



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS
DEL PULQUE CON POSIBLE CAPACIDAD PROBIÓTICA**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

MENDOZA GARDEAZÁBAL ANA SELENE

Bajo la Dirección de:

Dr. Becerril Flores Marco Antonio

Codirector de Tesis

Dr. Julio César Carrero Sánchez



Pachuca, Hgo. Julio 2010

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo de investigación no hubiera sido posible.

Al Dr. Marco Antonio Becerril Flores, director del proyecto, muchas gracias por todo el apoyo, la paciencia, la amistad y por todo lo que me ha enseñado a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez codirector del proyecto, por toda la paciencia, y las enseñanzas, la confianza, y la amistad, y por haber formado una parte importante en el presente trabajo y en mi formación, un honor haber aprendido tanto.

A los integrantes del laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la UNAM: Oscar, Hugo, María, Paty, Gaby, Juliet, por toda su paciencia, y todo lo que me enseñaron.

A los integrantes del laboratorio de Histología de la UAEH, Dalila, por tu paciencia y por todo lo que me enseñaste, Suzel gracias por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Briney, Maria Elena, Fernando, por todo su cariño, consejos y apoyo, no se que haría sin ustedes, no solamente en este momento, sino en todo momento.

Y sobretodo a quienes son mi principal soporte y orgullo en la vida, porque nunca podré terminar de agradecer todo el esfuerzo y la dedicación, y que todo lo que hago es por ustedes... mi familia, José Luis, Ana Luisa y José Luis.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	3
ABREVIATURAS	5
1. RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1. PULQUE	8
1.1.1. Historia del pulque	8
1.1.2. Proceso de elaboración del pulque.....	9
1.1.2.1. Maguey Pulquero.....	10
1.1.2.2. Fermentación	10
1.1.3. Características del pulque y su uso	11
1.1.3.1. Físicas	11
1.1.3.2. Químicas.....	11
1.1.4. El pulque como alimento.....	11
1.1.5. El pulque como aporte nutritivo	12
1.1.6. El pulque como bebida intoxicante	12
1.1.7. Zonas Geográficas de principal producción	13
1.1.8. Microorganismos en el pulque	13
1.2. PROBIÓTICOS	14
1.2.1. Mecanismos de acción de los probióticos.....	16
1.2.2. Criterios para evaluar la capacidad probiótica de un microorganismo.....	17
1.2.2.1. Resistencia a las sales biliares	17
1.2.2.2. Tolerancia al pH estomacal	18
1.2.2.3. Resistencia a jugos gástricos	18
1.2.2.4. Adhesión celular	18
1.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	19
1.3.1. Tinción de gram	19
1.4. TÉCNICAS PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA.....	20
1.4.1. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	20
1.4.1.1. Secuenciación de ADN a partir del PCR.....	22
1.4.2. Pruebas bioquímicas de identificación microbiana	23
1.4.2.1. Kit API 20 C AUX.....	23
2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	24
2.1. PROBIOTICOS EN EL PULQUE	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. OBJETIVO	28

5.1. OBJETIVO GENERAL	28
5.1.1. Objetivos específicos	28
6. HIPÓTESIS	28
7. METODOLOGÍA	29
7.1. SITIOS DE ORIGEN Y MUESTREO DEL PULQUE.....	29
7.2. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR TECNICAS MOLECULARES.....	29
7.2.1. Extracción y purificación de ADN total bacteriano	29
7.2.2. Amplificación del gen de la subunidad ribosomal 16S	30
7.2.3. Purificación del producto de PCR	31
7.2.4. Secuenciación de productos de PCR	32
7.3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL AISLADO 69 MEDIANTE EL KIT API 20 C AUX	32
7.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DEL AISLADO 69 MEDIANTE TRES CRITERIOS DE EVALUACIÓN.....	33
7.4.1. Prueba de resistencia a sales biliares.....	33
7.4.2. Estabilidad al pH del estómago.....	34
7.4.3. Resistencia a jugo gástrico	34
7.5. CUADRO DE DISEÑO METODOLÓGICO	35
8. RESULTADOS.....	37
8.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ALGUNOS DE LOS MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE PRODUCIR ÁCIDO ASCÓRBICO	37
8.1.1. Identificación completa de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	38
8.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL AISLADO A69	40
8.3. PRUEBAS DE CAPACIDAD PROBIÓTICA	40
8.3.1. Resistencia a Sales biliares	40
8.3.2. Resistencia a pH estomacal	41
8.3.3. Resistencia al jugo gástrico	41
9. DISCUSIÓN	43
10. CONCLUSIONES	47
11. BIBLIOGRAFÍA	48
12. ANEXO	56

ABREVIATURAS

µL	Microlitros
A	Adenina
ADN	Acido Desoxirribonucleico
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotids
C	Citosina
cm	Centímetros
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
G	Guanina
g	Gramo
HCl	Ácido Clorhídrico
hrs	Horas
Kcal	Kilocaloría
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minutos
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pmoles	Picomoles
rARN	Ácido Ribonucleico Ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
T	Timina
UFC	Unidades formadoras de colonia
YPG	Yest Peptone Glucose (Levadura, Glucosa, Peptona)

1. RESUMEN

El pulque se considera una bebida fermentada obtenida a partir del aguamiel, que a su vez, se obtiene del maguey pulquero (*Agave salmiana*). Su consumo forma parte de la alimentación cotidiana principalmente en poblaciones de recursos limitados, siendo el estado de Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México, Puebla, San Luís Potosí, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato y Zacatecas los principales lugares donde se produce y se consume. Respecto al aporte nutritivo de esta bebida, se han hecho estudios que demuestran la existencia de nutrimentos y microorganismos con capacidad probiótica parcial, es decir que cumplen con al menos un criterio de varios para ser considerado como probiótico; entre los criterios utilizados en esta investigación se encuentran, la resistencia a pH estomacal, sales biliares y jugo gástrico, sin embargo no se han realizado estudios para determinar a los microorganismos responsables de dicha actividad. En el presente trabajo, se identificó varios de los microorganismos presentes en el pulque y se evaluó su capacidad probiótica, al menos parcial. Para este propósito se obtuvieron muestras de pulque de tres municipios del estado de Hidalgo (El Arenal, Mineral de la reforma y Tula de Allende), de las cuales 7 microorganismos se identificaron parcialmente mediante técnicas moleculares y bioquímicas. Posteriormente, se determinó si cumplían algún criterio para ser considerados como probióticos. En resumen, se identificó un microorganismo que corresponde a una levadura perteneciente a la especie *Kluyveromyces marxianus*, la cual mostró ser resistente a las tres pruebas para determinar su capacidad probiótica: crecimiento a pH entre 1.5 y 4.0, tolerancia a los jugos gástricos hasta por 4 h y tolerancia a sales biliares hasta una concentración de 0.3%; en todos los casos la levadura resistió estas condiciones hasta diluciones de 1×10^{-6} UFC. Los resultados demuestran la presencia de *K. marxianus* como posible probiótico aislado del pulque.

Palabras clave: pulque, microorganismos, genes ribosomales, actividad probiótica.

ABSTRACT

Pulque is considered a fermented beverage from aguamiel, which is obtained from the maguey pulquero (*Agave salmiana*). Its consumption is part of the daily diet, specially in populations with limited resources, with the states of Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México, Puebla, San Luis Potosí, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato and Zacatecas the principal places where the pulque is produced and consumed. Regarding the nutritional content of the drink, there have been studies that show the existence of nutrients and microorganisms with partial capacity as a probiotic, in fact they fulfill at least one criteria of several to be considered as a probiotic. Among the most used criteria, in this study has been evaluated the resistance to stomach pH, bile salts tolerance, and stomach juices tolerance, nonetheless there is no studies to determinate the responsible microorganisms of this activity. In this study we identified a number of microorganisms presents in the pulque and evaluated their probiotic properties, at least partially. For this purpose, pulque samples were obtained from three regions from Hidalgo state. (El Arenal, Mineral de Reforma y Tula de Allende). All three pulque samples, 7 microorganisms were partial identified by molecular and biochemistry techniques. Subsequently were determined the probiotic properties of some of these microorganisms by tolerance pH tests, gastric juices and bile salts. In summary one microorganism was identified that corresponds to a yeast belonging to the species *Kluyveromyces marxianus*, which one proved to be resistant to three tests to determine their probiotic partial properties: pH growth between 1.5 and 4.0; tolerance to gastric juices up to 4 h; and tolerance to bile salts with a concentration up 0.3%; in the three cases, the yeast resist the conditions up to dilutions of 1×10^6 UFC. The results demonstrate the presence of *K. marxianus* as a potential probiotic, isolated from pulque.

Keywords: Pulque, microorganisms, ribosomal genes, probiotics.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. PULQUE

El pulque es una bebida ancestral Mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel obtenida a partir de diferentes especies de maguey, principalmente el maguey pulquero (*Agave salmiana*). Esta bebida es consumida por distintas poblaciones, pero en su mayoría por aquella de recursos limitados. Se caracteriza por ser una bebida alcohólica blanca, con olor fuerte y viscosa (Peña y col., 2004). El proceso de fermentación del pulque se efectúa en la penca del maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de azúcares (Escalante y col., 2004).

1.1.1. Historia del pulque

En la época prehispánica, el pulque era conocido como bebida de los dioses ya que se concebía como bebida ritual y como ofrenda ceremonial para éstos (Delfín, 2004). Esta bebida era consumida exclusivamente por los gobernantes, sacerdotes, ancianos, y por las víctimas que iban a ser sacrificadas. Las mujeres solo lo podían consumir cuando estaban embarazadas o en periodo de lactancia; sin embargo, la embriaguez era penada con fuertes castigos, incluso la muerte (Camacho, 2005; Castillo y Leyva, 2001). Después de la época de la conquista, el pulque perdió tanto su concepto de divinidad como el simbolismo ceremonial y religioso sobre todo por la imposición de la religión católica por los españoles, quienes incluso invalidaron las sanciones por el alcoholismo injustificado. Debido a esto, la ingesta de pulque se convirtió en un verdadero problema de salud pública ya que su consumo se popularizó y generalizó, principalmente entre los indígenas dedicados a la servidumbre (Camacho, 2005; Castillo y Leyva, 2001). En la actualidad, a pesar de que el consumo ha sufrido una disminución progresiva y es concebida como bebida que solo es consumida entre la clase humilde y campesina, el pulque sigue siendo en muchos pueblos indígenas del centro del país, especialmente el Valle del

Mezquital, dentro del estado de Hidalgo, una bebida tradicional (Camacho, 2005; Castillo y Leyva, 2001; Delfín, 2004; Musacchio, 1999).

