



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Evaluación e identificación de la especie *Kluyveromyces marxianus* como organismo probiótico del pulque de la región de Santiago Tlapacoya, Hidalgo, México.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**LAURA BERENICE OLVERA ROSALES**

**DIRECTOR: Dr. Marco Antonio Becerril Flores**

**MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO**

**2014**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
Licenciatura en Biología

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO  
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Laura Olvera Rosales**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **"Evaluación e identificación de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como organismo probiótico del pulque de la región de Santiago Tlapacoya, Hidalgo, México"**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Miguel Angel Villavicencio Nieto

PRIMER VOCAL: M. en C. Manuel González Ledesma

SEGUNDO VOCAL: Dra. Claudia Coronel Olivares

TERCER VOCAL: Dr. Marco Antonio Becerril Flores

SECRETARIO: Dra. Leticia Romero Bautista

PRIMER SUPLENTE: Biól. Ulises Iturbe Acosta

SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Angel Moreno Fuentes

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE  
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 30 de junio de 2014

M. en C. Miguel Angel Cabral Perdomo  
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



c.c.p. Archivo



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,  
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,  
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184  
Tel. +52 771 7172000 exts 2532, Fax 2109  
[cabralma@uaeh.edu.mx](mailto:cabralma@uaeh.edu.mx) [mcabralperdomo@gmail.com](mailto:mcabralperdomo@gmail.com)



## **Agradecimientos**

*“Educar no es dar carrera para vivir, sino temprar el alma para las dificultades de la vida “.*

*Pitágoras*

Agradezco al Doctor Marco Antonio Becerril Flores por aceptar dirigir mi proyecto de tesis y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, muchas gracias por todos los consejos, por los aprendizajes que me ha dado a lo largo de este tiempo, por mostrarme la importancia del trabajo en equipo, por confiar en mi y en este proyecto incluso cuando había veces que yo desconfiaba de mí misma, por alentarme a ser ambiciosa y siempre esforzarme al máximo para obtener los mejores resultados, por su amistad y su apoyo incondicional estaré siempre agradecida con usted.

A mis compañeros de laboratorio porque siempre conté con su apoyo y me enseñaron que el trabajo en equipo es una de las herramientas más importantes en esta carrera, sin ustedes las horas en el laboratorio hubieran sido completamente difíciles, gracias Abi García por ser la mejor compañera de laboratorio que pude tener y sobre todo una gran amiga te quiero muchísimo, César Espino De La Fuente gracias porque siempre estuviste para mí ayudándome a resolver mis dudas, apoyándome, dándome un consejo, instruyéndome en el mundo de la música, aprendí mucho de ti mil gracias pero sobre todo gracias por regalarme lo más bonito que un ser humano puede encontrar: amistad.

A Gil Castillo y Rosita por su apoyo, amistad y por todas las horas de pláticas y de buenos momentos en el laboratorio los quiero mucho.

A Paty González porque siempre estuviste para apoyarme no sólo en el ámbito académico sino también como una amiga y una mamá que cuida de todos nosotros, muchas gracias Paty eres una de las mejores personas que conozco y un gran ser humano.

Gracias a mis Sinodales por aceptar guiarme y apoyarme en este proyecto que más que eso se convierte en toda una aventura y una etapa importante en mi vida.

Por último agradezco a todos mis Maestros de la Licenciatura quienes en estos casi cinco años me han llenado de conocimientos, de grandes consejos, de aptitudes para enfrentarme a la vida, ellos con su gran experiencia me han inculcado importantes valores y me han dejado demasiadas enseñanzas, algunos más estrictos que otros cada uno a su manera me dejan los cimientos para forjar mi futuro y ser alguien útil para la sociedad.

### **Dedicatorias**

*“El sueño del héroe, es ser grande en todas partes y pequeño al lado de su padre.”*

*Victor Hugo*

Sin duda alguna yo no podría haber llegado a este momento sin el apoyo de mis padres. Doy gracias a Dios por haberme dado a los mejores maestros de vida, sin ustedes simplemente no sería lo que soy, gracias por su infinito amor y comprensión.

Gracias Papá, Lidio Olvera Vega por ser mi ejemplo a seguir, mi fortaleza la prueba clara de que con entereza, con fe, con mucho esfuerzo y trabajo se pueden lograr muchas cosas, gracias por los millones de consejos que siempre

me has dado, por creer en mí, por nunca dejarme sola y tener una palabra de aliento cuando pasaba malos momentos, lejos de toda ayuda material me diste algo que no tiene precio: amor sincero, no tienes idea de lo mucho que te admiro, gracias por acompañarme una vez más en esta etapa tan importante en mi vida, te amo papi.

A ti mamá, Leticia Rosales Leyva por ser más que mi madre, ser una amiga con la que siempre puedo contar, gracias por quererme de esa manera, por tus noches de desvelo cuidándome, por todo el amor que me das sin pedir nada a cambio, por apoyarme en mis decisiones y guiarme, por tu paciencia y todas los momentos de risas que hemos compartido, aunque los años hacen que poco a poco me separe de ti siempre estás en mi corazón, por eso te amo.

A mis hermanos, mis compañeros de vida no cabe duda que son de mis personas favoritas en el mundo, gracias doy a la vida y a Dios el poder tener hermanos como ustedes Diana Karina Olvera Rosales gracias por tu apoyo en todos los momentos de mi vida, por tus consejos porque aunque parece mentira siempre me pones los pies en la tierra, me haces ver las cosas como son realmente y no como las percibo desde mi fantasía, gracias mi princesa hermosa por nunca dejarme sola y consolarme cuando las lágrimas aparecen, gracias por los pleitos porque hasta de los malos ratos se aprende, te amo con todo mi corazón.

A ti hermanito Miguel Ángel Olvera Rosales mi niño, el pequeño de la familia, con quien nunca podría aburrirme pues tienes una alegría que contagia a todo el mundo, siempre he admirado esa cualidad en ti, gracias porque a pesar de ser el pequeño día a día aprendo algo de ti, te adoro y te amo siempre estás en mi corazón.

*“No era más que un zorro semejante a cien mil otros. Pero yo le hice mi amigo y ahora es único en el mundo.”*

*Antoine de Saint-Exupéry El principito*

Sin olvidar a quienes por estos años me han acompañado en el camino, bien dicen que si al principio son extraños una vez que los conoces se convierten en amigos e incluso los consideras familia, gracias a mis amigas: Abigail García Castro eres una de las personas más nobles que he conocido en esta vida, mi compañera de laboratorio la que tantas veces me ha apoyado y nos hemos dado ánimo para continuar en este camino que a veces se torna sinuoso gracias te quiero muchísimo.

Silvia Yalid Vargas Roldán gracias por la infinidad de consejos que me has dado, por compartir mis lágrimas, mis alegrías por reírte de mis chistes y hasta apoyar mis locuras y mis gustos raros, por levantarme mil veces cuando tropecé, eres y serás siempre una persona muy importante para mi te llevo en mi corazón nunca lo olvides.

Sandy Michel Villaseñor Reyes, mi compañera de locuras, siempre ideando nuevas aventuras, riendo pero también compartiendo sueños y tristezas, gracias por tu amistad y por abrirme las puertas de tu casa, tu familia y sobretodo de tu corazón.

Raquel Hernández gracias por todo tu apoyo, por tu amistad incondicional y por los buenos momentos que compartimos juntas. Saraí Trigueros siempre me apoyaste en cada momento, mil gracias por los consejos y todas las risas. Yuritzi Vargas sin duda eres una de las personas a quién admiro estás llena de fortaleza gracias infinitas por tu amistad. Con ustedes comencé este camino y

agradezco a la vida haberlas conocido porque realmente son personas increíbles, gracias por todos los buenos momentos y todas las enseñanzas, las quiero muchísimo.

Sergio Zamora, Genaro Cornejo, Karina Calva, Gustavo Montiel Paulina De La Cruz gracias por todos los consejos, las bromas y las enseñanzas y mil gracias por su amistad, un placer coincidir en esta vida con personas tan maravillosas los quiero mucho.

Por último dedicarle este trabajo a quien me enseñó tantas cosas desde niña, a ti abuelito Lidio Olvera, desde donde estés sé que estarás orgulloso de mí, tus consejos y tu sonrisa las conservaré en mi corazón eternamente, te extraño muchísimo, un beso hasta el cielo de tu nieta Laurita...

## Índice general

Índice de figuras .....	10
Índice de tablas.....	11
1. Resumen .....	12
2. Introducción.....	13
3. Marco teórico .....	14
3.1 El pulque .....	14
3.1.1 Características del pulque.....	15
3.1.1.1 Características físicas .....	15
3.1.1.2 Características químicas.....	15
3.2 Maguey pulquero .....	16
3.2.1 Proceso de elaboración del pulque .....	17
3.3 Proceso de fermentación.....	19
3.4. Alimentos funcionales .....	20
3.4.1 Probióticos.....	20
3.4.1.1 Probióticos naturales y comerciales.....	21
3.4.1.2 Agentes bioterapéuticos.....	21
3.5 Beneficios de los probióticos.....	22
3.6 Microorganismos probióticos .....	22
3.7 Microorganismos en el pulque.....	23
3.8 Criterios para la determinación de microorganismos probióticos .....	24
3.8.1 Viabilidad en pH ácido .....	24
3.8.2 Viabilidad en sales biliares.....	25
3.8.3 Viabilidad en jugo gástrico .....	25
3.8.4 Adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal.....	26
3.8.5 Inhibición de microorganismos patógenos .....	26

4. Antecedentes.....	27
5. Planteamiento del problema.....	30
6. Hipótesis.....	30
7. Justificación.....	30
8. Objetivo general .....	32
8.1 Objetivos particulares.....	32
9. Material y método.....	32
9.1 Aislamiento de microorganismos .....	32
9.2 Obtención del cultivo axénico .....	33
9.3 Tinción de Gram.....	34
9.4 Evaluación de la viabilidad a diferentes pH.....	35
9.5 Evaluación de la viabilidad en sales biliares .....	36
9.6 Evaluación de la viabilidad en jugo gástrico.....	36
9.7 Adhesión celular.....	37
9.8 Sistema de identificación de levaduras API 20 AUX.....	38
10. Resultados .....	40
10.1 Aislamiento de microorganismos .....	40
10.2 Viabilidad a diferentes pH .....	41
10.3 Viabilidad en presencia de sales biliares.....	45
10.4 Viabilidad en jugo gástrico .....	47
10.5 Adhesión celular en intestinos de ratones CD1 .....	48
10.6 Sistema de identificación de levaduras API 20 AUX .....	49
11. Discusión de resultados.....	51
12. Conclusiones .....	57
13. Referencias bibliográficas .....	58

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema general de aislamiento de los microorganismos de estudio .....	33
Figura 2. Esquema general para la preparación de la galería AUX .....	39
Figura 3. Levaduras aisladas a partir de muestra de pulque.....	40
Figura 4. Cultivos axénicos de levaduras aisladas de una muestra de pulque.	41
Figura 5. Pruebas de viabilidad en medio de cultivo líquido a distintos niveles de acidez .....	42
Figura 6. Cultivos de levaduras en agar tripticaseína de soya a diferentes pH	43
Figura 7. Curva de crecimiento de las Unidades Formadoras de Colonias presentes a distintos niveles de acidez .....	44
Figura 8. Colonias de levaduras a diferentes concentraciones de sales biliares .....	45
Figura 9. Número de UFC en presencia de bilis.....	46
Figura 10. Colonias de levaduras en presencia de jugo gástrico a diversos pH .....	47
Figura 11. Número de UFC en presencia de jugo gástrico .....	48
Figura 12. Levaduras en intestino delgado e intestino grueso .....	49
Figura 13. Resultados de la prueba API 20 AUX y perfil numérico .....	50

## Índice de Tablas

Tabla 1. Aminoácidos esenciales presentes en el pulquel .....	16
Tabla 2. Número de UFC/mL a diversos pH.....	44
Tabla 3. Número de UFC/mL en presencia de bilis .....	46
Tabla 4. Número de UFC/mL en presencia de jugo gástrico .....	47

## 1. Resumen

El pulque es una bebida tradicional de gran valor nutricional, estas aportaciones se deben a los microorganismos que lo componen, algunos de ellos pueden actuar como organismos probióticos, por lo que en este estudio se obtuvo una cepa de levaduras a partir de una muestra de pulque de la región de Tlapacoya, Hidalgo, México, la cual presentó características para considerarse probiótico. Una vez purificada la cepa y con la finalidad de determinar la capacidad probiótica de las levaduras aisladas se realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que las levaduras se mantienen viables y continúan creciendo en medio ácido, en sales biliares y en jugo gástrico, lo que demuestra tres de los criterios principales para la consideración de un microorganismo como probiótico, igualmente se demostró la presencia de la levadura en el intestino de ratones después de 72 horas de la inoculación lo que demuestra su capacidad para colonizar el epitelio intestinal, requisito fundamental de un microorganismo probiótico. Se utilizó el sistema de identificación de levaduras Api 20 AUX, los resultados muestran que las levaduras son capaces de utilizar gran cantidad de sustratos para su crecimiento demostrando que se trata de *Kluyveromyces marxianus* con un 99% de probabilidad en su identificación.

