VINDEROLA, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *nature reviews gastroenterology & hepatology*, 18(9), 649-667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

SÁNCHEZ-ADRIÁ, I. E., SANMARTÍN, G., PRIETO, J. A., ESTRUCH, F., FORTIS, E., and RANDEZ-GIL, F. (2023). Technological and acid stress performance of yeast isolates from industrial sourdough. *LWT- Food Science and Technology*, 114957. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114957>

SIESTO, G., PIETRAFESA, R., INFANTINO, V., THANH, C., PAPPALARDO, I., ROMANO, P., and CAPECE, A. (2022). In Vitro Study of Probiotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities

among Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Foods*, 11(9), 1342.

<https://doi.org/10.3390/foods11091342>

SPERANZA, B., CORBO, M. R., CAMPANIELLO, D., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., and BEVILACQUA, A. (2020). Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology*, 87, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103393>

STANISZEWSKI, A., and KORDOWSKA-WIATER, M. (2021). Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods*, 10(6), 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>

SUEZ, J., ZMORA, N., SEGAL, E., and ELINAV, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, 25(5), 716-729. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>

Ultra Levura, para qué sirve y cómo tomarlo | *Ultra Levura*. (2022, 21 septiembre). Ultra Levura.

<https://www.ultralevura.com/gama/>

Vademecum, (2015). www.vademecum.es. <https://www.vademecum.es/principios-activos-kanamicina-j01gb04-us>

VALDÉS-VARELA, L., GUEIMONDE, M., and RUAS-MADIEDO, P. (2018). Probiotics for Prevention and Treatment of *Clostridium difficile* Infection. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 161-176). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_10

WNUK, M., PANEK, A. D., GOLEC, E., MAGDA, M., DEREGOWSKA, A., ADAMCZYK, J., and LEWINSKA, A. (2015). Genetic profiling of yeast industrial strains using in situ comparative genomic hybridization (CGH). *Journal of Biotechnology*, 210, 52-56.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.407>

YE, S., SHEN, F., JIAO, L., XU, Z., and WANG, F. (2020). Biosynthesis of selenoproteins by *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of its antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3438-3445. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.144>

ZHANG, Y., LIU, H., YUE, Z., TAN, P., SUN, M., JI, L., BAI, Y., and MA, X. (2022). *Wickerhamomyces anomalus* relieves weaning diarrhea via improving gut microbiota and redox

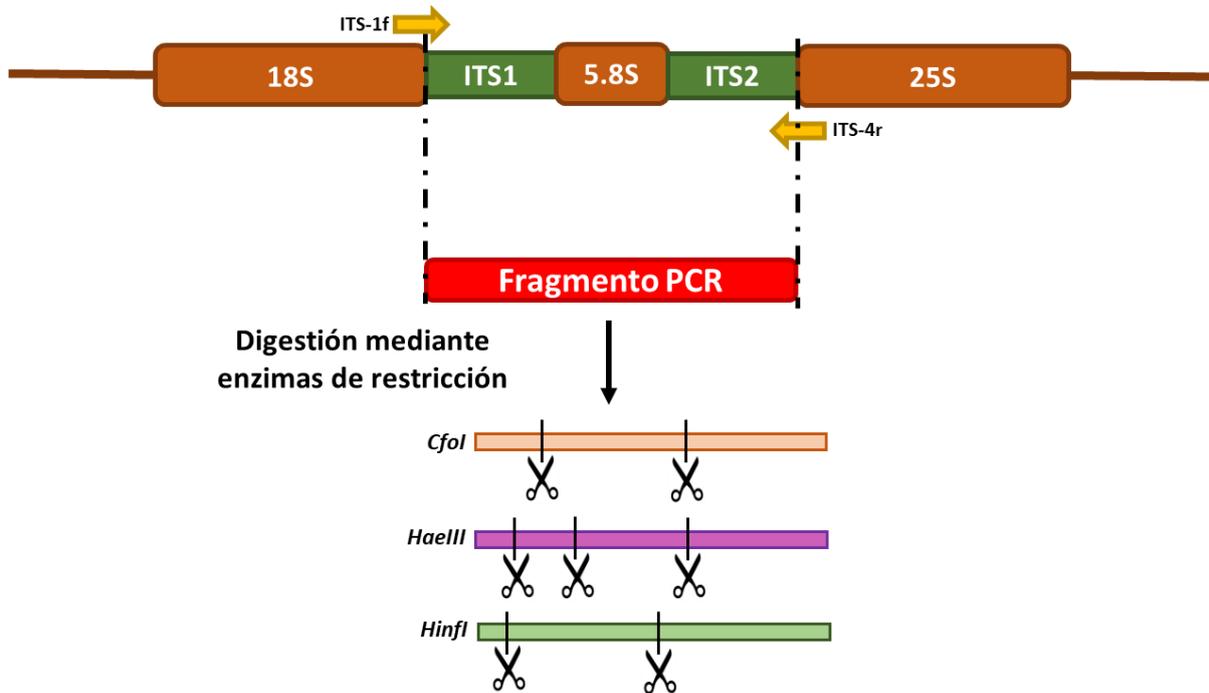
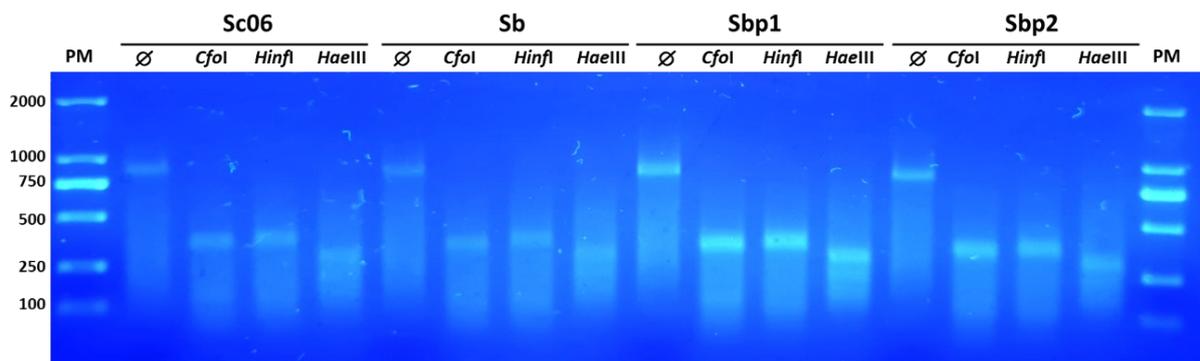
homeostasis using a piglet model. *Food & Function*, 13(21), 11223-11235.