1.1.2. Proceso de elaboración del pulque

El agave utilizado en la elaboración del pulque es el conocido como “maguey pulquero”, el cual puede tardar hasta 10 años para estar maduro. El proceso inicia con el capado¹ y la planta se deja reposar durante 6 meses; después de éste tiempo, el tlaquichero² raspa el corazón de la planta para hacer un cajete³ donde se acumula el aguamiel; el cajete se raspa de 2 a 3 veces por día para eliminar tejidos muertos y dejar salir más aguamiel. El aguamiel se retira con un acocote⁴ y se deposita en el tinacal⁵ (Figura 1.1), y de ahí en barricas de cuero, roble o encino (actualmente se depositan en recipientes de plástico). En estos recipientes se deja por un lapso aproximado de 40 días, tiempo en el cual se lleva a cabo la fermentación natural inducida por la flora bacteriana del aguamiel. Cumplido este tiempo, se le empieza a agregar aguamiel poco a poco, aumentando la cantidad diariamente hasta llegar a los 60 días cuando ya se puede percibir el olor característico; éste se pasa a otro recipiente limpio donde se le agrega más aguamiel para que se siga fermentando. Para llevar a cabo una buena fermentación, los recipientes que contiene el aguamiel deben de estar a una temperatura ambiente, aproximadamente 20°C (Abundis, 2007; Anderson y cols., 1946; Cervantes, 2002; Madrigal, 1999).



Figura 1.1 Proceso de elaboración del pulque. (A) Raspado del cajete del maguey por el tlaquichero, (B) Extracción del aguamiel de la penca con el acocote, (C) Fermentación para producción del pulque. **Fuente:** SDR, 2997.

¹ Corte del conjunto de las pencas más tiernas del maguey.

² Persona encargada de raspar el corazón del maguey para extraer el aguamiel.

³ Hueco u hoyo en la tierra, que se utiliza para plantar. En este caso el cajete se hace en la propia planta.

⁴ Calabaza larga agujerada por ambos extremos que se usa para extraer por succión el aguamiel del maguey.

⁵ Instalación en donde el “mayordomo” o encargado lo vacían en tinas de madera.

1.1.2.1. Maguey Pulquero

Esta “bebida de dioses” solo puede ser obtenida a partir del agave conocido comúnmente como *maguey pulquero* (Figura 1.2), manso, o cenizo, perteneciente al género de los agaves que científicamente se les conoce como *A. salmiana*, *A. atrovirens karw*, *A. mapisaga* y *A. americana* (Abundis, 2007; Malda y Ruiz, 2004). Este arbusto de origen mexicano mide hasta 3 metros de altura, crece en zonas áridas y semiáridas en suelos con texturas arenosas-arcillosa, con temperaturas que oscilan entre 13.6 y 17.8°C, precipitaciones anuales de 335 a 924 milímetros y altitudes que van de los 1-230 a 2460 metros sobre nivel del mar. Debido a lo árido de las zonas donde crece, ésta planta presenta hojas grandes dispuestas en roseta y terminadas en espina que almacenan gran cantidad de agua (Abundis, 2007; Malda y Ruiz, 2004).



Figura 1.2. Maguey pulquero **Fuente:** SDR, 2007.

1.1.2.2. Fermentación

El término fermentación se define como el proceso en el que se producen cambios químicos en un sustrato orgánico por medio de la actividad de enzimas producidas por microorganismos (Jay, 1992). Muchos productos alimenticios deben su producción y características a la actividad de microorganismos. Estos productos, denominados alimentos fermentados, tienen un sabor y aroma característicos que provienen directa o indirectamente de esos microorganismos fermentadores. Si el

alimento es de tipo ácido que contiene azúcares, son las levaduras las que crecen con mayor facilidad y el alcohol que estas producen (fermentación alcohólica) obstaculiza la actividad de otros microorganismos contaminantes (Jay, 1992). El proceso de fermentación del pulque empieza en el maguey, con el fundamento de que los microorganismos naturales presentes en el aguamiel fermentan la parte de los carbohidratos disponibles; este proceso de fermentación se acelera por la adición de la semilla (porción de pulque previamente producido) (Escalante y cols., 2004).

1.1.3. Características del pulque y su uso

1.1.3.1. Físicas

Líquido no clarificado de color blanquecino, ácido, de aspecto viscoso, de olor y sabor característicos, sin que presente modificaciones en sus propiedades sensoriales que alteren su calidad. La presencia de los microorganismos de la fermentación son los responsables de dar el aspecto blanquecino y turbio.

1.1.3.2. Químicas

Químicamente, los compuestos que indican que el pulque es de buena calidad, son ácidos en baja concentración y azúcares en concentraciones adecuadas. Es suavemente ácido cuando su pH se encuentra entre 3.5 y 4.2, lo que evita la proliferación de ciertos microorganismos patógenos (Anderson y cols., 1946; NMX-V-037-1972; SDR, 2007).

1.1.4. El pulque como alimento

En la actualidad, el pulque aún es consumido principalmente en poblaciones indígenas y mestizos del Valle del Mezquital, no solamente como bebida alcohólica, sino también como alimento complementario en su alimentación ya sea en forma

directa o como ingrediente en salsas, bebidas y mezclas; incluso en muchas ocasiones como sustituto de café, té, e incluso de la leche ya que es utilizado en repetidas ocasiones como primer alimento después del término de ablactación en los niños (Anderson y cols., 1946; Camacho, 2005; Madrigal, 1999; NMX-V-037-1972; Sepúlveda, 2007).

1.1.5. El pulque como aporte nutritivo

A través de estudios se ha demostrado que el pulque contiene sustancias nutritivas útiles al ser humano como el hierro, altos niveles de triptófano, azúcares, proteínas y vitaminas principalmente hidrosolubles (Backstrand y cols., 2002; Marván y cols., 2001; Morales de León y cols., 2005 y SDR, 2007); de forma más precisa por cada 330 g contiene 20.1 g de hidratos de carbono y 11.6 g de etanol, es una fuente de energía ya que por cada 330 mL aporta 142 Kcal (Marván y cols., 2001), contribuyendo con el 10% de tiamina, 24% de riboflavina, 23% de niacina, 48% de ácido ascórbico y 26% de hierro en la dieta del otomí (Ortiz de Montellano, 1990).

Cervantes (2002) reporta que por cada 100 mL de pulque hay 0.37 g de proteínas, 11 mg de calcio, 6 mg de fósforo, 0.70 mg de hierro, 0.02 mg de tiamina, 0.03 mg de riboflavina, 0.35 mg de niacina, 5.10 mg de ácido ascórbico, 0.01 mg de ácido fólico y 0.08 g de hidratos de carbono.

1.1.6. El pulque como bebida intoxicante

A pesar de ser una bebida de bajo contenido alcohólico, existen datos que asocian el consumo del pulque con muertes por cirrosis hepática, sobretodo en la zona central de nuestro país. En Hidalgo, las muertes reportadas a causa de la cirrosis hepática son de 48 por cada 100,000 habitantes; pero se conoce que en el Valle del Mezquital, que es la zona donde mayoritariamente se observa el consumo del pulque, los casos se elevan a 140 muertes por cada 100,000 habitantes, desconociéndose el número de los casos debidos al consumo de pulque (Camacho,

2005; Narro Robles y Gutierrez- Avila., 1992; Navarro-Robles y Gutiérrez Ávila, 1997).

Por otra parte, algunas investigaciones demuestran el impacto negativo del consumo de pulque por parte de mujeres embarazadas sobre el peso de los recién nacidos (Backstrand y cols., 2001; Backstrand y cols., 2004).

1.1.7. Zonas Geográficas de principal producción

Los estados productores de pulque son Hidalgo, que se considera el mayor productor en la república mexicana con el 70% de la producción nacional (112 mil litros por mes aproximadamente); le siguen en producción Tlaxcala (35 mil litros por mes aproximadamente); Estado de México (17 mil litros por mes) y Puebla en este último se tienen datos que desde el año 6,500 A.C. existieron los primeros cultivos de maguey pulquero, por lo tanto se sabe que históricamente que toda la zona centro del país ha sido la mayor consumidora y productora de pulque; por lo cual era una importante actividad económica. (Abundis, 2007; Anderson y cols., 1946; Cervantes, 2002; Narro-Robles y cols., 1992; NMX-V-022-1972; Musacchio, 1999; Sepúlveda, 2007).

1.1.8. Microorganismos en el pulque

La microbiología del pulque ha sido estudiada tanto por métodos tradicionales (Sánchez-Marroquín, 1967) como por métodos más precisos, como los reportados por Escalante y cols. (2004) donde mencionan que los estudios de microbiología se han enfocado más en el aislamiento y la identificación de microorganismos presentes en el aguamiel. Este grupo estudió tres muestras de aguamiel empleando técnicas de biología molecular como la amplificación de genes 16S rRNA por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y análisis de secuencias. Así fueron identificadas por primera vez *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus strain ASF 360*, *Lactobacillus Kefir*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium*

johnsoniae, *Acetobacter pomorium*, *Glucobacter oxydans* y *Hafnia Alves*. En este estudio se reporta que las bacterias dominantes fueron Gram positivas, en específico la especie *Lactobacillus* con un 80.97% en las tres diferentes muestras.

De acuerdo a lo reportado por Herrera (2003), las levaduras que mayormente se presentan en el pulque son *Saccharomyces cerevisiae*, así mismo se encuentran especies de géneros como *Cándida*, *Kloeckera*, *Rhodoturola* y *Toryloopsis*; en cuanto a bacterias las más abundantes son *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum*, además de *Zimomonas mobilis*.

Algunos de los microorganismos que intervienen en la fermentación del pulque son *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, responsables de la viscosidad característica produciendo polisacáridos del tipo de las dextranas; a bacterias como *Zymomonas mobilis*; y levaduras del tipo de *Saccharomyces carbajali* y *Saccharomyces cerevisiae* se les atribuye la fermentación alcohólica transformando la glucosa en alcohol y dióxido de carbono liberando ácido láctico (Abundis, 2007; Cervantes, 2002).

Estudios reportan poblaciones microbianas en ordenes de 45×10^8 UFC/mL para *Saccharomyces* sp, 41×10^7 UFC/mL para *Zimomonas* sp y 34×10^6 UFC/mL para *Lactobacillus* sp, que le dan a la bebida un elevado valor nutricional y los microorganismos aislados podrían tener efecto benéfico al sistema digestivo al ser consumidos por vía oral (Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez, 2007).

1.2. PROBIÓTICOS

La flora intestinal se adquiere durante el periodo neonatal y permanece relativamente estable el resto de la vida; aunque depende de diversos factores como el uso de antibióticos o la dieta, no es fácil modificarla de forma definitiva (Hetges, 1980; Simon y cols., 1984; Bartman y cols., 1994). La adición de ciertas bacterias permite el mantenimiento de un determinado tipo de flora. Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento a la dieta, afectan de forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino (Fuller, 1991; Charteries y cols., 1997). Los probióticos estimulan las funciones protectoras del

sistema digestivo son también conocidos como bioterapéuticos o bioprotectores y son utilizados comúnmente para prevenir infecciones gastrointestinales (Penna, 1998).

Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Hutcheson: puede ser habitante normal del intestino, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y al efecto de las sales biliares en el duodeno, tener capacidad de adhesión a células epiteliales y ser capaz de llegar vivo al intestino (Pardio y cols, 1994).