## 2. Introducción

El pulque es una bebida tradicional mexicana obtenida por fermentación de la savia azucarada, conocida como “aguamiel”, obtenida de diferentes especies de maguey; esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas en muchas regiones del país. Las principales características físicas del pulque son su color blanco, fuerte olor y su viscosidad (Peña-Álvarez *et al.*, 2004).

El proceso de fermentación del pulque inicia en el maguey donde se encuentran microorganismos como levaduras, bacterias productoras de etanol, bacterias lácticas, entre otras, que transforman de manera natural los azúcares disponibles en el aguamiel. El producto terminado es una bebida alcohólica con diversos grupos microbianos, entre los que se ha reportado *Zymomonas* sp. *Lactobacillus* sp. y *Saccharomyces* sp, (Maldonado *et al.*, 2001).

Estos consorcios microbianos pueden actuar en los consumidores a diferentes niveles al ser ingeridos por vía oral; por ejemplo, en la reducción de enzimas asociadas al cáncer gástrico, efecto antimicrobiano y competencia de nutrientes con bacterias patógenas. Por estas razones, dichos consorcios microbianos se pueden encontrar en diversas bebidas fermentadas como la leche, el yogurt y otros alimentos como la carne, algunos vegetales, el queso, entre otros; pero además, se pueden encontrar en el pulque (Fuller, 1989). Si algunos de estos alimentos causan efectos benéficos al ser humano pueden ser considerados como probióticos lo cual hace interesante el estudio de microorganismos del pulque con posible actividad probiótica.

### **3. Marco teórico**

#### **3.1 El pulque**

El pulque es una bebida tradicional mexicana de bajo contenido alcohólico, esta bebida tiene un carácter religioso debido a la carga emocional y cultural en torno al maguey, su origen se remonta a la época prehispánica, el enema a base de pulque más antiguo conocido en Mesoamérica, procede de Xochipala, Guerrero, México, y 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-Fuentes, 2006).

El pulque fue considerado como el néctar de los dioses; durante mucho tiempo formó parte importante de la dieta de básica de los mexicanos y ha sido elogiado por su gran valor alimenticio en conjunto con otros alimentos como el maíz y el frijol (Corcuera, 1991).

En México los principales estados productores de pulque son Puebla, Hidalgo y Tlaxcala, donde la extracción del aguamiel prevalece como una actividad económica de la región, llegando así a usar tecnología para mejorar el proceso de fermentación, envasarlo y poderlo comercializar (Granados, 1993).

### **3.1.1 Características del pulque**

#### **3.1.1.1 Características físicas**

El pulque es un líquido no clarificado el cual presenta un aspecto viscoso, es de color blanco y ligeramente turbio debido a los microorganismos que participan en el proceso de fermentación; es ácido, con un olor y sabor característico. El proceso de elaboración y producción de esta bebida requiere de medidas controladas para evitar la alteración de sus propiedades y su calidad. Se dice entonces que un buen pulque o pulque de calidad es reconocido sensorialmente por su olor y sabor (Anderson *et al.*, 1946).

#### **3.1.1.2 Características químicas**

Tanto el pulque como el aguamiel son consideradas bebidas con propiedades alimenticias. Estudios realizados a partir del pulque han demostrado que esta bebida contiene elementos importantes para la nutrición tales como azúcares, proteínas, hierro y vitaminas hidrosolubles (Backstrand *et al.*, 2002, Marvan *et al.*, 2001). Además de una gran cantidad de aminoácidos esenciales (Massieu *et al.*, 1948) los principales aminoácidos presentes en el pulque se pueden observar en el siguiente cuadro (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Aminoácidos esenciales presentes en el pulque (tomado de Massieu <i>et al.</i>,1948)</b>	
<b>Aminoácido</b>	<b>mg/100 mL</b>
Lysina	16.2
Tryptófano	2.7
Histidina	4.7
Fenilalanina	11.2
Leucina	10.5
Tyrosina	6.4
Metionina	0.7
Valina	6.6
Arginina	10.9

De igual manera el agua miel contiene agua, fructuosa, ciertos minerales como el hierro y el zinc así como Vitamina C (Loyola, 1966; Cravioto *et al.*, 1953).

### **3.2 Maguey pulquero**

El *Agave salmiana*, mejor conocido como agave pulquero es una de las especies que más se utilizan en la producción de pulque en nuestro país, aproximadamente el 75% del pulque producido en México proviene de esta especie (Gentry, 1982); es una planta productora de savia azucarada, aguamiel que posteriormente se fermenta para obtener el pulque.

El *Agave salmiana* ha sido cultivado por más de 5000 años y muchas de sus características probablemente han sido moldeadas debido a la asociación con el hombre durante muchos años (Martínez del Río y Eguiarte, 1987

Esta planta pertenece a la clase de las monocotiledóneas de la familia *Amarilidacea*, subgénero *Agave* y se encuentra dentro del grupo *Salmianae*, que cuenta con cinco especies de las cuales dos son endémicas de México (García-Mendoza y Galván, 1995) entre estas se encuentra *Agave salmiana* Otto la cual es la especie más abundante de maguey en nuestro país, se encuentra en los estados de Puebla, Tlaxcala y las planicies de Apan en el estado de Hidalgo; *Agave atrovirens* Karw que se distribuye principalmente en la sierra madre oriental en los estados de Puebla, Veracruz e incluso en algunas zonas de Oaxaca (Gentry, 1982).

Esta planta suculenta mide hasta tres metros de altura, crece en zonas áridas o semiáridas donde el suelo es arenoso, con temperaturas que oscilan entre los 13.6 y los 17.8 °C. Debido a las condiciones áridas donde crece, la planta presenta hojas anchas de gran tamaño, color verde oscuro su longitud varía de 1 a 2.5 m; los bordes de las hojas están provistos de espinas y en la parte terminal una fuerte púa de color oscuro; su tallo es corto y macizo en forma de roseta con el fin de almacenar agua (Abundis, 2007).

### **3.2.1 Proceso de elaboración del pulque**

El proceso inicia con el capado<sup>1</sup>, seguido de un reposo de seis meses; al término del cual, el tlachiquero<sup>2</sup> raspa el “corazón” de la planta para hacer un cajete<sup>3</sup> donde se acumula el aguamiel. El tlachiquero raspa el maguey de dos a tres veces al día con la finalidad de eliminar tejidos muertos y así dejar salir más aguamiel, de esta manera se pueden obtener hasta seis litros diarios durante tres a ocho meses tiempo de vida productiva de los magueyes pulqueros (Cervantes, 2008).

El aguamiel se retira con un acocote<sup>4</sup>, se deposita en el tinacal<sup>5</sup> y de ahí es depositado en barricas de cuero, roble, o encino. En la actualidad esto se ha modificado y se utilizan mayormente 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. Una vez cumplido este tiempo, se comienza a agregar aguamiel poco a poco, aumentando la cantidad diariamente hasta llegar los 60 días tiempo en el cual ya se puede percibir el olor característico; una vez que cumple con estos requisitos se puede llamar pulque; éste se pasará a otro recipiente limpio, se le quitará pulque y se le agregará más aguamiel con el fin de llevar a cabo una mejor fermentación, los recipientes que contienen el aguamiel deben estar a una temperatura ambiente de 20°C, sin importar la época del año, ya que si hay un aumento en la temperatura el pulque toma un sabor desagradable y si ésta desciende se dice entonces que el pulque no tiene cuerpo (Abundis, 2007; Anderson *et al.*, 1946).

---

<sup>1</sup> Corte del conjunto de las pencas más tiernas del maguey.

<sup>2</sup> Persona encargada de raspar el corazón del maguey para extraer el aguamiel.

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

<sup>4</sup>Calabaza larga agujereada por ambos extremos que se usa para extraer por succión el aguamiel del maguey.

<sup>5</sup>Instalación en donde el "mayordomo" o encargado lo vacía en tinas de madera.

### 3.3 Proceso de fermentación

La fermentación es un proceso mediante el cual habrá una obtención de energía en ausencia de oxígeno; en otras palabras la transformación de sustancias orgánicas por diversos microorganismos como bacterias y hongos en condiciones anaeróbicas (sin oxígeno) o por complejos enzimáticos los cuales pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano. Este tipo de fermentaciones tienen lugar cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles en la descomposición de materiales naturales (Steinkraus, 1997).

Gran cantidad de productos alimenticios que son denominados productos fermentados deben sus características y su producción a grupos de microorganismos fermentadores, los cuales les confieren el sabor y olor que los distinguen. Cuando el alimento es de tipo ácido y contiene azúcares, serán las levaduras las que crecerán con mayor facilidad y el alcohol que estas producen durante el proceso de fermentación alcohólica inhibe la actividad de otros microorganismos contaminantes.

El proceso de fermentación del pulque inicia en el maguey, debido a 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" que es una porción de pulque previamente producido (Bolívar *et al.*, 2004).

### **3.4. Alimentos Funcionales**

Los alimentos funcionales son considerados como aquellos que además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos benéficos sobre una o más funciones del organismo, fomentando así la salud y reduciendo el riesgo de enfermedades (Sanz *et al.*, 2003). Dichos beneficios se obtienen cuando se consume el alimento en las cantidades habitualmente presentes en la dieta. Ejemplos de alimentos funcionales pueden ser los que están enriquecidos con vitaminas y minerales como cereales y lácteos. Entre los alimentos funcionales más importantes se encuentran los probióticos, productos que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para poder modificar la microbiota de un huésped, ejerciendo así un efecto benéfico sobre la salud del mismo (Schrenmeir y Vrese, 2001).