<https://doi.org/10.1039/d2fo01861f>

8. Anexos.

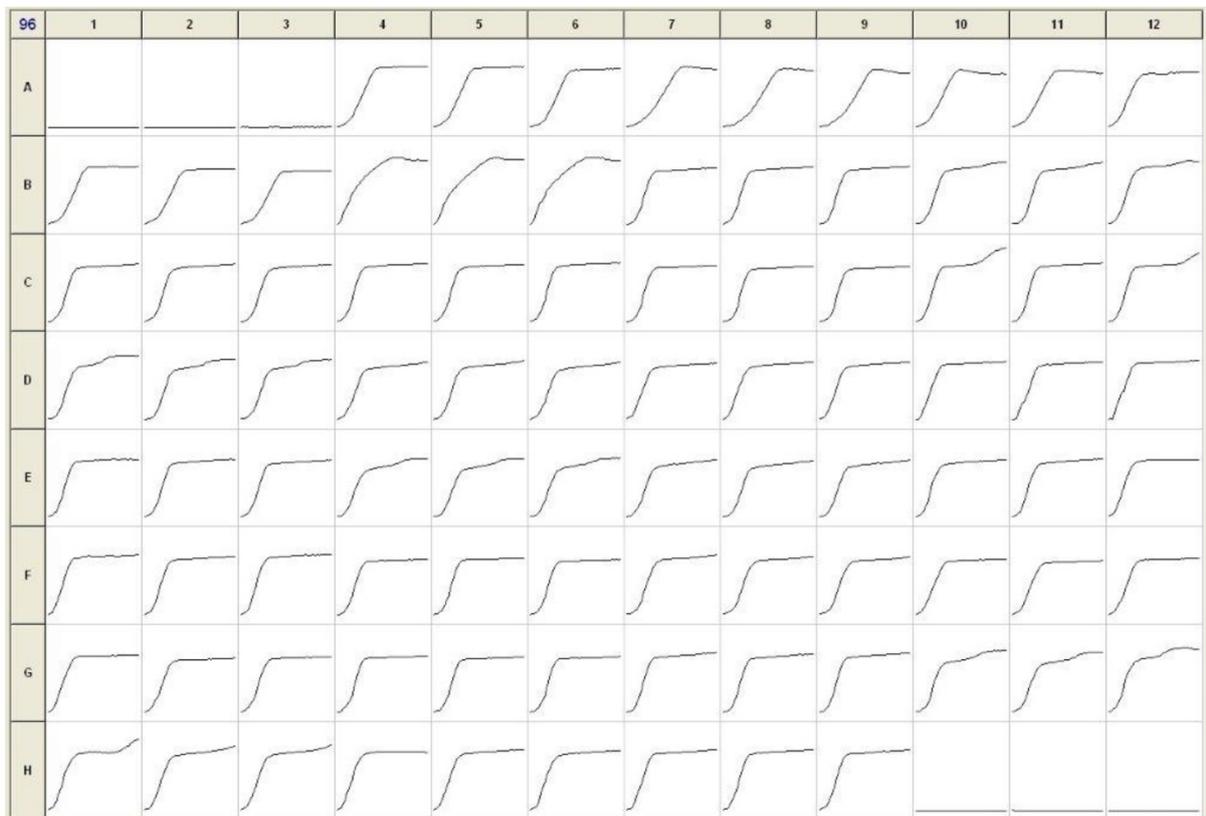
Anexo 1. Objetivo de Desarrollo Sostenible 3 Salud y Bienestar. Este trabajo se relaciona con el objetivo de desarrollo sostenible 3 salud y bienestar de la agenda de 2030 ya que la intención del trabajo es la de evaluar cepas con potencial probiótico que puedan actuar para la obtención de un beneficio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