Los probióticos más utilizados son los lactobacilos y las bifidobacterias, los cuales son utilizados para la fermentación de alimentos. Entre los lactobacilos los más comunes son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus bulgaricus* (Gorbach, 1990). Entre las bifidobacterias destacan *Bifidobacteria bifidum*, *Bifidobacteria longum*, *Bifidobacteria breve*, *Bifidobacteria infantis* y *Bifidobacteria spp*, estas últimas presentes en la flora intestinal de los niños alimentados con leche materna durante la lactancia y posibles responsables de la menor incidencia de procesos diarreicos en este grupo. Aunque los lactobacilos y las bifidobacterias son las más comunes en su utilización como probióticos en la actualidad comienza a popularizarse la utilización de levaduras para fines probióticos.

Las propiedades benéficas de cepas de *Saccharomyces spp* están bien documentadas (Rodríguez y cols, 1996). Además de su valor nutritivo (provisión de vitaminas del complejo B), las levaduras probióticas son resistentes dentro del tracto intestinal y a la mayoría de los antibióticos. La cepa de *Saccharomyces spp* también puede ayudar a restablecer la función intestinal normal después de una terapia larga con antibióticos (McFarland y cols., 1994). Hoy en día, un número considerable de preparaciones farmacéuticas (polvos, cápsulas y tabletas) contienen levaduras probióticas que están comercialmente disponibles.

Existen varias características de los probióticos que permiten su uso en seres humanos, entre las cuales se encuentra el ser inoocuos, no colonizar el intestino de forma permanente, sino que ejercen su efecto mientras se consumen y después son eliminados por el peristaltismo, tiene una actividad específica en el tubo digestivo que

puede ser inmune, nutricional, metabólica o protectora, que son las de la flora natural.

1.2.1. Mecanismos de acción de los probióticos

Se han propuesto varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos, entre los cuales destacan:

- 1) El producir sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Rolfe, 2000).
- 2) Disminuyen el pH intestinal favoreciendo el crecimiento de microorganismos benéficos (Dunne y cols., 2000).
- 3) Disminuyen la colonización por patógenos al competir con estos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal (Young y Huffman., 2003).
- 4) Compiten por nutrientes; las bacterias ácido lácticas pueden utilizar los nutrientes consumidos por organismos patógenos (Dunne y cols., 2000; Rolfe, 2000).
- 5) Estimulan la respuesta inmune. Evidencias recientes demuestran que la estimulación de la inmunidad innata y adquirida protege contra enfermedades intestinales. Estos microorganismos pueden alertar al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando la producción de Anticuerpos IgA, activando macrófagos, e incrementando la producción de interferón-gamma y citoquinas (Isolauri y cols., 2000; Reid y cols., 2003)

De todo lo anteriormente expuesto, el uso de probióticos se asocia en la actualidad con un gran número de efectos beneficiosos en humanos, muchos de ellos establecidos de forma empírica, como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la

modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas (Gill, 2003).

Sin embargo no se puede asumir que todos los probióticos posean las mismas propiedades beneficiosas, de igual manera cuando se describe una propiedad benéfica de un microorganismo probiótico este no se puede extrapolar a las cepas restantes de la misma especie, incluso el efecto de una cepa puede presentar depende de las condiciones de su empleo y muy particularmente de la dosis.

La concentración de probióticos viables que se considera que debe de llegar al intestino para producir un efecto benéfico es de $\geq 10^6$ UFC/mL en el intestino delgado (Marteau y Shanahan, 2003).

1.2.2. Criterios para evaluar la capacidad probiótica de un microorganismo

Cuando el microorganismo ya se ha obtenido, aislado, y se han realizado procesos de caracterización para obtener su identificación, es necesario realizar pruebas de capacidad probiótica *in vitro*, que permitan evaluar la resistencia del microorganismo a condiciones características del tracto gastrointestinal, ya que los probióticos deben seguir esas características para que cumplan su función.

1.2.2.1. Resistencia a las sales biliares

Los microorganismos candidatos a probióticos deben ser capaces de llegar vivos al intestino para ejercer su efecto benéfico sobre el huésped, uno de los obstáculos más importantes para su supervivencia son las sales biliares. La bilis es una sustancia verde acuosa cuyos componentes principales son ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos (Begley y cols., 2006), la concentración de sales biliares en intestino humano es variable y difícil de predecir sin embargo oscilan entre 1.5% a 2.0% en la primera hora de digestión, y los niveles descienden alrededor de 0.3% (Noriega y cols., 2004).

1.2.2.2. Tolerancia al pH estomacal

En cuanto a la tolerancia al pH, el organismo debe ser capaz de resistir el pH de 2.5 del estómago humano y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago, que es de alrededor de 90 min (Smet, 1995).

Microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones anaeróbicas, pueden usar ácidos orgánicos de cadenas cortas como fuentes de carbono (Casal y cols., 1996), una vez en el interior de la célula estos compuestos generan una acidificación del citoplasma. En general las células eucariotas mantienen el pH intracelular a pesar de las variaciones del pH extracelular, permitiéndole soportar varios rangos de pH (Rose, 1987).

1.2.2.3. Resistencia a jugos gástricos

Los jugos gástricos producidos en el estómago son sustancias muy ácidas cuya función es la de degradar el alimento. Los jugos gástricos están compuestos por agua (98%), sales, ácido clorhídrico (HCl), mucoproteínas, enzimas proteolíticas, factor intrínseco, secreciones endocrinas e inmunoglobulinas. De estas sustancias, es el HCl secretado por las células gástricas parietales el que mantiene el pH necesario para la digestión, ablanda la fibrina y el colágeno, controla el paso de las bacterias al intestino y estimula la secreción pancreática y biliar (Lesson y cols., 1990).

1.2.2.4. Adhesión celular

Los cultivos de tejidos celulares se han desarrollado con el objetivo de reproducir las condiciones *in vivo* que permitan el crecimiento de las células, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, biológicas y bioquímicas y la adherencia celular. Estudios sobre cultivos celulares son esenciales para la selección de nuevas cepas con potencial probiótico (Alander y cols., 1997). La importancia de la adhesión del

microorganismo que se pretende usar como probiótico a las células epiteliales del intestino ha sido demostrada en estudios clínicos, ya que el microorganismo debe hacerlo para lograr su establecimiento en el ecosistema del tracto gastrointestinal. (Alander y cols., 1997). Además, la adhesión a la mucosa intestinal es importante para la modulación de la respuesta inmune del huésped y la exclusión de patógenos (Goldin y cols., 1992).

1.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias permite producir un gran número de ellas a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia observable a simple vista y formada por individuos iguales (Prieto y Ruiz, 1998).

Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las muestras son cultivables en cualquier medio de cultivo. Esto es debido a dificultades intrínsecas, al desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo, y a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir (Prieto y Ruiz, 1998).

1.3.1. Tinción de gram

Fue desarrollada en 1884 por el patólogo danés Hans Christian Gram. Esta técnica se trata de una tinción diferencial, ya que permite dividir a las bacterias en dos grupos: **Gram positivas** (retienen el violeta de genciana o cristal violeta) y las **Gram negativas** (se decoloran con el descolorante de contraste, generalmente de color rojo como la safranina o la fucsina básica). Se cree que esta afinidad tintorial se deba a las diferencias en la estructura y composición química de muchos componentes celulares entre los que destaca la pared celular. Las bacterias Gram positivas tienen una pared compuesta principalmente de una capa de peptidoglicana gruesa (20-80

nm). Las Gram negativas tienen una capa de peptidoglicana delgada (5-10 nm) además de una membrana externa constituida de fosfolípidos y lipopolisacáridos (Arciniega y cols., 2004).

Las características físicas de las colonias también permiten la identificación, en función del tamaño, altura de la colonia, forma, color, olor, textura y grado de adherencia al medio de cultivo (Prieto y Ruiz, 1998).

1.4. TÉCNICAS PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

1.4.1. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para llevar a cabo una amplificación por PCR es necesario realizar un aislamiento del material genético de microorganismo a identificar; esta etapa es común para todos los métodos de identificación de un microorganismo, requiriendo cantidades muy bajas de ADN puro. En esta etapa se incluyen un enriquecimiento en medio líquido a partir de una porción de muestra (North, 1961).

La extracción de ADN a partir de los cultivos celulares pasa necesariamente por la lisis de la célula, es decir, por la rotura de su envuelta o pared celular y a su vez proteger el ADN (Stirling, 2000).

Es recomendable siempre utilizar aquél método que mantenga un mejor compromiso entre rapidez y rendimiento. Podemos distinguir dos tipos de métodos de extracción de ADN: los que incorporan un paso de purificación con columna de sílica y los que no. Los métodos que requieren una columna de purificación, se basan en el principio de una interacción entre las cargas negativas de los fosfatos del ADN y las cargas positivas en la resina de la columna; esta resina contiene poros donde el ADN queda atrapado para después ser eluido y poder obtener una muestra pura libre del contenido intracelular del microorganismo, como proteínas, carbohidratos y lípidos, siendo este un método de fácil utilización y confiable (Stirling, 2000).

Cuando utilizamos métodos de identificación bacteriana basados en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), el ADN de las bacterias pasa a ser el analito. La PCR es una técnica de amplificación que se utiliza comúnmente en los laboratorios de

investigación médicos y biológicos para crear múltiples copias de ADN, sin utilizar un organismo vivo. Asimismo, se emplea en una variedad de tareas, tales como la detección de enfermedades hereditarias, la identificación de huellas digitales genéticas, diagnóstico clínico, identificación de microorganismos, detección de patógenos en el hombre, animales, plantas, y alimentos, e investigación en biología molecular (Saunders y cols., 2004). Se trata de un proceso a través del cual el ADN se multiplica artificialmente a través de ciclos repetidos de duplicación del material genético llevados a cabo por una enzima llamada ADN-Polimerasa. La ADN-Polimerasa se produce naturalmente en los organismos vivos, donde funciona para duplicar el ADN cuando las células se dividen. Trabaja uniéndose a una sola hebra de ADN y creando una hebra complementaria. Actualmente, el proceso original de PCR ha sido mejorado mediante el uso de una ADN-Polimerasa que procede de una bacteria termofílica (*Thermophilus aquaticus*) que vive a temperaturas arriba de 110°C (en aguas termales). Esta ADN-Polimerasa o *Taq* polimerasa es termoestable y es la enzima que se utiliza frecuentemente en la práctica del PCR. Esta técnica que ha sido utilizada por varios años para la detección directa de muchos tipos de agentes infecciosos en muestras clínicas, ha sido adaptada para ser usada también como una herramienta de tipificación. La ventaja de la PCR es su habilidad para producir literalmente millones de copias de un segmento de ADN particular con alta fidelidad en un tiempo de 3 a 4 hrs (Tenover y cols., 1997). El procedimiento requiere una plantilla de ADN que puede estar presente en la muestra en pequeñas cantidades; dos oligonucleótidos que flanquean las secuencias de la plantilla de ADN que va a ser amplificado, y la *Taq* polimerasa estable al calentamiento. Un ensayo típico de PCR requiere aproximadamente de 3 h para completar 30 ciclos, donde cada ciclo consiste de una fase de desnaturalización, en donde la doble hebra de ADN es fundida en hebras únicas; una fase de alineación, en donde los oligonucleótidos se unen a las secuencias blanco en las hebras separadas; y una fase de extensión, en donde la síntesis de ADN procede de los oligonucleótidos a partir de cada hebra de la plantilla de ADN, generando dos nuevas copias de la doble hebra de la plantilla original. Después de cada 30 ciclos, una sola copia inicial de la plantilla de ADN teóricamente puede ser amplificado a un 1 billón de copias (Struelens y col., 1996).