#### **3.4.1 Probióticos**

La definición de probiótico fue determinada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO), las cuales en el 2001 hicieron un consenso. El comité formado por expertos en la materia llegó a la conclusión de que los probióticos son microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos en la salud del hospedador que los consuma (Mennickent y Green, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, los probióticos forman parte de uno de los grupos más importantes dentro de los alimentos funcionales; aunque han sido consumidos desde hace muchos años en productos fermentados como el

yogurt, no fue sino hasta los años noventa que Metchnikoff notó que existía un vínculo entre el consumo del yogurt y la longevidad de las personas, en sus estudios realizados en el Instituto Pasteur (Nagendra, 2007).

#### **3.4.1.1 Probióticos naturales y comerciales**

Los probióticos naturales son aquellos que se encuentran en lácteos fermentados, como yogurt, leche y quesos, vegetales como aceitunas y chucrut, soya, cereales, carnes, pescados y bebidas alcohólicas artesanales.

Los probióticos comercializados son probióticos naturales pero incorporados en algún producto alimenticio, por ejemplo, yogurt en formato comercial, obtenido a partir de diferentes cepas de microorganismos, y algunas leches de origen materno (Mennickent y Green, 2009).

#### **3.4.1.2 Agentes bioterapéuticos**

Son probióticos con efecto terapéutico comprobado. Se consideran medicamentos. Deben tener efectos terapéuticos inmediatos, ser resistentes a los antibióticos de uso común, impedir la adhesión de patógenos, presentar efectos de inmunomodulación, competencia con las toxinas por los receptores de éstas y competencia por los nutrientes. Los ejemplos mejor conocidos son una levadura, *Saccharomyces boulardii* y una bacteria, el *Lactobacillus casei* cepa GG, suministrados vía oral. (Mennickent y Green, 2009).

### **3.5 Beneficios de los probióticos**

En los últimos años el interés por el papel que juegan los probióticos en la salud del ser humano ha ido creciendo (Desmazeaud, 1996; Guarner y Schaafsma, 1998). Los beneficios de los probióticos son numerosos entre ellos la actividad antimicrobiana que presentan, la prevención de infecciones gastrointestinales, propiedades anticancerígenas, ayudan al metabolismo de la lactosa, son antidiarreicos, modifican la flora intestinal estimulando el desarrollo de la misma, reducen el colesterol y estimulan el sistema inmune (Simmering y Blaut, 2001).

### **3.6 Microorganismos probióticos**

La asociación más conocida entre derivados de productos lácteos y probióticos es la correspondiente a *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, la cual es utilizada de manera tradicional en la producción del yogurt. Se han encontrado varias cepas de organismos que forman parte de la microbiota intestinal aumentando así la diversidad de microorganismos considerados como probióticos; entre estos se encuentran otras especies de *Lactobacillus*, especies de *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, cepas de *Escherichia coli* e incluso especies de *Enterococcus* (Domínguez-Bello y Blaser, 2008).

Los probióticos son microorganismos vivos los cuales se caracterizan por tener una mínima o nula capacidad patógena; dichos microorganismos ya sean autóctonos u obtenidos mediante la alimentación, pueden inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos (Hilton *et al.*, 1995).

### 3.7 Microorganismos en el pulque

Los consorcios microbianos con frecuencia son encontrados en gran diversidad de bebidas fermentadas; debido a esta característica se considera que esta interacción es un mecanismo evolutivo positivo, ya que favorece a todas las poblaciones microbianas involucradas, de tal manera que les permite captar nutrientes, eliminar metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida, y controlar la biota microbiana que pueda alterar el proceso de fermentación (Chepalladian *et al.*,1988).

Los estudios realizados para identificar el contenido microbiano en el pulque reportan que a partir de esta bebida se pueden recuperar diversos grupos de microorganismos, los cuales han sido 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 *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae* (Escalante *et al.*, 2001). El producto final es una bebida fermentada con propiedades alcohólicas que, además, puede presentar ciertas propiedades probióticas debido a que contiene un consorcio microbiano similar al que se presenta en el tracto digestivo.

Dentro de los microorganismos que presentan actividad probiótica y que se recuperan a partir del pulque, destacan los géneros *Zymomonas* sp, *Lactobacillus* sp y en algunos casos *Saccharomyces* sp. (Cervantes y Pedroza, 2007). No obstante, es importante señalar que debido a las diferentes formas

de elaboración de pulque y el lugar de origen, se pueden identificar otros microorganismos que presenten las mismas características en cuanto a capacidad probiótica.

### **3.8 Criterios para la determinación de microorganismos probióticos**

Existen ciertos criterios para que un microorganismo se considere probiótico; dicho microorganismos debe cumplir con características importantes entre las que destacan las siguientes: no ser patógeno, ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y al efecto de la sales biliares en el duodeno, tener capacidad de adhesión a células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal, pero sin desplazar la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y aumentar de modo positivo las funciones inmunes y las actividades metabólicas del hospedador (Young y Huffman, 2003; Dunne, 2001). De igual manera el microorganismo puede ser de origen humano, es decir, que ya se encuentre presente de manera natural en el intestino humano.

#### **3.8.1 Viabilidad en medio ácido**

El organismo candidato a ser probiótico debe ser capaz de resistir el nivel de acidez del estómago humano el cual presenta un pH de 2.5 y, además, el tiempo medio de digestión que va desde que un alimento entra hasta que sale del estómago; este tiempo es aproximadamente de 90 minutos (Smet, 1995).

En general las células eucariontes mantienen el pH intracelular a pesar de las variaciones del pH extracelular, permitiéndole soportar varios rangos de acidez (Rose, 1987). La prueba de resistencia se realiza virando hacia la acidez el medio donde crece el microorganismo utilizando HCl para obtener

valores de 1.0 a 5.0, incubando por periodos de 24 horas, y realizando la determinación de viabilidad (Thomas *et al.*, 2002).

### **3.8.2 Viabilidad en sales biliares**

Otra característica importante que debe cumplir un microorganismo para poder ser considerado como probiótico es la capacidad de sobrevivir a las concentraciones de sales biliares que normalmente se encuentran en el intestino. La bilis es una sustancia excretada por la vesícula biliar, presenta un color verde y una consistencia acuosa, está compuesta principalmente de ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y algunos pigmentos que le dan el color verde característico (Begley *et al.*, 2006).

Para evaluar la resistencia de los microorganismos aislados a sales biliares, se suplementa el medio de cultivo utilizado con diferentes concentraciones de sales biliares, que van desde 0.1% a 3.5% (p/v), y se incuba por periodos de 24 horas, posteriormente se realizan las determinaciones de viabilidad ya sea mediante la presencia de turbidez o el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias UFC (Gilliand *et al.*, 1984).

### **3.8.3 Viabilidad en jugo gástrico**

El jugo gástrico es un compuesto producido en el estómago; presenta un pH muy ácido y tiene la función principal de degradar el alimento.

Está compuesto por agua mayoritariamente en un 98%, sales, ácido clorhídrico (HCl), mucoproteínas, enzimas proteolíticas, factor intrínseco, secreciones endócrinas e inmunoglobulinas. De todos estos compuestos, el

HCl, secretado por células gástricas parietales, es el encargado de mantener la acidez necesaria para llevar a cabo el proceso de digestión, ya que éste ablanda la fibrina y el colágeno, estimula la secreción pancreática y biliar y controla el paso de las bacterias al intestino (Lesson *et al.*, 1990). La evaluación *in vitro* se realiza elaborando un jugo gástrico artificial e incubando los microorganismos de interés para posteriormente realizar la determinación de viabilidad (O'sullivan, 1992).

#### **3.8.4 Adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal**

Cuando los microorganismos han llegado a su destino tienen que tener la capacidad de adherirse a las células de la mucosa intestinal, de esta manera evitan ser eliminados por las secreciones y los movimientos peristálticos propios del intestino.

Exopolisacáridos, proteínas y ácidos lipoteicoicos de la superficie celular bacteriana son algunos de los factores que podrían participar en la adhesión (Granato *et al.*, 1999; Roos y Jonsson, 2002; Pridmore *et al.*, 2004).

#### **3.8.5 Inhibición de microorganismos patógenos**

Los probióticos pueden ejercer una actividad antimicrobiana específica sobre un microorganismo o un grupo de microorganismos. Esta actividad puede deberse a la competencia por nutrientes, por sitios de unión al epitelio intestinal o bien a la producción de sustancias antimicrobianas (Fuller, 1989). Numerosos metabolitos producidos por microorganismos probióticos poseen actividad antimicrobiana, tales como los ácidos orgánicos, los ácidos grasos y el peróxido de hidrógeno (Mishra y Lambert, 1996; Ouwehand, 1998); Pero son

las bacteriocinas los compuestos que han sido más estudiados (Yildirim *et al.*, 1999; Boris *et al.*, 2001; Flynn *et al.*, 2002). Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos activos frente a microorganismos estrechamente relacionados con la especie productora (Jack *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 2001).

#### **4. Antecedentes**

La utilización de los probióticos se remonta a miles de años. La transformación de la leche en queso por medio de la acción de bacterias fue registrada hace 6,000 años atrás en las tablas sumerias (Mennickent y Green, 2009).

En 1908, el científico ruso Elie Metchnikoff recibió el premio Nobel por sus estudios en inmunidad celular; Metchnikoff descubrió cualidades benéficas en la fermentación de la leche, observó que los lactobacilos transformaban la lactosa en ácido láctico y dicha acidez confería un ambiente hostil para las bacterias patógenas (Gibson y Fuller, 2000).

Henry Tissier, un científico francés contemporáneo de Metchnikoff, observó que los niños que presentaban diarrea tenían una baja cantidad de bifidobacterias en sus heces, por el contrario en los niños sanos estas bacterias eran abundantes (Mennickent y Green, 2009).

En 1965, Lilly y Stiwell utilizaron por primera vez el término probiótico para denominar a sustancias secretadas por un organismo y capaces de estimular el crecimiento de otro. A esta definición le siguieron muchas más al paso de los años, y a medida del progreso de la investigación la Organización Mundial de la Salud y las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura formaron

un consenso para definir a los probióticos de la siguiente manera: “microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos benéficos en la salud del huésped” (Mennickent y Green, 2009).

En México, las bebidas alcohólicas tradicionales han tenido gran relevancia en la vida cotidiana de las comunidades indígenas. Desde la época prehispánica, las civilizaciones mesoamericanas fermentan una gran variedad de plantas nativas para la elaboración de bebidas alcohólicas y su consumo juega un papel importante en las regiones donde se producen debido a su utilización la curación (Bruman, 2000).

En las últimas décadas se han descubierto nuevos productos alimenticios cuyas propiedades nutricionales contienen probióticos que confieren beneficios a la salud humana. Estudios recientes señalan que también en el pulque se han encontrado microorganismos con capacidades probióticas (Lemus-Fuentes, 2006).

Estudios microbianos en pulque se han llevado a cabo desde finales del siglo XIX. En la actualidad en la microbiota reportada se encuentran bacterias como *Acetobacter aceti*, *A. aceti. xylinus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* sp. *Escherichia* sp. *Kokuria rosea*, *Lactobacillus* spp. *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus vermiforme*, *Leuconostoc* spp. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *caseolyticus* *Macrococcus*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina* spp. *Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis* (Herrera 1953; Gonçalves de Lima, 1990), y levaduras como *Cryptococcus* spp, *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae*,

*Debaryomyces carsonii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Pichia* spp, *Guilliermondii pichia*, *membranifaciens pichia*, *Rhodotorula* sp, *Mucilaginosa rhodotorula*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* y *Torulaspota delbrueckii* (Ruiz Oronoz 1953; Lappe y Ulloa, 1993)

Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez (2007) evaluaron las características microbianas y alcohólicas del pulque; a partir de cuatro muestras de pulque en diferentes etapas de fermentación denominadas aguamiel, semilla, contrapunta y corrida; se aislaron e identificaron los siguientes microorganismos: una cepa de hongo levaduriforme, una cepa de cocobacilo Gram negativo y una de bacilo Gram positivo pertenecientes a *Saccharomyces* sp., *Zymomonas* sp., y *Lactobacillus* sp., respectivamente. En este estudio se determinó en el pulque un elevado número de proteínas, azúcares reductores y poblaciones microbianas.