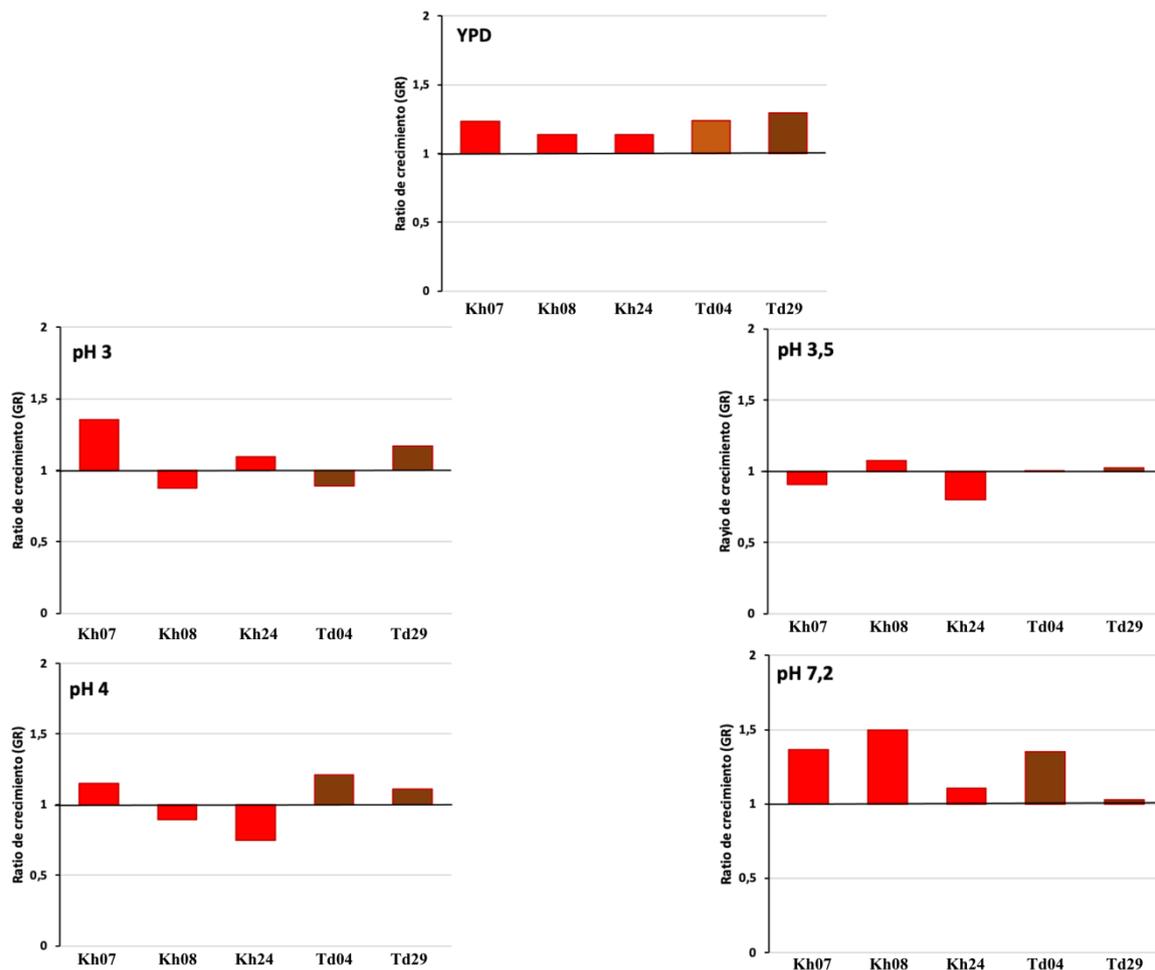
El patrón de fragmentos de restricción es igual en las cuatro cepas analizadas, verificando que los aislados pertenecen a la misma especie (*S. cerevisiae*). Para determinar con exactitud si son var. *boulardii* se ha enviado el fragmento de ITS amplificado, al servicio de secuenciación de la Universidad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