1.4.1.1. Secuenciación de ADN a partir del PCR

La secuencia de ADN constituye la información genética heredable del núcleo celular, los plásmidos, la mitocondria y cloroplastos que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos. La Secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos, adenina, guanina, citosina y timina. (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. Las primeras máquinas de secuenciación salieron a finales de los 80s, (Smith y cols., 1985). En 1986 se reportó una técnica de secuenciación automatizada, basada en la terminación específica con cuatro diferentes fluoróforos (método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos o método de Sanger). La mezcla de síntesis se cargaba en un solo carril de gel, en tubo, y se usaba un detector óptico para determinar la absorción de cada banda, casi al final del tubo. Esta información pasaba directamente a una computadora y permitía obtener información precisa de hasta 200 pares de bases (pb) de la secuencia. Sin embargo, habían varias áreas que podían ser optimizadas para aumentar la longitud de la secuencia obtenida: (1) el tamaño, diámetro y composición del gel electroforético, (2) los reactivos para la reacción de secuenciación, (3) las condiciones de electroforesis, (4) equipo óptico/electrónico de detección, y (5) los marcadores fluorescentes (Smith y cols., 1986).

Posteriormente, se experimentó con el uso de una máquina que tenía un detector óptico capaz de leer la información de cuatro carriles. En este caso, se reportó que era posible obtener información precisa de más de 400 pb usando solo un marcador fluorescente y separando las cuatro reacciones. Sin embargo, se reportó que a pesar de las aparentes ventajas del uso de marcadores distintos y un carril de detección, era mejor separar las reacciones para que los resultados no se vieran afectados por las diferencias (causantes de variación en la migración electroforética) o similitudes (espectros de absorción traslapados) entre los marcadores.

1.4.2. Pruebas bioquímicas de identificación microbiana

Constan de una serie de ensayos químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción permiten identificar distintos microorganismos. El funcionamiento de estos kits generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no. Para realizar las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio (Freydiere y cols., 2001).

1.4.2.1. Kit API 20 C AUX

Es un sistema de identificación específico para levaduras, conformado por una tira con 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados que contienen 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas son inoculadas con una fracción de medio líquido que contenga levaduras y únicamente habrá crecimiento si son capaces de asimilar el sustrato contenido en las cúpulas y los resultados se interpretan mediante la observación de turbidez en las cúpulas. Los sustratos contenidos en el kit son: asimilación de glucosa, glicerol, arabinosa, xilosa, adonitol, xilitol, galactosa, inositol, sorbitol, α -metil-D glucosa, N-acetil-D-glucosamida, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa, rafinosa, 2-keto-D-gluconato y celobinosa, por medio de estas pruebas los resultados arrojados se analizan mediante una base de datos en línea donde de acuerdo a los resultados arrojados se analizan mediante una base de datos en línea donde de acuerdo a los sustratos asimilados por la levadura determina el género y la especie al que pertenecen (Willemsen y cols., 2008).

2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.1. PROBIOTICOS EN EL PULQUE

Los consorcios microbianos son frecuentemente encontrados en varias bebidas fermentadas y se considera que esta interacción positiva es un mecanismo evolutivo que favorece a todas las poblaciones presentes en el consorcio con respecto a la captación de nutrientes, eliminación de ciertos metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida, y control de flora microbiana alterante de la fermentación (Chepalladian y cols., 1988).

La literatura reporta que a partir del pulque se pueden recuperar diversos grupos microbianos clasificados como: subdivisión *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (*Lactobacillus* cepa ASF360 AF157050, *Lactobacillus acidophilus* M99740, *L. hilgardii* M58521, *L. plantarum* D79210 y *Leuconostoc mesenteroides spp mesenteroides*), subdivisión proteobacteria (*Acetobacter pomorium* AJ001632, *Zymomonas mobilis* AF281034) y subdivisión hongos levaduriformes, pertenecientes al género *Sacharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae* (Escalante y cols., 2001). También se han aislado especies de bacterias y levaduras que producen enzimas de interés industrial: la enzima dextranasacarasa por ejemplo, es producida por *L. mesenteroides*. Esta enzima es la responsable de la síntesis de un polímero del azúcar glucosa llamado dextrana, la cual tiene importantes aplicaciones en diversos campos de la industria (Chellapandian y col., 1998). Así mismo, se han identificado y aislado de muestras de pulque algunas bacterias lácticas que han demostrado ser resistentes a condiciones de crecimiento en las que se han adicionado sustancias que simulan las condiciones de acidez del estómago. Un estudio realizado por el Instituto de Biotecnología de la UNAM permitió identificar en el aguamiel bacterias lácticas del género *Leuconostoc* y, en el producto que se conoce como pulque, bacterias lácticas del tipo de lactobacilos acidófilos, las cuales son de interés por su capacidad de tolerar condiciones de acidez (Escalante y col., 2008).

El producto terminado es una bebida alcohólica que puede tener propiedades probióticas ya que contiene un consorcio microbiano similar al que contiene el tracto

digestivo. Esta característica fue documentada desde épocas prehispánicas, «El enema a base de pulque más antiguo conocido en Mesoamérica procede de Xochipala, Guerrero, México, data de 1200 a 900 a.C., aproximadamente». El uso de enemas contra enfermedades y dolencias del tracto digestivo en las culturas prehispánicas se registra por evidencias arqueológicas y por recopilaciones coloniales (Lemus, 2006).

Dentro de los grupos con actividad probiótica que se recuperan del pulque se destacan los géneros *Zymomonas sp*, *Lactobacillus sp* y en algunos casos *Saccharomyces sp*. (Cervantes y Pedroza, 2007). Sin embargo, cabe mencionar que debido a las diferentes formas de elaboración de pulque y el lugar de procedencia, se puede ampliar la identificación de los microorganismos que lo componen y medir la capacidad probiótica que puedan aportar a la bebida.

Recientemente, se ha redefinido al pulque como un ambiente en el cual se desarrollan tres tipos de fermentación de interés biotecnológico: fermentación alcohólica que permite la producción de etanol; fermentación ácida, producción de ácido láctico y acético y; una fermentación “viscosa”, producción de polisacáridos. Estas características, aunadas a la presencia de compuestos de tipo probiótico tales como la inulina en el aguamiel y durante las primeras etapas de la fermentación, favorecen el crecimiento de microorganismos benéficos en el intestino (Escalante y col., 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel cuya composición se ha reportado tener un buen aporte nutricional. Sin embargo, también se sabe de su contenido de alcohol, el cual puede producir posibles efectos nocivos al humano. Un punto importante por investigar es la identificación de microorganismos en el pulque que pudieran tener posible capacidad probiótica, en la actualidad los probióticos al ser ingeridos en cantidades suficientes tienen efectos benéficos como contribuir a la flora bacteriana intestinal y potencializar el sistema inmunitario. Estos microorganismos aislados del pulque se pueden incorporar principalmente a otra bebida resultando en un preparativo nutritivo sin el contenido de alcohol que normalmente contiene el pulque. Existen reportes que indican variación en la composición tanto química como microbiológica, de acuerdo al origen del pulque por la región donde se produce, de manera que los microorganismos pueden variar en las diferentes zonas de producción. En este sentido, los estudios que se han realizado hasta ahora e el pulque han sido sobre preparados de estados como Tlaxcala y Edo. De México, sin que haya reportes sobre la composición del pulque del estado de Hidalgo y que podría tener una diferente diversidad de flora debido al tipo de suelos y clima árido de esta zona.

4. JUSTIFICACIÓN

El pulque es una bebida fermentada de bajo costo y popular entre personas de recursos limitados que contiene nutrientes importantes para el ser humano. Sin embargo su contenido de alcohol lo hace una bebida no recomendable para todas las etapas de la vida, principalmente en la niñez y el embarazo. Desde hace muchos años que el pulque se ha considerado una bebida nutritiva. No obstante al saber que el pulque es una bebida que contiene una gran microbiota, posiblemente sea los microorganismos los que le den el aporte nutritivo que posee. Estos microorganismos no han sido estudiados completamente debido a la gran variedad existente en la bebida, sin embargo, es posible que los microorganismos puedan poseer capacidades probióticas totales o parciales y que algunos de ellos puedan establecerse en el organismo beneficiándolo. Por lo tanto los microorganismos identificados en el pulque que posean alguna capacidad probiótica, se podrían ser adicionados a otros productos de la industria alimentaria como mieles, bebidas y jugos. (Galindo, 2007). Además, su producción podría ser casera y así beneficiar a la población de escasos recursos económicos. Ya que una de las características de los microorganismos probióticos es su capacidad para inducir la respuesta inmune, aquellos identificados a partir del pulque podrían contribuir a las defensas del humano. Por lo tanto, los alcances de este trabajo de investigación podrían tener un alto impacto en la salud y la nutrición de la población mexicana.

5. OBJETIVO

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Identificar microorganismos aislados del pulque mediante técnica moleculares bioquímicas y realizar pruebas de capacidad probiótica *in vitro*.

5.1.1. Objetivos específicos

- Identificar los microorganismos por secuenciación de genes ribosomales y por pruebas bioquímicas empleando un kit de identificación.
- Determinar la capacidad probiótica parcial de los microorganismos aislados mediante ensayos de tolerancia a pH, jugo gástrico y a sales biliares.

6. HIPÓTESIS

En el pulque existen microorganismos con capacidad probiótica parcial que pueden beneficiar al ser humano.

7. METODOLOGÍA

7.1. SITIOS DE ORIGEN Y MUESTREO DEL PULQUE

Se trabajó con 3 muestras de pulque de 500 mL obtenidas de tres diferentes regiones de tres municipios del estado de Hidalgo (El Arenal, Mineral de la Reforma y Tula de Allende) que son considerados como principales productores de pulque en la región. Los muestreos se realizaron en botellas de plástico estériles que fueron transportadas en una hielera al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el momento de su utilización.

7.2. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR TECNICAS MOLECULARES

Criterios para la identificación de microorganismos

Del total de microorganismos aislados de las tres muestras de pulque, únicamente se identificaron parcialmente aquellos que fueron reportados como productores de ácido ascórbico en un estudio realizado en el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (García, 2009). Los microorganismos aislados fueron clasificados mediante un código de control interno mediante un número y una letra. Para la identificación molecular total, se tomaron en cuenta los resultados obtenidos en la secuenciación parcial y la comparación de la homología resultante del BLASTn contra la base de datos del servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), que se describe posteriormente en resultados.