Lappe-Oliveras *et al.*, (2008) reportan en su estudio que en el pulque se encuentra gran diversidad bacteriana encontrando especies como *Lactobacillus* spp., *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Zymomonas mobilis* ssp. *Mobilis* y levaduras entre las que se encuentran *Saccharomyces Candida* spp., *Clavispora lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia* spp., *Torulaspota delbrueckii*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. Además reportaron los productos obtenidos en el proceso de fermentación de estos

microorganismos encontrando etanol, ácidos orgánicos, dextranos, vitaminas, aminoácidos, ésteres y aldehídos como los productos principales.

Ramírez-Higuera (2009) evaluó el efecto prebiótico del aguamiel con *Lactobacillus*, determinándose así gran cantidad de azúcares, proteínas y aminoácidos esenciales.

## **5. Planteamiento del problema**

Los microorganismos con capacidad probiótica son una buena opción ya que confieren beneficios nutricionales e inhibirían la colonización de bacterias patógenas. Estudios recientes han reportando propiedades nutricionales en el pulque; si se demostrara que dichas propiedades son conferidas por los microorganismos presentes en el pulque, si se lograra aislar estos microorganismos y comprobar su capacidad probiótica se obtendría una fuente de alimento óptima que además de proveer elementos esenciales para la nutrición, fuera una alternativa para la inhibición de bacterias patógenas causantes de enfermedades gastrointestinales.

## **6. Hipótesis**

En el pulque existen microorganismos con capacidad probiótica que proporcionan beneficios saludables a quienes los ingieren.

## **7. Justificación**

En los últimos años el estudio de los probióticos se ha incrementado debido a que son considerados como microorganismos bioterapéuticos por los diversos beneficios que éstos aportan a la salud humana, entre los que se

destacan la prevención de enfermedades gastrointestinales, del tracto urinario, respiratorio, enfermedades dermatológicas, prevención del cáncer de colon, además de equilibrar el sistema inmune.

Por todo, esto se han buscado nuevas alternativas que puedan ser utilizadas como probióticos ya que como sabemos los lactobacilos y bifidobacterias son los más importantes en la actualidad, pero no los únicos; el descubrimiento de nuevos alimentos enriquecidos con microorganismos probióticos ha ido aumentando el interés en la comunidad científica.

El pulque es una bebida importante por su valor nutricional. Podrían aislarse microorganismos que participan en la fermentación y que pueden considerarse como probióticos colocando al pulque como un alimento funcional, ya que además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos benéficos sobre una o más funciones del organismo (Saenz *et al.*, 2003).

La desnutrición es a menudo un factor que contribuye a la aparición de enfermedades comunes en la niñez; además que se asocia a muchas causas de muerte en menores de cinco años, en México la desnutrición ha sido considerada como uno de los principales problemas de salud pública durante varias décadas.

Al comprobar la capacidad probiótica de estos microorganismos aislados del pulque, se obtendrá un componente que pueda ser utilizado como un suplemento alimenticio, que pueda proveer elementos benéficos necesarios para la nutrición pero además que sea una alternativa para la inhibición de bacterias patógenas, ello conducirá a disminuir las tasas de desnutrición y evitar enfermedades gastrointestinales.

## **8. Objetivo general**

Aislar, identificar y evaluar microorganismos del pulque para determinar su capacidad probiótica.

### **8.1 Objetivos particulares**

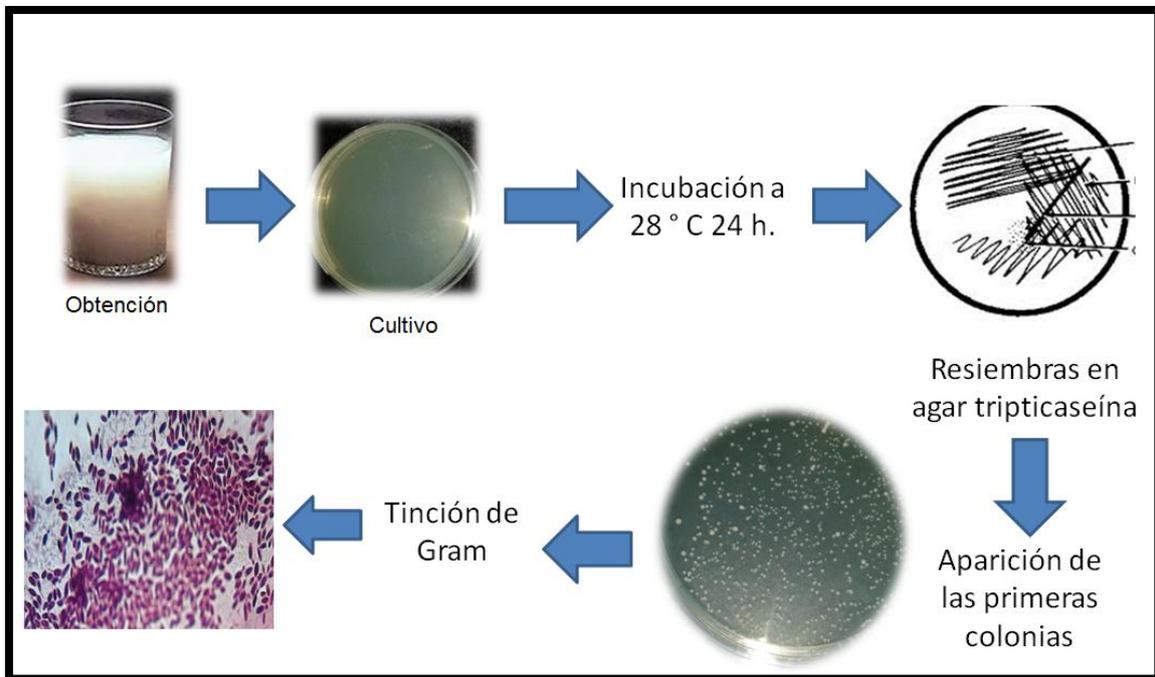
- Aislar microorganismos del pulque
- Determinar la resistencia de los organismos aislados del pulque a medio ácido, jugo gástrico y sales biliares mediante pruebas “*in vitro*”, para determinar su capacidad probiótica.
- Comprobar la adherencia a células epiteliales del intestino de ratones.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas los microorganismos aislados.

## **9. Material y método**

### **9.1 Aislamiento de microorganismos**

Se trabajó con una muestra de 500 mL de pulque de la región de Tlapacoya, Hidalgo la cual se obtuvo de un tinacal de dicho municipio dedicado a la comercialización de esta bebida. El muestreo se realizó en un recipiente de plástico limpio y estéril y transportado en una hielera hasta su utilización en laboratorio donde se sembró un inóculo mediante la técnica de vertido en placa en medio de cultivo agar tripticaseína de soya, incubándose a 28° C durante 24 horas, posteriormente se realizaron diversas resiembras en agar tripticaseína, una vez que aparecieron las primeras colonias se realizó tinción

de Gram para observar el tipo de microorganismos presentes en la muestra. (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema general de aislamiento de los microorganismos de estudio

## 9.2 Obtención del cultivo axénico

Se determinó aislar levaduras debido a la abundancia que presentaban en la muestra, considerándose relevantes para la finalidad del estudio por lo que se procedió a obtener cultivos donde solamente hubiera crecimiento de las mismas administrando a los medios de cultivo utilizados (agar tripticaseína de soya y caldo tripticaseína de soya), antibióticos, se utilizó Estreptomycin (100 mg/mL) en proporción de 1 mL del antibiótico por cada 100 mL de medio de cultivo, con la finalidad de evitar crecimiento bacteriano; se realizaron siembras con tres réplicas, de esta manera se obtuvieron cultivos de las levaduras tanto en medio sólido como en medio líquido.

### 9.3 Tinción de Gram

Para la observación de las levaduras se realizaron tinciones de Gram a pesar de que esta es una tinción para bacterias se empleó como método porque las levaduras se teñían perfectamente para su observación y se podía identificar si existía contaminación bacteriana en los cultivos y si era así determinar la posible fuente de contaminación. La técnica desarrollada en 1884 por el patólogo danés Hans Christian Gram se trata de una tinción diferencial que permite dividir a las bacterias en dos grupos principales de acuerdo a las propiedades de su pared celular; Gram positivas, las cuales retienen el colorante primario violeta de genciana o cristal violeta y las Gram negativas, las cuales se decoloran primero y se tiñen con safranina que es el colorante de contraste, las células se aprecian de un color rojo-rosa (Arciniega *et al.*, 2004).

La técnica se basa en extender una colonia de levaduras sobre un portaobjetos con una gota de agua corriente y fijarlo a la flama de un mechero. Se realiza la tinción con el colorante primario cristal violeta y se deja en contacto con la muestra durante un minuto, se lava con agua para eliminar el exceso de colorante, se agrega lugol y se deja en contacto durante un minuto, pasado este tiempo se retira el lugol y se agregan unas gotas de alcohol-acetona, se retira este compuesto y se agrega safranina, dejando este colorante en contacto con la muestra durante un minuto. Transcurrido este tiempo se lava nuevamente con agua para eliminar exceso de colorante y se deja secar la muestra, finalmente se procede a la observación bajo microscopio óptico (Arciniega *et al.*, 2004).

#### 9.4 Evaluación de la viabilidad a diferentes pH

Para determinar la viabilidad de las levaduras en un medio ácido se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas. Para las primeras a partir de un cultivo líquido de levaduras se tomó un inóculo de 100  $\mu\text{L}$  y se sembró en tubos que contenían 5 mL de caldo tripticaseína cuyo pH iba de ácido a básico con valores de uno a nueve, éste se ajustó utilizando ácido clorhídrico (HCl) sin diluir e hidróxido de sodio (NaOH), obteniendo así un tubo para cada valor de pH. Se utilizó, además, un control con pH constante de 7.5. Una vez inoculado cada tubo se incubaron durante 24 horas a 28° C, posterior al tiempo de incubación de cada uno de los tubos se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se sembró por agotamiento en placas que contenían agar tripticaseína de soya, dichas placas fueron incubadas durante 24 horas a 28° C, para observar la presencia de colonias de levaduras; el ensayo se realizó con tres réplicas (Thomas *et al.*, 2002).

Para las pruebas cuantitativas a partir de un cultivo líquido de levaduras se tomó una alícuota de 90  $\mu\text{L}$  y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripano obteniéndose una dilución 1/10, de ésta se tomaron 10  $\mu\text{L}$  para hacer un conteo de levaduras en cámara de Neubauer.

Un inóculo de  $1 \times 10^6$  (100  $\mu\text{L}$ ) de levaduras se sembró en tubos Ependorff que contenían 900  $\mu\text{L}$  de caldo tripticaseína a diferentes pH variando de uno a nueve, ajustando con HCl concentrado y NaOH.

Los tubos fueron incubados durante 4 horas a 37° C; posteriormente se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  para sembrarse por agotamiento en placas con

agar tripticaseína de soya las cuales se incubaron durante 24 horas a 37° C, después de la incubación se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. El ensayo se realizó con tres réplicas.

### **9.5 Evaluación de la viabilidad en sales biliares**

Con la finalidad de determinar la viabilidad de las levaduras al estar en contacto con sales biliares a partir de una solución stock que contenía 0.3 g de bilis bovina (Marca Sigma) y 10 mL de caldo tripticaseína de soya, se prepararon soluciones a concentraciones del 0.05 %, 0,15 % y 0.30 %; en cada una de estas soluciones se sembró un inóculo de  $1.512 \times 10^6$  levaduras provenientes del aislado en cultivo líquido; se incubaron durante dos y cuatro horas respectivamente a una temperatura de 37° C, tomando alícuotas de 10  $\mu$ L después de cada tiempo de incubación para sembrarse por agotamiento en placas agar tripticaseína de soya, las cuales fueron incubadas durante 24 horas a 37° C posterior a esto se realizó el conteo de las UFC/mL. El ensayo se realizó con tres réplicas.

### **9.6 Evaluación de la viabilidad en jugo gástrico**

Para determinar la viabilidad de las levaduras aisladas al estar en contacto con jugo gástrico se preparó jugo gástrico artificial adicionando 0.9 g de cloruro de sodio (NaCl) y 0.32 g de pepsina en 100 mL de agua destilada esterilizada, se ajustó el pH a cuatro, tres y dos utilizando NaOH y HCl concentrados, posteriormente se esterilizó por filtración con ayuda de filtro membranas de 0.32  $\mu$ m de diámetro del poro.

Se tomaron 900  $\mu\text{L}$  de jugo gástrico a pH de dos, tres y cuatro respectivamente y se inoculó en cada uno 100  $\mu\text{L}$  del aislado de levaduras, se incubaron durante 2 y 4 horas a 37° C tomando alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  después de cada tiempo de incubación para sembrarse en placas con medio de cultivo agar tripticaseína de soya, las cuales fueron incubadas durante 24 horas a 37° C, finalmente se realizó el conteo de las UFC/mL. El ensayo se realizó con tres réplicas.

## **9.7 Adhesión celular**

### **Inoculación en intestino de ratones CD1**

Para determinar si las levaduras son capaces de sobrevivir y seguir creciendo en condiciones lo más parecidas a las naturales, se utilizó intestino delgado e intestino grueso de ratones CD1.

Para la extracción de los intestinos se sacrificó el ratón y se desinfectó con alcohol al 70 %; posteriormente en un gabinete de bioseguridad se realizó una disección y se procedió a la extracción de los intestinos grueso y delgado, cortando un aproximado de 5 cm de cada uno, se realizaron enjuagues para eliminar residuos con buffer fosfato salino (PBS) solución fisiológica a la cual se le administró un mL de estreptomicina por cada 100 mL de solución y se colocaron en cajas Petri; posteriormente, se colocó un inóculo de  $2 \times 10^6$  levaduras sobre cada intestino y se dejaron en contacto durante dos horas y enseguida se realizó un enjuague con PBS. Se colocaron los intestinos en otras cajas Petri estériles, se agregó solución PBS para evitar la desecación de

los intestinos y se incubaron a 37° C durante 72 horas con el fin de propiciar la colonización de las levaduras en el tejido intestinal.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó un enjuague más y se realizó un raspado de cada intestino para obtener una mezcla homogénea la cual se sembró en cajas Petri que contenían medio de cultivo agar tripticaseína de soya y estaba adicionado con estreptomicina, ambas cajas cuyo inóculo provenía de intestino grueso e intestino delgado se dejaron incubar por un lapso de 72 horas a 37° C, después del tiempo de incubación se tomaron muestras de diversas colonias para realizar tinciones de Gram y determinar la presencia de levaduras.

### **9.8 Sistema de identificación de levaduras API 20 AUX**

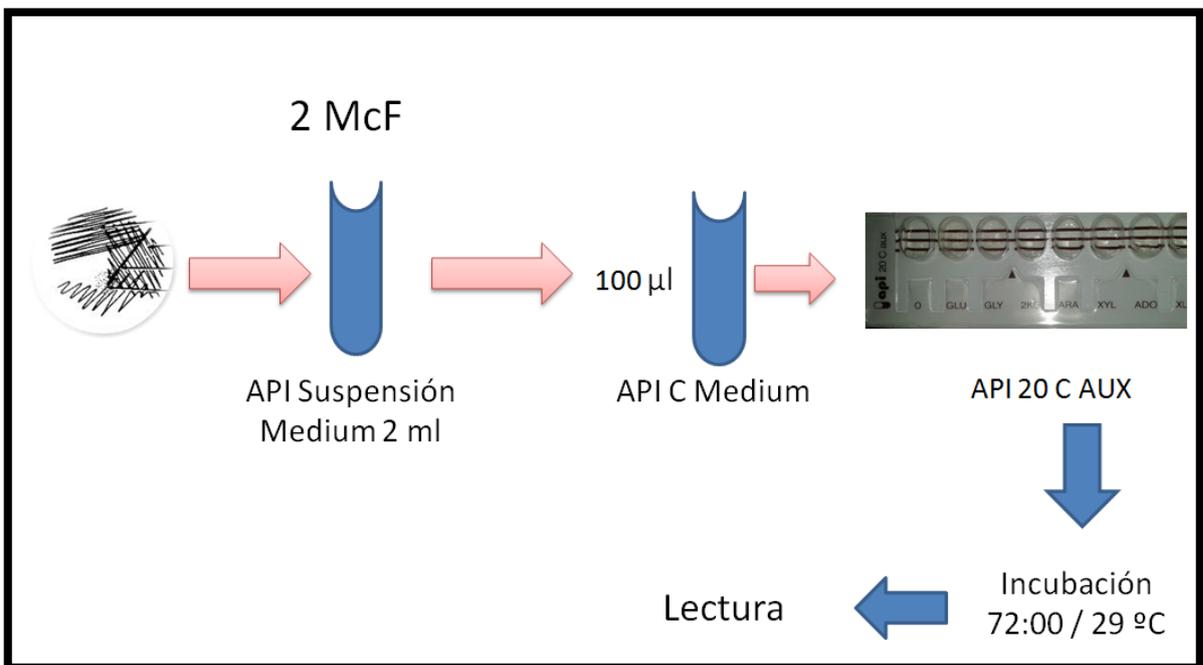
Se utilizó el sistema de identificación API 20 AUX, para determinar la especie de levaduras aislada. El sistema está constituido por 20 cúpulas que contienen substratos deshidratados. Se efectuaron 19 ensayos de asimilación.

Para la preparación de la galería se reunió fondo y tapa de una cámara de incubación y se colocaron aproximadamente 5 mL de agua destilada en los alveolos de la cámara, con la finalidad de crear una atmósfera húmeda, se retiró la galería del envase individual y se colocó en la cámara de incubación.

Para la preparación del inóculo con ayuda de un asa bacteriológica se extrajo una fracción de la colonia de un cultivo de levaduras para realizar una suspensión de turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland en ampolla de API medio de suspensión de 2 mL. Posteriormente, se transfirieron 100 µL de esta

suspensión a una ampolla de medio API C homogenizando con pipeta para evitar la formación de burbujas (Figura 2).

Se llenó cada una de las cúpulas de la galería con la suspensión obtenida en el medio API C, se cerró la cámara de incubación y se incubó de 48-72 horas a 29° C, realizando la lectura de los resultados después de cada tiempo de incubación. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad en un gabinete de bioseguridad.

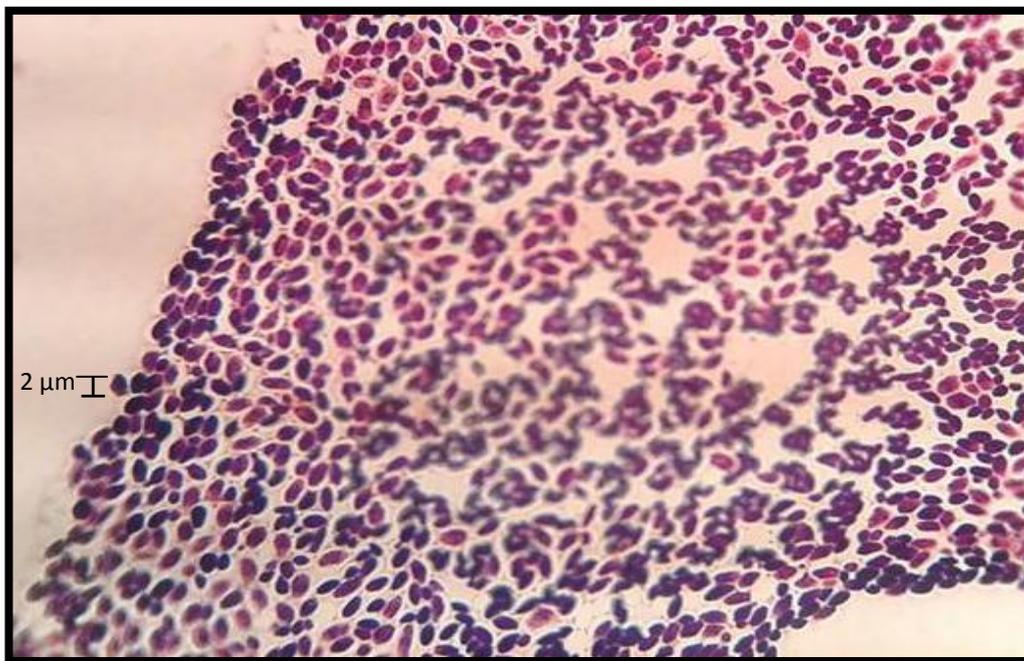


**Figura 2.** Esquema general para la preparación de la galería AUX

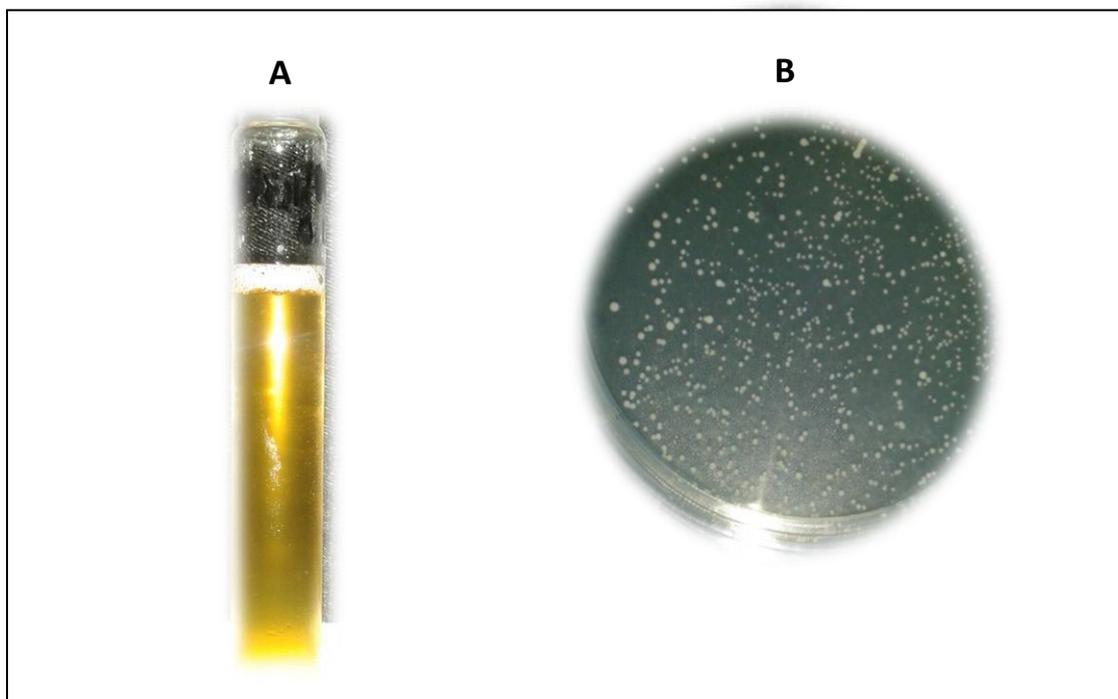
## 10. Resultados

### 10.1 Aislamiento de microorganismos

Se aislaron levaduras a partir de la muestra de pulque de la región de Tlapacoya, Hidalgo, se logró tener un cultivo axénico de levaduras tanto en medio de cultivo líquido y sólido (Figura 4). La presencia de las levaduras se determinó mediante la técnica de tinción de Gram, no se observó la presencia de bacterias (Figura 3).