7.2.1. Extracción y purificación de ADN total bacteriano

La extracción y purificación del ADN total se realizó a partir de cultivos de 24 hrs de los microorganismos aislados en caldo nutritivo (Aislados 3, 6, 7, 9, 11, 35, 69) mediante un kit de la compañía Qiagen denominado "Blood and Cell Culture DNA kit"

de acuerdo a las especificaciones del fabricante. (Cat. No, 13323). Brevemente, las muestras de microorganismos se centrifugaron a 5000 rpm (Revoluciones por min) por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se lisaron por incubación con 1mL de buffer de lisis (buffer C1; ver anexo 1) durante 5 min, seguido de la adición de 45 µl de lisozima e incubación a 37°C por 30 min. Después de la adición de 1mL de buffer de dispersión (G2), la desnaturalización completa se logró con la adición de 45 µl de proteinasa K e incubación a 50°C por 30 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, y el sobrenadante conteniendo el ácido nucleico se hizo pasar por columnas de resina de intercambio aniónico equilibradas con 2 mL de buffer QBT. Después de 3 lavados con 1 mL de buffer QC, el ADN se eluyó por la adición de 1 mL de buffer QF y se precipitó con 1.4 mL de isopropanol frío por alta centrifugación (14,000 rpm por 15 min), se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 µ de agua desionizada y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.2.2. Amplificación del gen de la subunidad ribosomal 16S

La identificación de los microorganismos aislados se llevó a cabo a través de la determinación de la secuencia de su subunidad ribosomal 16S, la cual es única a cada especie. Para ello, se amplificó la región de ADN correspondiente a esa subunidad mediante PCR utilizando oligonucleótidos universales de estos ribosomales, diseñados para alinear secuencias conservadas en los extremos de dicha subunidad en bacterias y levaduras. El ADN extraído se colocó en una solución acuosa ajustada al pH adecuado con una mezcla de deoxinucleótidos libres (adenina, citosina, guanina, y timina), el par de oligonucleótidos que señalarán el inicio y el final del fragmento de ADN a amplificar, y la enzima Taq polimerasa. La mezcla se pondrá en un termociclador, las condiciones del PCR son las siguientes Cada mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 25 µl, que contiene 1 µl de ADN purificado (100 ng aprox.) , PCR buffer 2.5 µl, dNTPs 2.5 µl (2 mM cada uno), MgCl 1.25 µl (1.25 mM), 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (o primers, 100 pmoles), Taq polimerasa 0.5 µl (2.5 U), y dH2O en cantidad suficiente para 25 µl. Los oligonucleótidos usados fueron: Fd 1: 5´GTA AGA ATT CCA GAG TTT GAT CCT

GGC TCAG 3', Rd1: 5'CAT TCT CGA GAA GGA GGT GAT CCA GCC 3', JLR4: 5'CGG GCG GTG TGT ACA AAG GG 3' y JLR9: 5'GAA ACT TAA AGG AAT TGA CGG 3'. Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: para la desnaturalización inicial se utilizó una temperatura de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, alineamiento de los oligonucleótidos a 54°C por 1 min para Fd1 y Rd1 ó 55°C por 1 min para JLR4 y JLR9, y una extensión a 72°C por un minuto. Finalmente se hizo una elongación final a 72°C por 7 minutos, y la conservación a 4°C.

7.2.3. Purificación del producto de PCR

El producto de la PCR se corrió en una cámara de electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en una solución amortiguadora TAE al 1%. Con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta, se identificó en el gel la banda de ADN correspondiente al fragmento del peso molecular deseado. La zona del gel con la banda de ADN deseada se cortó con un bisturí estéril y así se separó de otros fragmentos de ADN no deseados, en caso de presencia de amplificadores inespecíficos. Posteriormente, el ADN se purificó por medio de un Kit de Purificación de ADN de la compañía Invitrogen denominado "PureLink™ Quick Gel Extraction Kit" (Cat, K210012), de la siguiente manera: al fragmento de gel perteneciente a la banda se le agregó 1.5 mL de buffer (GS1) y se incubó a 50°C por 15 min, agitando aproximadamente cada 3 min para lograr la solubilización del gel; posteriormente, la solución se agregó a una columna con resina de intercambio aniónico y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante y la columna se lavó por centrifugación con 500 µl de buffer de solubilización (GS1) seguido de 700 µl de buffer de lavado (W9) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Para eluir el ADN se colocó la columna en un tubo de recolección y se le adicionaron 50 µl de buffer (TE) previamente calentado a 60°C; se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min. El ADN eluido se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.2.4. Secuenciación de productos de PCR

Para poder determinar la secuencia de los productos de PCR purificados, la muestra se procesó para ser secuenciada de manera automática mediante el Secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems. Los primers usados para la secuenciación fueron los mismos usados para amplificar el gen de la subunidad 16S. En todos los casos, excepto uno, sólo se secuenció entre 400 y 500 bp del producto amplificado, bien sea del extremo 5' o 3'. Sólo en un caso (aislado 69) se secuenció todo el gen de la subunidad ribosomal 16S, para lo cual se diseñaron primers internos RKM2 5' TAA TGA TCC TTC CGC AG 3' y KRM3 5'AAA CTG ATA GCA GAG AAT C 3' con la secuencia obtenidas, que se utilizaron para leer corriente abajo del extremo 5' y corriente arriba del extremo 3'.

7.3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL AISLADO 69 MEDIANTE EL KIT API 20 C AUX

En un matraz Erlenmeyer relación 1/5 se realizó el inóculo del aislado 69, incubándose en condiciones de 37° C, 150 rpm durante 24 hrs. Mediante condiciones estériles se extrajo una fracción de colonia por aspiración, y se realizó una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón 2 de Mc Farland utilizándola inmediatamente después de su preparación se transfirieron 100 µl de la suspensión a una ampolla de API C Medium.

Se llenaron las cúpulas de la cámara de incubación con la suspensión, se cerró nuevamente la cámara y se incubó durante 48 hrs a 37 ° C.

Después de 48 hrs se observó el crecimiento de las levaduras comparativamente con la cúpula cero, tomando en cuenta que una cúpula con mayor turbidez indica una reacción positiva anotando cada observación en la hoja de resultados.

Comentado [L1]: Esto se lo agregé, es la metodología que utilicé para el Kit de identificación bioquímica

La interpretación se obtuvo a partir de un perfil numérico asignando un valor predeterminado a cada reacción, la identificación se realizó a partir de la base de datos (V 4.0) localizando el perfil numérico en la lista de los perfiles.

7.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DEL AISLADO 69 MEDIANTE TRES CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Cada una de las pruebas de capacidad probiótica se realizaron por triplicado.

Obtención del inóculo.

En un matraz Erlenmeyer relación 1/5 se realizó el inóculo del aislado 69, incubándose en caldo YPG en condiciones de 37° C, 150 rpm durante 24 hrs hasta obtener un valor de absorbancia de 620nm de 0,80. Finalizando el tiempo de incubación se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza. (Aguirre, 2003).

7.4.1. Prueba de resistencia a sales biliares

Caldos YPG fueron suplementados con Bile Oxgal (Difco) hasta obtener concentraciones finales de 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.20%, 0.25% y 0.3% respectivamente. Posteriormente, los medios fueron esterilizados a 121° C por 15 min (Spencer, 2001).

Un volumen de 1.0 mL del inóculo del aislado 69 fue inoculada en 9 mL de caldo YPG suplementado con cada una de las diferentes concentraciones de sales biliares anteriormente mencionadas y posteriormente fueron incubados a 37° C por 24 hrs.

Finalizando el tiempo de incubación, se realizaron conteos en placa de la siguiente manera: de cada caldo YPG adicionado con las diferentes concentraciones de sales biliares se realizaron diluciones seriadas en solución salina al 0.85%(p/v). Las diluciones fueron sembradas en medio de cultivo Sabouraud (Sigma), por el método

de microgota tomando 20 µl de cada muestra, depositándolo a una altura no mayor de 2 cm y extendiendo con asa bacteriológica, dividiendo la caja en cuatro cuadrantes y sembrando en cada uno dos replicas de las diluciones realizadas, las cuales se incubaron a 37° C por 24 hrs. Después de la incubación se escogieron las placas que tenían entre 10 y 20 colonias aisladas; el número de colonias obtenidas fue multiplicado por el factor de corrección (50) para completar el recuento al mililitro y finalmente por el factor de dilución empleado. El recuento se reporto en UFC/mL (Collins, 1998).

7.4.2. Estabilidad al pH del estómago.

Como el pH del estómago humano es de 1.5 y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 min, la capacidad de los microorganismos aislados de sobrevivir a esta exposición se evaluó en el medio de cultivo ajustado con HCl para la obtención de un rango de pH de 1.5, 2.0, 3.0, 3.5 y 4.0 por un periodo de 24 hrs (Thomas y cols., 2002).

Al caldo YPG preparado se le adicionó HCL sin diluir para ajustar el pH a las siguientes concentraciones: 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0, posteriormente se esterilizó a 121° C por 15 min.

Un volumen de 1.0 mL del inóculo del aislado 69 previamente obtenidas fue inoculado a 9 mL de el caldo YPG con el pH ajustado a las concentraciones anteriormente mencionadas y se dejó incubar a 37° C por 24 hrs.

Finalizando el periodo de incubación, se realizaron recuentos de placa de la siguiente manera: de cada caldo YPG adicionado con las diferentes concentraciones de pH se realizaron diluciones seriadas en solución salina al 0.85% (p/v) y se sembraron por el método de microgota y fueron contabilizadas por el método previamente descrito.