**Figura 3.** Levaduras aisladas a partir de muestra de pulque, teñidas bajo la técnica de tinción de Gram y observadas al microscopio óptico a 100X



**Figura 4.** Cultivos axénicos de levaduras aisladas de una muestra de pulque. Obtenidos a partir de resiembras del cultivo inicial sembrado por vertido. A) Cultivo axénico de levaduras en medio líquido caldo tripticaseína de soya, B) cultivo axénico de levaduras en medio sólido agar tripticaseína de soya.

## 10.2 Viabilidad a diferentes pH

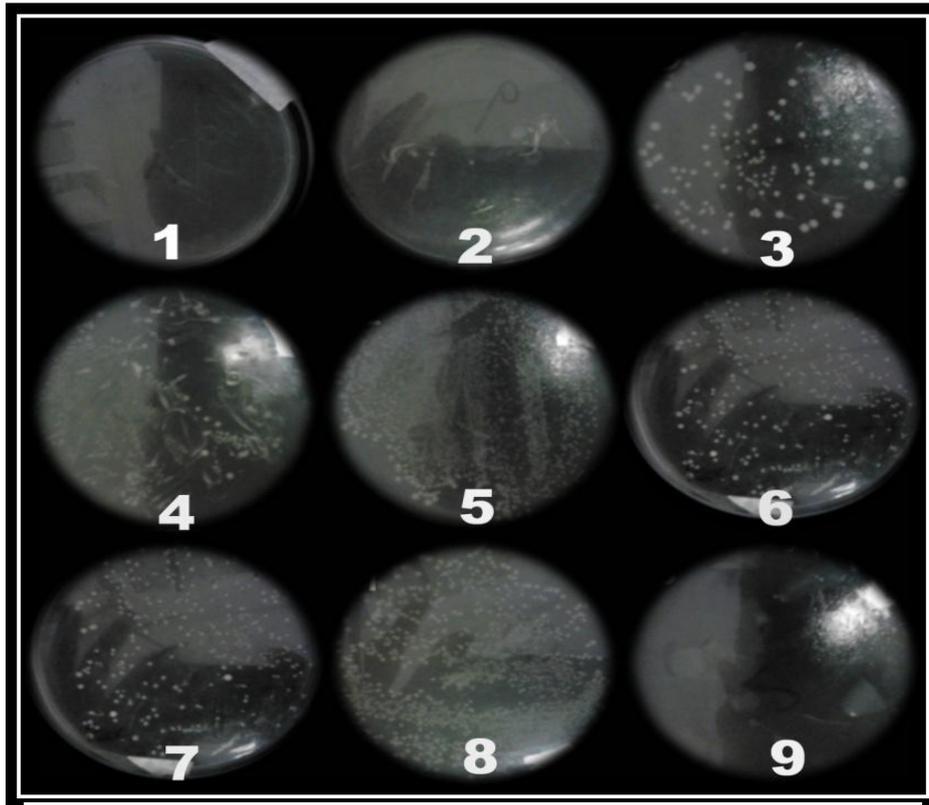
En cuanto a las pruebas cualitativas se observó crecimiento en los cultivos cuyo pH era de 2- 8. El crecimiento se determinó por turbidez en el cultivo y se comprobó la presencia de levaduras al realizar tinción de Gram; en los medios de cultivo a pH 1 y 9 no hubo crecimiento de levaduras, ya que no se observó turbidez en el medio y al realizar tinción de Gram no hubo registro de las mismas (Figura 5).



**Figura 5.** Pruebas de viabilidad en medio de cultivo líquido a distintos pH

El crecimiento de levaduras se determinó por la turbidez en cada tubo y se verificó mediante tinción de Gram.

Estos resultados también se vieron reflejados al momento de realizar la siembra en medio de cultivo agar tripticaseína de soya, ya que aparecieron UFC de levaduras en las placas cuyo inóculo provenía de los medios de cultivo a pH 2 a 8 al contrario de las placas cuyo inóculo provenía de un medio de cultivo a pH 1 y 9 (Figura 6).

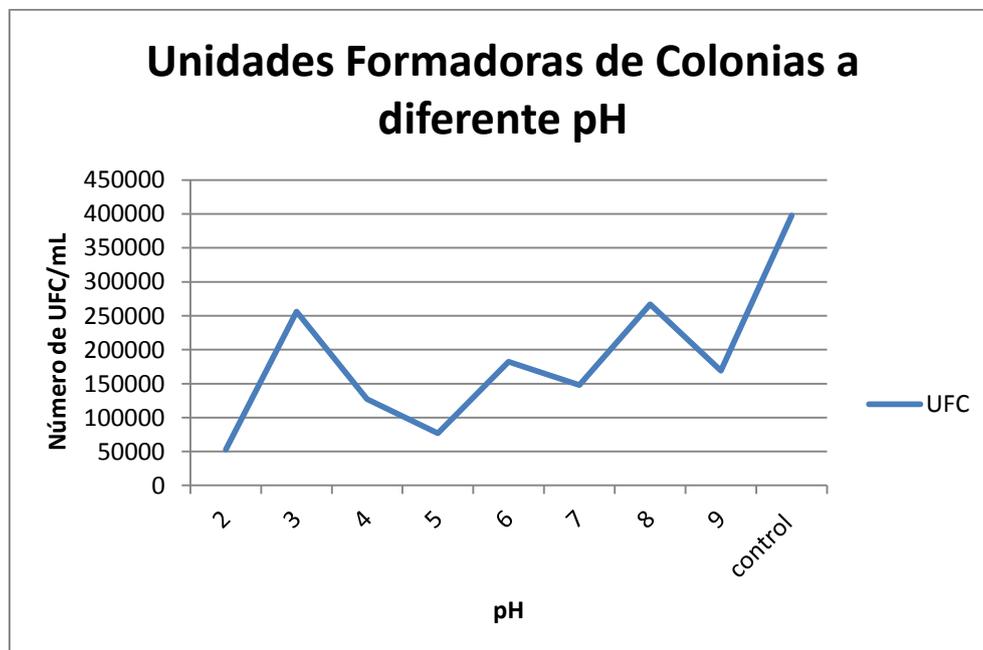


**Figura 6.** Cultivos de levaduras en agar tripticaseína soya a diferentes pH. El número indica el valor del pH del medio.

Se observan colonias de levaduras en las placas cuyo inóculo provenía de un cultivo líquido con variación en su pH entre 2 y 8.

En cuanto a las pruebas cuantitativas al realizar el conteo de las UFC se observó que hubo un número considerable de sobrevivencia a pesar de encontrarse en un medio ácido, los resultados del conteo de UFC se muestran en el cuadro 2, que indica que al disminuir el pH existe menor sobrevivencia o resistencia al pH ácido, no obstante se puede afirmar que existe crecimiento de microorganismos en un pH ácido de 2, tal como se observa en la figura 7.

Tabla 1. Número de UFC/mL a diversos pH	
pH	UFC
2	5.28x10 <sup>4</sup>
3	25.6x10 <sup>4</sup>
4	12.72x10 <sup>4</sup>
5	7.69x10 <sup>4</sup>
6	18.2x10 <sup>4</sup>
7	14.78x10 <sup>4</sup>
8	26.69x10 <sup>4</sup>
9	16.89x10 <sup>4</sup>
control	39.78x10 <sup>4</sup>



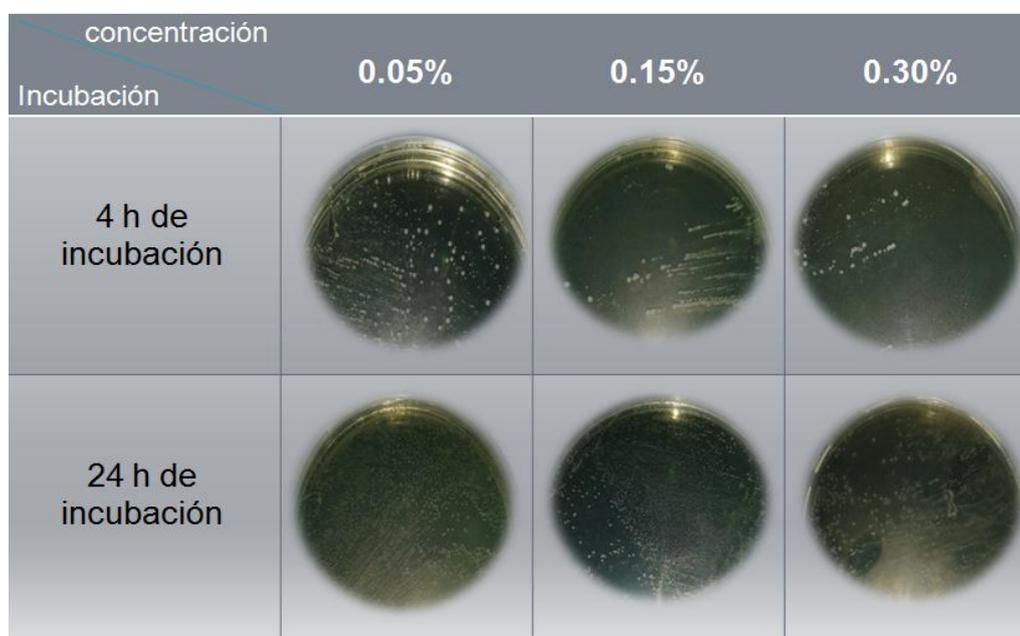
**Figura 7.** Curva de crecimiento de las Unidades Formadoras de Colonias presentes a diferentes pH

Se aprecia en general que el número de UFC aumenta conforme el pH del medio aumenta también, sin embargo, hay un número considerable de UFC a pH ácido, de 2.

### 10.3 Viabilidad en presencia de sales biliares

Se observó crecimiento de colonias de levaduras en las placas sembradas con inóculo de levaduras en contacto con sales biliares a todas las concentraciones utilizadas (Figura 8).

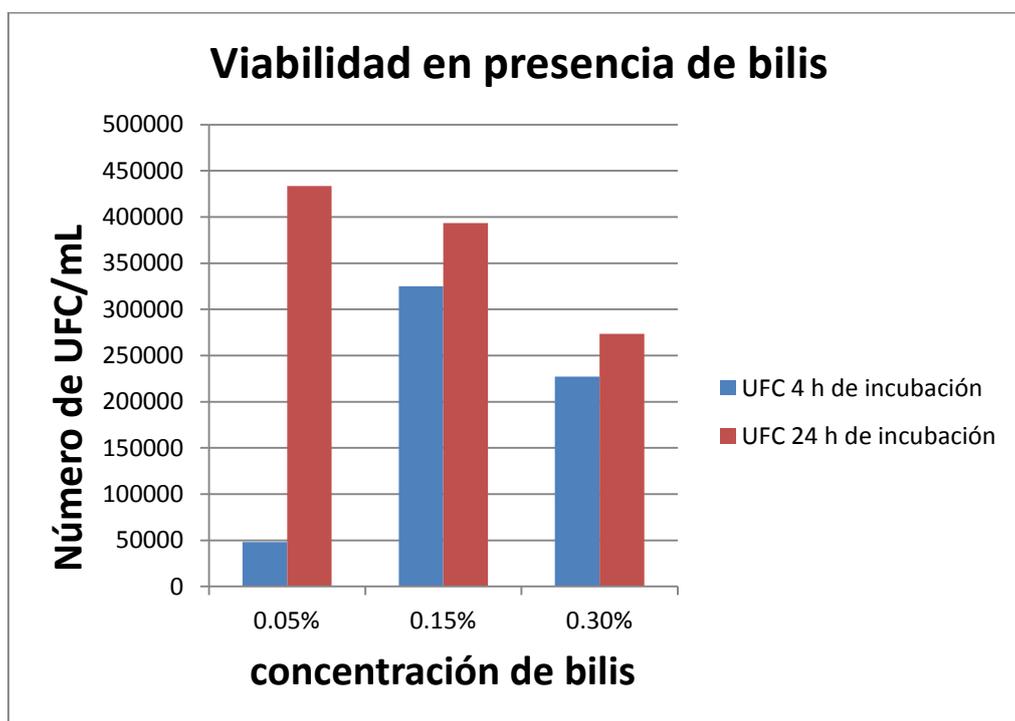
Determinando así que las levaduras son capaces de sobrevivir y continuar su crecimiento a pesar de encontrarse en un medio de sales biliares.



**Figura 8.** Colonias de levaduras a diferentes concentraciones de sales biliares

El crecimiento se presentó para ambos tiempos de incubación dos y 24 horas; aunque el número de UFC fue mayor en las placas donde el inóculo estuvo a 24 horas de incubación y que contenía un porcentaje del 0.05% de sales biliares, aún así, el número de UFC en las otras concentraciones de sales biliares fue alto tal como se observa en la tabla número 3 y en la figura 9.

Tabla 2. Número de UFC/mL en presencia de Bilis		
Concentración	UFC 4 h	UFC 24 h
0.05%	$4.8 \times 10^4$	$43.34 \times 10^4$
0.15%	$3.25 \times 10^4$	$39.33 \times 10^4$
0.30%	$2.27 \times 10^4$	$27.36 \times 10^4$



**Figura 9.** Número de UFC/mL en presencia de bilis.

Los resultados muestran que a menor concentración de bilis hay mayor número de UFC; de igual manera éstas aumentan a medida que avanza el tiempo de incubación.

#### 10.4 Viabilidad en jugo gástrico

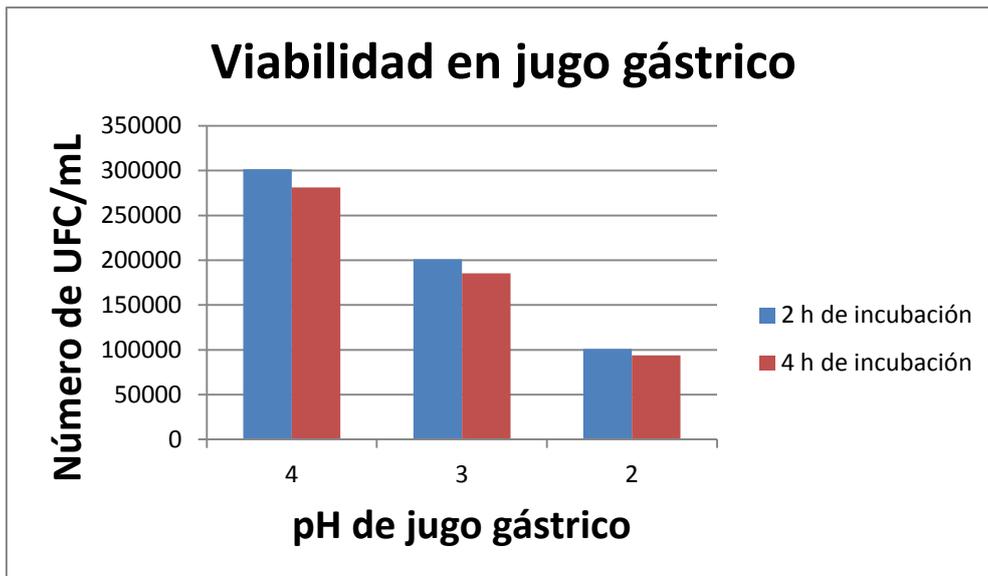
De acuerdo a esta prueba se puede observar claramente que las levaduras sometidas a concentraciones ácidas y alcalinas de jugo gástrico sobreviven y continúan creciendo hasta las cuatro horas posteriores de su incubación (Figura 10).



**Figura 10.** Colonias de levaduras en presencia de jugo gástrico pH 4-2

Al realizar el conteo de UFC se observó que había un número mayor de éstas en cultivo donde el inóculo estuvo en contacto con jugo gástrico a pH 4 y conforme el pH del jugo gástrico era más ácido el número de UFC disminuyó, no obstante, el decremento no fue drástico y hubo crecimiento de microorganismos en un pH de jugo gástrico ácido (Tabla 4, Figura 11).

<b>Tabla 3. Número de UFC/mL en presencia de jugo gástrico</b>		
pH	2 h de incubación	4 h de incubación
4	$30.15 \times 10^4$	$28.11 \times 10^4$
3	$20.1 \times 10^4$	$18.54 \times 10^4$
2	$10.1 \times 10^4$	$9.4 \times 10^4$

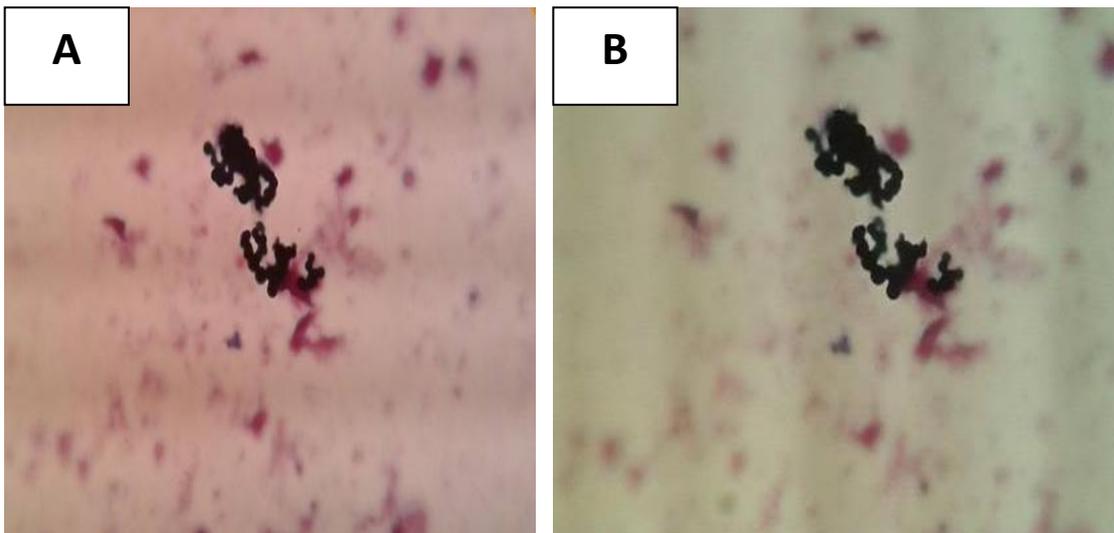


**Figura 11.** Número de UFC/mL en presencia de jugo gástrico.

Los resultados muestran que el número de UFC disminuye a medida que transcurre el tiempo de incubación; de igual manera se presenta mayor número de éstas en jugo gástrico de pH 4, sin embargo, hay un número considerable de UFC en jugo gástrico con pH 2.

### 10.5 Adhesión celular en intestinos de Ratones CD1

Se observaron levaduras aún después de 72 horas, tanto para el medio de cultivo que fue sembrado con intestino delgado, como para el que fue sembrado con intestino grueso, lo que denota que las levaduras fueron capaces de colonizar el tejido epitelial y sobrevivir durante las siguientes horas (Figura 12).

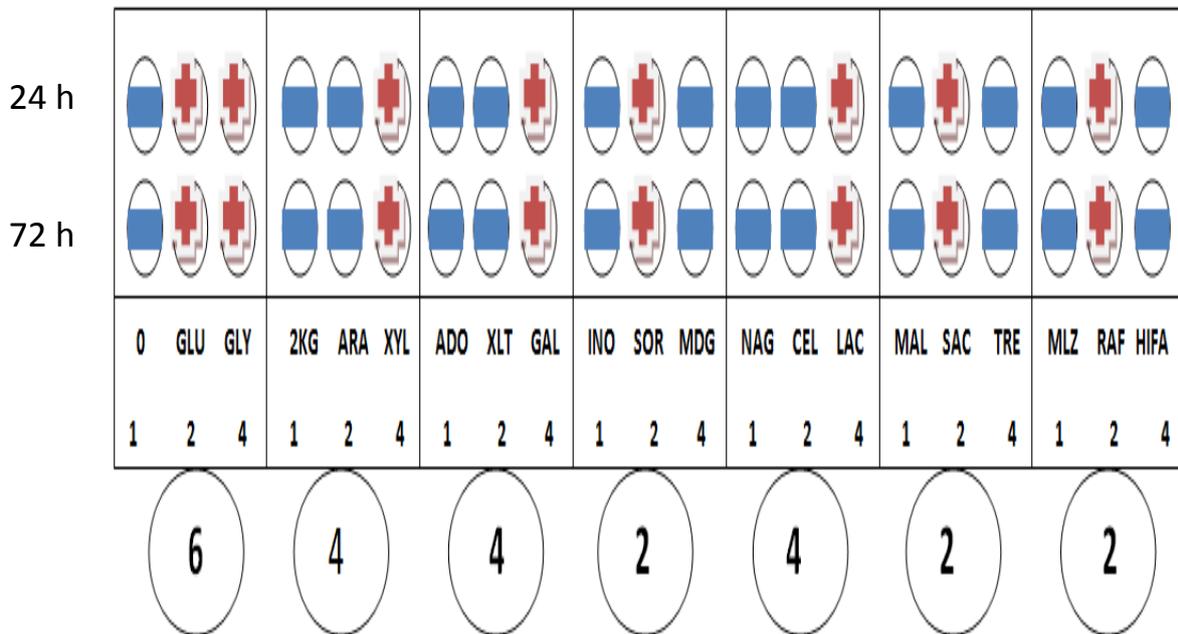


**Figura 12.** Levaduras en intestino delgado (A) e intestino grueso (B), teñidas mediante la técnica de Gram y observadas al microscopio óptico a 100X

### 10.6 Sistema de identificación de levaduras API 20 AUX

Se determinó que la levadura es capaz de utilizar una gran cantidad de substratos para crecer siendo en su mayoría carbohidratos; el perfil numérico se obtiene de la siguiente manera: los substratos se separan en grupos de tres, para cada uno de los substratos se tiene un valor asignado, el cual ya está determinado y puede ser 1, 2 ó 4, para obtener el perfil numérico se suman los valores de los substratos que presentaron un resultado positivo.