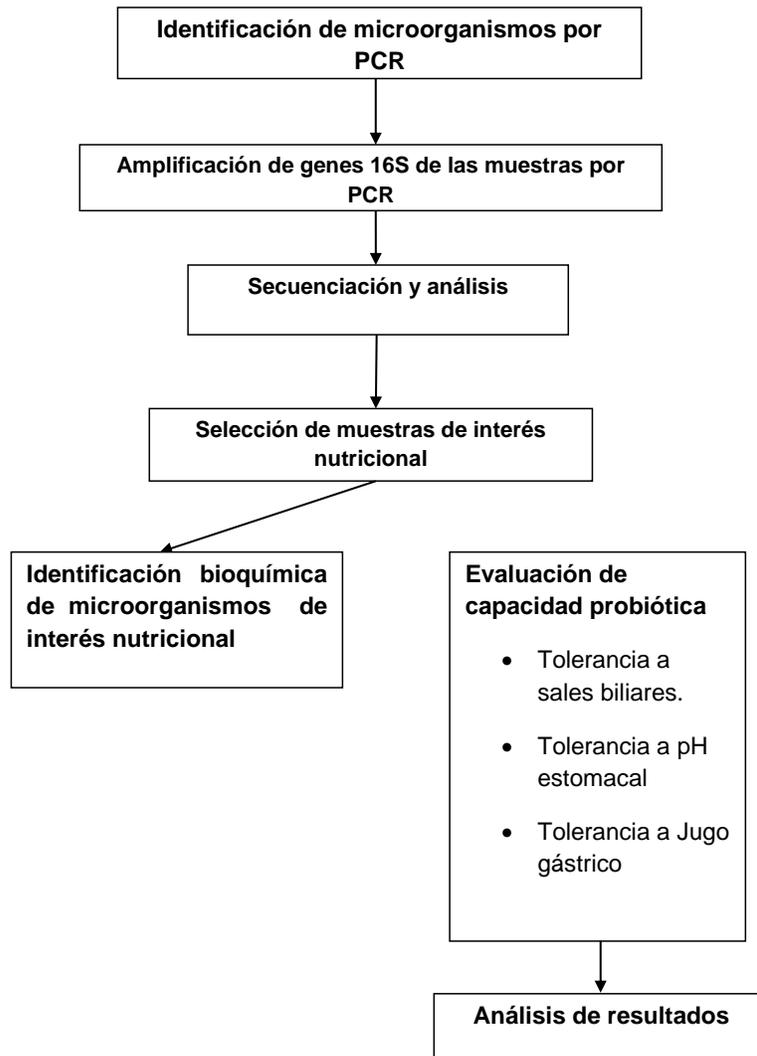
7.4.3. Resistencia a jugo gástrico

Para la elaboración del jugo gástrico se tomó 0.2 g de NaCl y 0.32 g de pepsina los cuales se disolvieron en un volumen de 80 ml de agua destilada. El pH se ajustó a 1.5 con HCL sin diluir y se completo el volumen a 100 ml totales con agua destilada estéril. Como control se ajustó jugo gástrico a un pH de 6.5 con NaOH 5N y posteriormente se esterilizó por filtración con filtros de membrana de 22 μm (Spencer, 2001).

Después se inoculó 1 mL del inóculo del aislado 69 en 9 mL del jugo gástrico pH 1.5 y 6.5 (control) y se incubaron a 37° C tomando muestras de 20 μ a las 0, 1, 2, 3, 4 y 24 hrs para observar la viabilidad celular (Spencer, 2001).

De cada una de las muestras tomadas a cada hora, fueron sembradas y cuantificadas por la misma técnica descrita anteriormente.

7.5. CUADRO DE DISEÑO METODOLÓGICO



8. RESULTADOS

8.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ALGUNOS DE LOS MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE PRODUCIR ÁCIDO ASCÓRBICO

A continuación, se procedió a la identificación de 7 aislados productores de ácido ascórbico (García, 2009) a través de la amplificación y secuenciación total o parcial de los genes codificadores de la subunidad ribosomal 16S. La identificación se inició con la secuenciación parcial del gen amplificado por PCR, en específico, la secuenciación de entre 400 y más de 500 bp del extremo 5' o 3' de los amplificados (Tabla 9.6). Las secuencias obtenidas fueron analizadas a través de un BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides) contra la base de datos del servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), lo que permitió la identificación de los aislados a través de la homología con secuencias bacterianas y de levaduras previamente reportadas, que en todos los casos fue de más del 98%. La identidad de los 7 aislados en base a la secuencia del 16S es mostrada en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1 Identificación parcial de los 7 microorganismos productores de ácido ascórbico por secuenciación parcial del gen de la subunidad ribosomal 16S.

1700 pb

Muestra	Oligonucleótidos utilizados en el PCR	No. De pares de bases secuenciados (región del ribosomal 16S secuenciada)	Identidad	Resultado del BLASTn
T1	FD1, RD1	421 PB (61-422)	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillus subtilis strain H8 16S ARN ribosomal, secuencia parcial, aislado de la tierra.
T3	FD1,RD1	428 PB (14-433)	Bacteria no cultivable	Bacteria sin cultivar clona thom_k16 16S ribosomal RNA secuencia parcial del gen,bacteria de muestra ambiental.
T4	FD1,RD1	524 (962-1487)	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillus subtilis cadena 22 16S ARN ribosomal,

				secuencia parcial, aislado de la tierra.
T11	FD1,RD1	579 PB (769-1516)	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i> cadena G10 16S ribosomal RNA, secuencia del gen parcial
T15	FD1,RD1	420 PB (1036-1393)	<i>Bacillus sp. B56</i>	Bacillus sp. B56 16S ARN ribosomal, secuencia parcial, aislado de la montaña Tianmu en la Reserva Natural Nacional de Ohio.
A65	FD1,RD1	453 PB (1045-1487)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus fusiformis</i> 16S ARN ribosoma, secuencia parcial, aislado y caracterizado de la rizosfera y los campos agrícolas de Corea.
A69	JLR4,JLR9	483 PB (1057-1474)	<i>Kluyveromyces sp</i>	<i>Kluyveromyces sp. CW4.3</i> 16S ribosomal RNA secuencia parcial

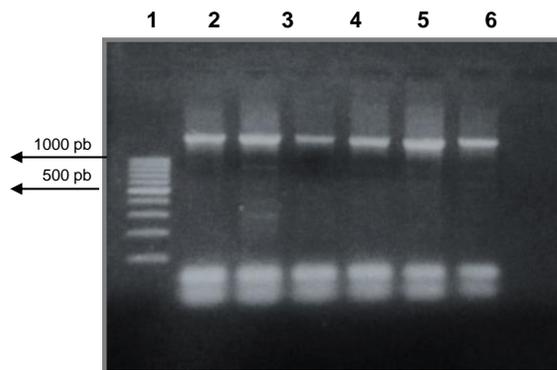
Desafortunadamente, 6 de los 7 aislados correspondieron a bacterias del tipo baciliforme presentes comúnmente en tierra (*Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* y un par de bacilos no caracterizados) y que pudieron haber sido aislados como contaminantes del pulque. Sin embargo, la secuenciación total del aislado A69, demostró que se trataba de una levadura llamada *Kluyveromyces marxianus* que se conoce usualmente con el sinónimo de *Candida kéfir*, un organismo productor comercial de la enzima lactasa (Lodder y Kreger-van Rij, 1952).

8.1.1. Identificación completa de *Kluyveromyces marxianus*

Después de realizar la identificación parcial de la muestra 69 identificada con el nombre de *kluyveromyces marxianus*, se procedió a la secuenciación completa de su gen 16S. Para ello, se amplificó todo el gen con los oligonucleótidos JLR4 y JLR9,

obteniéndose una banda de aproximadamente 1700 bp como se muestra en la figura 8.1.

Figura 8.1. Amplificación por PCR del gen ribosomal 16S del aislado A69



Carril1: Marcador de peso molecular, 1kb DNA Ladder
Carriles 2-7: Amplificados con los oligonucleótidos JLR4 y JLR9.

Para completar la secuencia del gen 16S del aislado A69, se diseñaron un par de oligonucleótidos internos a partir de del fragmento de secuencias previamente obtenidas de los extremos 5' y 3' del amplificado del aislado 69. Los oligonucleótidos internos se usaron para secuenciar el fragmento de 1700 bp mencionado anteriormente río abajo del extremo 5' y río arriba del extremo 3' y así completar la secuencia del gen. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos obtenida (1795 pb Figura 9.2) con la secuencia reportada para *Kluyveromyces marxianus* (No. de acceso GenBank: X89523.1), mostró 100% de homología, lo que indica de que efectivamente el aislado A69 corresponde a *K. marxianus*.

Ya que el aislado A69 fue el único dentro de los productores de ácido ascórbico que se identificó por análisis molecular como un microorganismo con posible capacidad probiótica, éste fue el único aislado al que se le realizó todas las pruebas que siguen a continuación.

8.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL AISLADO A69

La identidad del aislado A69 como *Candida kefir* sinónimo de *Kluyveromyces marxianus* se comprobó mediante pruebas bioquímicas utilizando el sistema de identificación API20 C AUX, tal como se indica en materiales y métodos. —Se observó mediante turbidez en la cúpula si el resultado fue positivo y negativo cuando no existió turbidez.

8.3. PRUEBAS DE CAPACIDAD PROBIÓTICA

Debido a que sólo el aislado A69 se identificó como un microorganismo con potencial probiótico, fue el único al que se le realizó las pruebas de capacidad probiótica

8.3.1. Resistencia a Sales biliares

Como se muestra en la tabla 8.2, el aislado A69 fue capaz de crecer en presencia de todas las concentraciones de sales biliares ensayadas. Como era de esperarse, el número de UFC/mL tuvo una disminución a medida que se incremento la concentración de sales biliares. Sin embargo el numero de UFC/mL obtenidas para la concentración mas alta ensayada de 0.3%(p/v) estuvo en el orden de 10^{10} a 10^8 .

Tabla no. 8.2. Crecimiento del aislado A69 en presencia de diferentes concentraciones de sales biliares

Concentracion de sales biliares (% p/v)	UFC/mL
0.5	6.52×10^{10}
0.1	4.66×10^9
0.15	3.69×10^9
0.20	2.86×10^8
0.25	2.03×10^8
0.30	1.12×10^8

8.3.2. Resistencia a pH estomacal

Comentado [L2]: No sé si ya este más específico o le tenga que agregar más detalles.

Como se muestra en la tabla 8.3, el aislado A69 fue capaz de crecer en diferentes valores de pH ácidos, el número de UFC/mL presentó una disminución a medida que se disminuyó en pH. Sin embargo, el número de UFC/mL obtenidas para el pH más bajo ensayado de 1.5 estuvo en el orden de 10^8 .

Tabla 8.3. Crecimiento del aislado A69 en presencia de diferentes concentraciones de pH

Comentado [C3]: Cambiar como arriba

Concentracion de pH	UFC/mL
1.5	1.3×10^8
2.0	1.71×10^8
2.5	1.57×10^9
3.0	2.50×10^9
3.5	1.46×10^{10}
4.0	1.20×10^{10}

8.3.3. Resistencia al jugo gástrico

Comentado [L4]: Lo mismo, no se si ya esté más específico

Como se muestra en la tabla 8.4 y 8.5, el aislado A69 fue capaz de sobrevivir en presencia de jugo gástrico a ambos pHs, 1.5 y 6.5, hasta las 4 horas de incubación ensayadas. El número de UFC/mL disminuyó con el incremento del tiempo. Sin embargo, el número de UFC/mL obtenidas a las 4 horas se mantuvo en el orden de 10^9 a 10^7 para el valor de pH de 1.5 y para el valor de pH de 6.5 se mantuvo en un orden de 10^{11} a 10^9 .

Tabla 8.4 Crecimiento del aislado A69 en presencia de jugo gástrico pH 1.5 (+/-0.2)

Resistencia al jugo gástrico pH 1.5 (+/-0.2)	UFC/mL
Cero	4.01×10^9
Una	2.66×10^9
Dos	2.39×10^8
Tres	1.73×10^8
Cuatro	1.38×10^7

Resistencia al jugo gástrico pH 6.5 (+-0.2)	UFC/mL
Cero	4.26X10 ¹¹
Una	3.12X10 ¹¹
Dos	6.89X10 ¹⁰
Tres	3.56X10 ⁹
Cuatro	1.38X10 ⁹

9. DISCUSIÓN

El pulque es una de las bebidas tradicionalmente obtenidas de forma natural y más consumida en la población mexicana; incluso para algunos consumidores se convierte en parte importante de su nutrición. A través de estudios se ha demostrado que el pulque contiene sustancias nutritivas como azúcares, proteínas, hierro y vitaminas hidrosolubles (Backstrand y cols., 2002, Marvan y cols., 2001., Morales de León y cols., 2005). Debido a que el pulque presenta una gran diversidad microbiana, es importante conocer si estos microorganismos son los que producen dichas sustancias nutritivas, de este modo se podrán aislar estos microorganismos y manipularse artificialmente para el beneficio de la nutrición humana. El primer punto de interés fue el aislamiento de microorganismos y realizar su identificación y de esta manera estudiar su importancia nutrimental, si tenían la capacidad de producir alguna vitamina y si podrían actuar como posibles microorganismos probióticos.

Se logró aislar 103 microorganismos del pulque de tres diferentes orígenes, logrando así separar 22 microorganismos con respecto a la caracterización morfológica. Los resultados de este estudio muestran que los microorganismos aislados presentan características morfológicas microscópicas y macroscópicas similares a las obtenidas por Cervantes-Contreras y Pedraza-Rodríguez (2007) quienes identificaron bioquímicamente los microorganismos que lograron aislar como *Saccharomyces sp*, *Zimomonas sp* y *Lactobacillus sp*. Por su parte, Escalante y cols. (2004) en su estudio reportan que hay una gran diversidad microbiológica en el pulque, tanto bacterias, como levaduras. Galindo (2009) afirma que de esta bebida se pueden obtener más de 50 diferentes géneros de microorganismos, dependiendo el agave utilizado y el medio de cultivo empleado en el aislamiento.

De los 22 microorganismos que se lograron identificar morfológicamente, únicamente 7 de ellos, todos productores de ácido ascórbico, se lograron identificar mediante

pruebas moleculares utilizando la secuenciación de la subunidad ribosomal 16S- (Tesis de García-Cruz 2009). Como en nuestro caso, Favier y cols. (2002) en un estudio identificaron secuencias de *Lactobacillus ASF 360* y de *L. acidophilus* presentes en el pulque mediante PCR, lo que demuestra que el PCR es una técnica confiable en cuanto a la identificación de microorganismos. Únicamente uno de los microorganismos, identificado como *K. marxianus* tanto por la secuenciación del 16S como por el sistema de identificación API 20C AUX que es específico para levaduras, resultó poseer características de importancia nutrimental. *K. marxianus* es una especie de levadura en el género *Kluyveromyces*, y es la forma sexual (teleomorfa) de "*Candida kefir*" (sinónimo *Saccharomyces kefir*), se usa comercialmente para producir la enzima lactasa. Fue descrita en 1888 por E. Hansen quien en un principio nombro como *Sacharomyces marxianus* (Lodder y Kreger-van Rij,1952).

La primera barrera que un microorganismo probiótico debe resistir al paso por el estómago es el jugo gástrico. Este jugo secretado diariamente posee un pH aproximado de 1.5 a 2 y un alto contenido de sales biliares de aproximadamente 0.5% (p/v). Junto con una gran cantidad de enzimas proteolíticas liberadas desde la vesícula biliar, el jugo gástrico representa una barrera letal para la mayoría de los microorganismos (Martins y col., 2005). Debido a lo anterior, si un microorganismo sobrevive a estas condiciones extremas, se puede considerar que puede llegar a tener potencial como posible agente probiótico.

Para poder determinar el potencial probiótico de *K. marxianus* aislado del pulque en este trabajo, se determinaron ciertos criterios como la tolerancia a sales biliares, tolerancia a pH y resistencia a jugos gástricos. Gilliland y cols. (2004) afirma en su estudio que la concentración de sales biliares que debe resistir un microorganismo probiótico es de 0.3% (p/v) y que la mayoría de las especies de levaduras crecen incluso en presencia de 0.75% (p/v). En nuestro caso, se encontró que el aislado de *K. marxianus* creció de una manera inversamente proporcional a la concentración de sales biliares hasta en la mayor concentración de 0.3 %, por lo que para este propósito el microorganismo cumple con este criterio como un posible agente probiótico. Según Kamura y cols. (2004), las levaduras suelen crecer en presencia

de sales biliares a temperaturas de 27° C pero no más altas; sin embargo, la cepa de *K. marxianus* en el presente estudio mostró crecimiento frente a sales biliares a una temperatura de 37°C, relativamente alta para su género, sin que se viera afectado su metabolismo, lo cual representa una ventaja de ésta levadura frente a otros microorganismos probióticos, pues nuestro organismo se encuentra a esa temperatura.

Los microorganismos probióticos que hacen parte de un preparado comercial deben encontrarse a una concentración de entre $10^6 - 10^8$ UFC/mL al llegar a las células blanco para asegurar que puedan actuar sobre el huésped (Cavazonni, 1998), lo que sugiere que es necesario para una evaluación *in vivo*, partir de un inóculo con la concentración mayor, para asegurar que las levaduras al ser expuestas a las sales biliares conserven la conservación microbiana necesaria para que puedan afectar benéficamente al huésped (Salminen y cols., 1999). Los ácidos grasos insaturados juegan un rol esencial en las características de la membrana celular y determinan la función de de las proteínas unidas a la membrana, que es esencial en la resistencia a sales biliares (Begley, 2006). Se han encontrado vesículas similares a las encontradas en mamíferos en las levaduras, que pueden internalizar las sales biliares para su posterior degradación (St. Pierre y cols., 1994).

El crecimiento del aislado 69 a pHs tan ácidos como 1.5 y 2.5 sugiere que la resistencia a diferentes concentraciones de pHs pudo deberse a los antiportadores de Na^+/H^+ que poseen las levaduras; Mitsu y cols., (2005). Estos antiportadores son proteínas encontradas en la membrana citoplasmática así como en las membranas de los organelos de las células. Estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) y H^+ a través de las membranas, de tal modo que regulan las concentraciones de cationes y pH a nivel citoplasmático y organelos, lo que podría explicar la resistencia de la levadura a las diferentes concentraciones de pH. Otro de los posibles mecanismos de la levadura para la regulación del pH y la concentración de iones es una ATPasa, codificada por el gen PMA1 y que también se localiza en la membrana citoplasmática. Esta puede crear un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos, que

esta implicado en el mantenimiento del pH cercano a la neutralidad y que además de ser un componente crítico para la adaptación de la levadura a ácidos, es útil para muchas funciones fisiológicas en la levadura como la toma de nutrientes y la regulación intracelular de cationes y aniones (Viegas y cols., 1998., Sychrova y col., 1999., y Thomas y cols., 2002).

En el estudio realizado por Nerendranath y col. (2001) se encontró que la levadura *S. cerevisiae* era más resistente a la adición de ciertos ácidos en el medio de cultivo, debido posiblemente a que los componentes de diversos ácidos en el medio de cultivo utilizado (YPG) como extracto de levadura, peptona y glucosa pueden conferirle cierta protección a la levadura bajo condiciones de estrés, lo que pudo también haber contribuido para que los recuentos realizados a los diferentes pH en el presente estudio se mantuvieran estables, a pesar de las condiciones del medio.

Los resultados de este trabajo de investigación demuestran la existencia de por lo menos un microorganismo de importancia biotecnológica en el pulque, siendo un buen candidato para ser un probiótico productor de vitaminas, en este caso de ácido ascórbico. Esto permitirá realizar más investigaciones con relación a su metabolismo fermentativo, estabilidad para producir otras sustancias nutritivas y el mismo ácido ascórbico, así como completar con otras pruebas para determinar capacidad probiótica. El beneficio a la población humana será de suma importancia pues al manipularlo se puede emplear como complemento nutricional en alimentos que consume el humano con mayor frecuencia, así como el microorganismo se puede establecer en el intestino de la gente y si es estable en ese sitio contribuirá permanentemente a sus defensas intestinales así como su aporte nutritivo de forma natural.

10. CONCLUSIONES

1. El pulque es una bebida con alto aporte nutricional que contiene una gran diversidad de microorganismos.
2. Al menos uno de esos microorganismos, identificado por técnicas moleculares y bioquímicas en esta tesis como *K. marxianus*, que presenta altas posibilidades de ser probiótico y de contribuir a las propiedades nutrimentales de la bebida.
3. *K. marxianus* mostró ser tolerante a sales biliares en concentraciones desde 0.5% a 3.0% (p/v), pHs de 1.5 a 4.0 y a la presencia de jugo gástrico con pHs de 1.5 y 6.5 durante 4 horas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abundis, V.B. 2007. Monografía de Agave Pulquero. Secretaría de Desarrollo Social del Estado de Puebla. 1(23):17-19.
- Aguirre, A., Poutou, R. 2003. Obtencion de un biopreparado a partir de cepas nativas de levaduras para ser empleado como probiotico. Pontificia universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Maestria de microbiología. Tesis de postgrado. 45-49, 72-79.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M. 1997. Percistence of colonization of human colonic mucosa by a probiótica strain. *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and environmental Microbiology*. 65: 351-354.
- Alvarez, O.M.I., Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis*. 32: 1567-1576.
- Anderson, R.K., Calvo, J., Payne, GC. y Serrano, G. 1946. A Study of the Nutritional Status and Food Habits of Otomi Indians in the Mezquital Valley of Mexico. *Am J Public Health*. 36(8):883-903.
- Arciniega, A.L., González, R.F., y Merchant, J.A. 2003. Tinción simple, tinción de Gram y Tinción de Ziehl-Neelsen. En: *Microbiología práctica*. 3^{ed}. Ed. Ortigoza, F. J. y Ruiloba, L. S.L. Instituto Politécnico Nacional. pp. 35-47. Y (Prieto, P. J. y Ruiz, M. G. 1998. Características generales de los microorganismos. Nomenclatura y taxonomía. *Medicine*. 7(73): 3355-3360.
- Backstrand, M. R., Allen, L. H., Martinez, E. y Pelto, G. H. 2001. Maternal consumption of pulque, a tradicional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Pub. Health Nutr*. 4:883-891.
- Backstrand, M. R., Black, A. K., Mata de, M. y Pelto, G. H. 2002. Diet and iron status of nonpregnat women in rural Central México. *Am J Clin Nutr*. 76(1): 156-164.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Backstrand, M. R. Goodman, A. H. y Pelto, G. H. 2004. Pulque intake during pregnancy and lactation in rural México: alcohol and child growth from 1 to 57 months. *Eur J Clin Nutr* **58**(12): 1926-1634.
- Begley, M., Hill, C., Cormac, G., y Gahan, C. 2006. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology*. 29: 625-651.
- Bolivar, F., Escalante, A., Gosset, G., López Murguía, A., Martínez, A., y Rodríguez, M.E. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA análisis. *FEMS Microbiology Letters*. 235: 273-279.
- Brock, T.D., Madigan, M.T. y Smith, D.W. 1987. Clasificación de las bacterias de Bergey. En: *Microbiología*. Apéndice 4. 4 edición. ed. Almeida, B.O. Prentice-Hall Hispanoamericana , México. pp: 863 – 866.
- Camacho, C. 2005. Hidalgo: alarma elevado número de muestras ligadas al consumo del pulque. *La Jornada* (28 de agosto).
- Casal, M., Cardos, H., y Leao, C. 1996. Mechanism regulating transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 142: 1385.1390.
- Castillo, F. M.A. y Leyva, P. MA. 2001. Alcoholismo: El despojo de una herencia cultural a la caricatura del poder. *El cotidiano*. 20(132):64-77.
- Cavazonni, V., Adami, A., Castrovilli, G. 1998. Performance of broiler chickens suplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British Poultry Science*. 39:1385-1390.
- Cervantes, R. M. C. 2002. Los agaves (*Agave* spp). En: *Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México*. 1^{ra} ed. UNAM, Instituto de Geografía, Mexico. Pp: 63-73.
- Cervantes, C. M., Pedroza, R.M. 2007. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Publicacion científica en ciencias biomédicas*. 5(8): 101-112.
- Chellapandian, M., Larios, M., Sanchez, G.C., Lopez, M. 1988. Production and properties of a dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ

isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 21:51-56.

- Collins, C. 1989. Metodos microbiológicos. *Microbiology.* 7(9): 155.
- Cravioto, R.V., Lockhart, E.E., Richmond, K., Miranda, F. 1944. Composition of typical Mexican foods. *The journal of nutrition.* 34: 317-329.
- Delfín, G. ME. 2004. Breves noticias sobre la producción de pulque en Tacubaya durante la época colonial. Consultado en: http://www.historiacocina.com/paises/articulos/pulque.html#_ftnref3 Acceso: 14/12/2008.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, E., Thornton, G. Morrissey, D. O'Halloran, S. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr.* 73: 386-392.
- Escalante, A., Rodriguez, M., Martínez, A., López, M.A., Bolívar, F., Gosset, G. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Letters.* 235:273-279.
- Freydiere, A., Guinet, R. 1997. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol.* 14: 85-89.
- Galindo R. Con apoyo Biotecnológico renace bebida milenaria. www.periodistasenlinea.org. [revista en Internet] 2007 [Acceso 20 de Agosto 2008]. Disponible en: [http:// www.periodistasenlinea.org](http://www.periodistasenlinea.org).
- García, M. y Galván, V.R. 1995. Riqueza de las familias Agavácea y Nolinaceae en México. *Bol. Soc. Bot.* 56:7-24.
- Gilliland, S.E., Staley, T.E., y Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science.* 67: 3047-3041.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Savelin, M., Barakat, S., Gualtieri, S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences.* 37: 121-128.

Con formato: Español (México)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- González, B.E., Treviño, M., Jiménez, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN*. 4: 99-106.
- Harley, J.P., Klein, D.A. y Prescott, L.M. 2003. La diversidad del mundo microbiano. En: *Microbiología*. 4^a Edición. McGraw-Hill. Interamericana, España. pp: 407-436.
- Herrera, S.T. 2003. Forjadores de la ciencia en la UNAM. Ciclo de conferencias "Mi vida en la ciencia". Impresiones de un breve recorrido de la memoria a través de más de medio siglo en la UNAM.
- Jay, M. J. 1992. Alimentos fermentados y productos de fermentación afines. En: *Microbiología moderna de los alimentos*. 3^{ra} ed. Acribia, España. Pp: 441-479.
- Lemus, F. E. 2006. Los Enemas prehispánico como instrumentos para Aplicar probioticos. *Temas de Ciencias y Tecnología*. 10:17-26.
- Lesson, T., Lesson, C., Paparo, A. 1990. *Texto/Atlas de histología*. Editorial Interamericana. México D.F. pp.422-446.
- Lodger, J., y Kreger Van-Rij. 1952. The yeasts-a taxonomic study, North Holland Publishing. 3: 12-17.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J. 1998. Brock biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall, España. 155-156.
- Madrigal, G. S. 1999. La historia del pulque. Direccion: <http://veneno.com/1999/v-29/serg-29.html> Acceso: 12/12/2008.
- Malda, B. G. y Mossel, D. A. 2004. *Microbiología de los alimentos: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos* 4^{ta} ed. Acribia,S.A., España. Pp: 93-105.
- Martins, F., Ferreira, F., Penna, F., Rosa, C., Drummond, R., Neves, M., Nicol, J. 2005. Estudo do potencial probiotico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* a traves de testes in vitro. *Revista de Biologia e Ciencias da Terra*. 5:1-13.
- Marvan, L. L. Palacios, G. B. y Perez, L. A. B. 2001. Bebidas alcoholicas. En: *Sistema mexicano de equivalentes*. 2^{da} ed. pp:71.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Mitsui, J., Yasui, K., Nakamura, H., Kanazawa, H. 2005. Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochimica et Biophysica*. 1720: 125-136.
- Morales de Leon, J., Bourges, H., y Camacho, M.E. 2005. Amino acid composition of some mexican foods. *Alan*. 55: 4-12.
- Musacchio, H. 1999. Pulque. En: *Milenios de México*. Tomo III Editorial. Diagrama. México, D.F. pp. 2465, 2466.
- Narendranath, V., Thomas, K., Ingledew, W. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*. 3:171-177.
- NMX-V-037-1972. Pulque manejado a granel. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A. y Reyes-Gavilán, C.G. 2004. [Effect to the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in Bifidobacterium](#). *Int J. Food Microbiol.* 92: 79-86.
- North, W.R. 1961. Lactose pre-enrichment method for isolation of *Salmonella* from dried egg albumen. *Applied Microbiology*. 9: 188-195.
- Ortiz de M., B. 1990. Aztec Medicine, Health and Nutrition. New Brunswick: Rutgers University Press. pp:217.
- O'Sullivan, M.G. 1992. Probiotic Bacteria: Myth Or Reality? *Trends in Food Science & Technology*. 31: 309-314.
- Peña, A.D., Medina, A., Labastida, C., Capella, S., Vera, L. 2004. Characterization of three agave species by gas chromatography and soil-phase micro extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatography*. 1027:131-136.
- Prieto, P. J. y Ruiz, M. G. 1998. Características generales de los microorganismos. Nomenclatura y taxonomía. *Medicine*. 7(73): 3355-3360.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsy, M.T., McCormick, J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 16: 658- 672.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Robles, J., Gutierrez-Avila, J. H., Lopez-Cervantes, M., Borgues, G., Rosovski, H. 1992. La mortalidad por cirrosis hepática en México I. Características epidemiológicas relevantes. *Salud Publica Mexico*. (34) 378-387.
- Robles, J., Gutierrez-Avila, J. H., Lopez-Cervantes, M., Borgues, G., Rosovski, H. 1992. La mortalidad por cirrosis hepática en México II. Características epidemiológicas relevantes. *Salud Publica Mexico*. (34) 388-405.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*. 130: 396-402.
- Rose, A.H. 1987. Responces to the chemical environment. Rose, A.J, The yeast V2, yeast and environment. *Academic Press*. 6(3): 5.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morell L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland, S.E., and Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics – a Review. *International Journal of Food Microbiology* 44 (5): 93-106.
- Saloff-Coste, C.J. 1997. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos en la salud. *Acta pediátrica española*. 9 (2): 6-10.
- Sánchez-Marroquín, A. 1967. Estudios sobre la microbiología del pulque XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. *Rev Lat. Microbiol. Parasit*. 9: 87-90.
- Sanz, Y., Collado, M.C., Dalmau, J. 2003. Probioticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*. 61(9): 476-482.
- Saunders, G. C., Juliet, D., Helen, C. P., y Johanne, H. C. 2001. Interlaboratory Study on Thermal Cyler Performance in Controlled PCR and Random. Amplified Polymorphic DNA Analyses. *Clinical Chemistry*. 47(1): 47–55.
- Sepulveda, A. M. 2007. El pulque, la bebida de los dioses. Direccion: http://www.mexicodesconcido.com.mx/espanol/cultura_y_sociedad/gastronomia/detalle.cfm?idcat=18&idsub=89&idpag=2312 Acceso: 04/06/2008.

- SDR, 2007. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla. Cadena agroalimentaria de agave pulquero, 100 preguntas de la cadena de agave pulquero.
- Simon, G. L., Gorbach, S. L. 1984 Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. **86**(1): 174-93.
- Smet, I. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *The Journal Applied of Bacteriology*. 79(3): 292-301.
- Smith, L., S. Fung, M. Hunkapiller, T. Hunkapiller, y Hood, L. 1985. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 13(7): 2399-2412.
- Smith, L. J., Sandlers, R. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. Connell, C. Heiner, S. Kent, y Hood, L. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 321: 64-69.
- Spencer, J.F., Ragout, A.L. 2001. *Metodos microbiologicos*. Humana press. 8:173-181.
- Steinkraus, K.H. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. 8:311-317.
- Stirling, D. 2000. DNA Extraction from Fungi, Yeast, and Bacteria. *Methods in Molecular Biology*. 226: 235-242.
- St Pierre, M., Ruetz, S., Epstein, L., Gros, P., Arias, I. 1994. ATP- dependent transport of organic anions in secretory vesicles of *saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of Natural Academic Science*. 91: 9476-79.
- Struelens, J., y Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (MESGEM). 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiology and Infect.* 2(1): 2-11.
- Sychrovae, H., Ramirez, J., Peña, A. 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Letters*. 171:167-172.

- Tenover, F. C., Robert D. A., Goering, R. V., y the Molecular Typing Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 18(6): 426-439.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., y Hingledew, M.W. 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Environmental Microbiology*. 68(4): 1616-1623.
- Viegas, C., Almeida, P., Cavaco, M., Correia, I. 1998. The H1-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in Octanoid Acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:779-783.
- Young, R.J., y Huffman, S. 2003. Probiotic use in children. *Journal of Pediatric Health Care*. 17(16): 277-283.

12. ANEXO

Tabla 12.1 Composición de soluciones utilizadas en el PCR

ANEXO 1		
Buffer	Composición	Almacenaje
Buffer B1 (Buffer de lisis de bacterias)	50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 50 mM EDTA) pH 8.0; 0.5% Tween®-20; 0.5% Triton X-100	2–8°C o temperatura ambiente
Buffer B2 (Buffer de lisis de bacterias)	3 M guanidine HCl; 20% Tween-20	2–8°C o temperatura ambiente
Buffer C1 (Buffer de lisis de células)	1.28 M sucrose; 40 mM Tris·Cl, pH 7.5 mM MgCl ₂ ; 4% Triton X-100	2–8°C o temperatura ambiente
Buffer G2 (Buffer de digestion)	800 mM guanidine HCl; 30 mM Tris·Cl, pH 8.0; 30 mM EDTA, pH 8.0 5% Tween-20; 0.5% Triton X-100	2–8°C o temperatura ambiente
Buffer QBT (Buffer para equilibrar columnas)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100	2–8°C o temperatura ambiente
Buffer QC (Buffer de lavado)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0	2–8°C o temperatura ambiente
Buffer QF (Buffer para eluir)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris·C 15% isopropano	2–8°C o temperatura ambiente