Para el caso de las levaduras aisladas el perfil numérico obtenido al sumar el valor de las reacciones positivas fue 6-4-4-2-4-2-2; los resultados se muestran en la figura 10, así como los substratos donde hubo un crecimiento de levaduras (reacciones positivas) en ambos tiempos de incubación, 24 y 72 horas.



**Figura 13.** Resultados de la prueba API 20 AUX y perfil numérico obtenido para la posterior identificación

Los substratos de la galería se agrupan en tres con un valor asignado para cada uno; las reacciones positivas en cada substrato donde hubo crecimiento de levaduras se observan con signo + en color rojo mientras que las reacciones negativas donde no se observó crecimiento en los substratos se denotan con signo – en color azul.

Una vez obtenido el perfil numérico se procesó mediante el programa Api Web, un catálogo de especies de levaduras ya identificadas mediante este tipo de ensayo, el resultado obtenido respecto a la identificación es que la especie de levadura aislada pertenece a *Kluyveromyces maexianus* con un porcentaje de identificación del 99 %.

## 11. Discusión de Resultados

Se aislaron unas levaduras similares a las obtenidas por Cervantes-Contreras y Pedraza-Rodríguez (2007) quienes identificaron bioquímicamente las levaduras que lograron aislar como *Saccharomyces* sp. Escalante *et al* (2004) señalan que hay una gran diversidad microbiológica en el pulque, tanto bacterias, como levaduras; mientras que Galindo (2009) afirma que de esta bebida se pueden obtener más de 50 diferentes géneros de microorganismos. Esto depende en gran medida del agave que se utilice y el medio de cultivo que se emplee para realizar el aislamiento.

Para evaluar la factibilidad del microorganismo aislado y para considerarlo como posible probiótico se consideraron cuatro criterios; como es la tolerancia a pH, viabilidad en sales biliares, la resistencia a jugo gástrico y la adhesión a células epiteliales del intestino de ratones.

Al someter a la cepa de levaduras aisladas a diferentes concentraciones de pH que iban desde valores de 1 a 9, se observó que existe crecimiento en la mayoría de las concentraciones empleadas, siendo la excepción la concentración de pH 1 y 9, aún así hubo crecimiento en medio ácido de pH 2 que reportó valores de  $5.28 \times 10^4$  UFC/mL, reflejando lo esperado para esta prueba, que la levadura fuera capaz de crecer en medio ácido, ya que debe ser capaz de resistir el pH ácido de 2.5 del estómago humano. Cuando el pH incrementó se reportó un aumento de crecimiento optimizando su crecimiento.

Fujimori (2007) en su estudio afirma que la tolerancia a diferentes concentraciones de pH puede deberse a los antiportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que

poseen las levaduras; estos antiportadores son de origen proteico y están situados en la membrana plasmática, de igual manera se encuentran en el sistema endomembranal de las mismas. La función de los antiportadores es catalizar el intercambio de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) e  $\text{H}^+$  a través de la membrana, regulando así las concentraciones de cationes y pH a nivel citoplasmático y organelos. Es posible que la resistencia de la levadura a las diferentes concentraciones de pH se deba precisamente a estos antiportadores aunque existe otro posible mecanismo para regular los cambios de pH y la concentración de iones; éste es la presencia de una ATPasa, la cual es codificada por el gen *pma1* y que también se localiza en la membrana citoplasmática, esta enzima crea un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos; este tipo de transporte está implicado en el mantenimiento del pH cercano a la neutralidad y además de ser un componente de suma importancia para que la levadura pueda adaptarse a un medio ácido, es útil para otras funciones fisiológicas en la levadura dentro de las cuales se encuentra la regulación intracelular de cationes y aniones y la toma de nutrientes (Viegas *et al.*, 1998; Sychrova *et al.*, 1999, y Thomas *et al.*, 2002).

Para el aislamiento de la levadura se utilizó caldo de soya y tripticaseína según Narendranath *et al.*, (2001) reportaron que la levadura *S. cerevisiae* es más resistente cuando se adiciona al medio de cultivo empleado algunos compuestos ácidos. El medio de cultivo utilizado en este estudio como ya se mencionó es caldo tripticaseína de soya el cual contiene en su fórmula peptona de caseína, peptona de soya que provee nitrógeno, vitaminas y minerales, y

cloruro de sodio, elementos que pudieron conferirle protección a la levadura haciendo que mantuviera el balance osmótico del medio.

En cuanto a la tolerancia a las sales biliares, se puede decir que al someter al microorganismo a diferentes concentraciones de sales biliares se observó que las levaduras son capaces de de crecer en todas las concentraciones de una manera estable a una temperatura de incubación de 37° C. Gilliland *et al.* (1984) Señalan en su estudio que la concentración óptima que debe resistir un microorganismo probiótico es de 0.3% (p/v); la mayoría de las especies de levaduras pueden crecer inclusive en presencia de 0.75% (p/v) de sales biliares; no obstante, en este trabajo se encontró que hubo crecimiento del microorganismo en la mayor concentración empleada de sales biliares posterior a la incubación. Concluyendo así que está es una especie de microorganismo capaz de tolerar concentraciones de sales biliares desde 0.05% (p/v) hasta 0.3% (p/v), sin que esto altere su actividad metabólica; así cumple con una característica importante para considerarse microorganismo probiótico.

Para evaluar la viabilidad y resistencia de las levaduras aisladas en jugo gástrico se emplearon diversas concentraciones; el jugo gástrico que es secretado diariamente en el estómago humano presenta un pH de 1.5 a 2 aproximadamente (Thomas *et al.*, 2002). Además de esta característica el jugo gástrico presenta una concentración de sales de 0.5% (p/v), que generan la activación de mecanismos de resistencia, debido a proteínas de membrana que internalizan estas sales y a vacuolas que participan en su posterior degradación. Esta secreción presenta a su vez una barrera enzimática compuesta básicamente por enzimas proteolíticas; en conjunto estos factores

forman una barrera que resulta letal para la mayoría de los microorganismos ya que son degradados al momento de estar en contacto con el jugo gástrico, (Martins *et al.*, 2005). Debido a esto, si un microorganismo es capaz de sobrevivir a estas condiciones y librar la barrera puede entonces ser considerado como un buen candidato probiótico. En este trabajo los resultados muestran que los microorganismos se mantienen estables al estar en contacto con el jugo gástrico, presentando valores de  $9.4 \times 10^4$  UFC/mL en concentraciones de pH de 2 y mantienen un crecimiento estable durante las 4 horas de incubación posteriores. Concluyendo que las levaduras cumplen con este criterio para la determinación de su capacidad probiótica.

La prueba de de inoculación en intestino grueso y delgado de ratones muestra que estas levaduras son capaces de colonizar el tejido intestinal hasta por un periodo de 72 horas, la adhesión de las células en la mucosa y en el tejido es un proceso realmente complejo el cual implica el contacto de las células con la superficie del tejido; esto puede verse afectado por la estructura y por la composición de las células que se encuentran en el tejido y que interactúan con el medio, la capacidad que tengan las levaduras para adherirse a la mucosa y tejido intestinal es una característica muy importante para ser considerado un microorganismo probiótico. Boris *et al.* (1997) y Del Re *et al.* (2001) aseguran que la capacidad de agregación de algunas especies de levaduras depende en gran medida de las propiedades de adhesión que presenten las células, es importante mencionar que son pocos los trabajos realizados respecto a la adhesión de células en la mucosa de intestinos que han sido extraídos, sin embargo, Collado (2005) reportó que existe adhesión de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus*, siguiendo el mismo procedimiento

que se empleó en este estudio, con la diferencia que el medio de cultivo empleado fue MRS el cual es un medio específico para el crecimiento de lactobacilos. Aún así los resultados en el presente estudio muestran que las levaduras permanecen viables hasta en un periodo de 72 horas y se adhieren al tejido intestinal de los ratones aunque este fue extraído e incubado en condiciones *in vitro*.

En cuanto a la identificación de la levadura, realizada mediante el sistema de identificación de levaduras API 20 AUX, el resultado muestra que las levaduras aisladas corresponde a la especie *Kluyveromyces marxianus*.

Esta levadura también conocida como *Saccharomyces kefir* o *Kluyveromyces marxianus* pertenece al género *Kluyveromyces* descrito por primera vez en 1888 por (E.C. Hansen) Van der Walt. Su aislamiento ha sido a partir del jugo de uva, de algunos productos lácteos como el queso, la leche o el yogurt así como de bebidas fermentadas tales como el pulque y el kéfir (Fonseca *et al.*, 2008). Diversos estudios se han realizado para conocer los aspectos bioquímicos y metabólicos de esta levadura, encontrando que crece en gran variedad de sustratos, tal como se muestra en la galería API 20 AUX donde se observó que utilizaba para su crecimiento sustratos como la glucosa, galactosa, lactosa y sacarosa, entre otros. De igual manera, se ha encontrado que crece a temperaturas que van desde los 20° C hasta los 39° C (Roostita y Fleet, 1996) dato que coincide con el presente estudio ya que para su crecimiento la levadura fue incubada a 37° C. En cuanto a su utilización en la industria se ha empleado para la producción de proteína unicelular a partir del

lactosuero y por sus propiedades en la fermentación de diversos sustratos (Fonseca *et al.*, 2008).

El consumo de pulque en México es una actividad que ha ido perdiendo auge debido a la introducción de otras bebidas como la cerveza y el vino, sin embargo, tiene un gran valor cultural, siendo una de las principales bebidas consumidas en regiones urbanas del país. Como se manifiesta en este trabajo el pulque aporta elementos nutritivos que han sido reportados desde hace muchos años; los microorganismos implicados en el proceso de fermentación constituyen un punto importante de estudio debido a dichos aportes nutricionales.

La levadura *Kluyveromyces marxianus* tiene sin duda gran potencial biotecnológico, en campos como la industria se ha empleado para el procesamiento de lactosuero, además fermenta una gran cantidad de carbohidratos como galactosa, sacarosa, rafinosa y lactosa; se ha utilizado en la producción de etanol y en la producción de compuestos aromáticos como esteroides, ácidos carboxílicos y alcoholes (Fonseca *et al.*, 2008; Jakobsen y Narvhus, 1996). Este organismo cuenta con las principales características para considerarse un probiótico por lo que representa además un microorganismo de importante potencial para usarse en el ámbito de la salud humana, pudiendo ser utilizado como un suplemento alimenticio que confiera elementos benéficos y que además sea capaz de mantener en equilibrio la microbiota intestinal de las personas que lo consuman.

## 12. Conclusiones

- Se aisló una cepa de levaduras provenientes de una muestra de pulque de la región de Santiago Tlapacoya, Hidalgo, México.
- Se determinó que las levaduras aisladas son capaces de resistir a condiciones similares a las del tracto gastrointestinal como son pH ácido, concentraciones de sales biliares desde 0.05% hasta 0.30% y jugo gástrico artificial hasta en un periodo de 24 horas.
- Se comprobó que las levaduras se adhieren a células epiteliales del tracto gastrointestinal de ratones, colonizando intestino grueso e intestino delgado hasta por un periodo de 72 horas.
- Se identificó el microorganismo aislado mediante una serie de pruebas bioquímicas encontrando que la levadura es capaz de utilizar gran cantidad de sustratos para crecer, de acuerdo a las pruebas de asimilación del sistema de identificación de levaduras Api 20 AUX la especie de levaduras aisladas en este estudio es *Kluyveromyces marxianus*, un microorganismo fermentativo.
- De acuerdo con las pruebas realizadas en el presente estudio *Kluyveromyces marxianus* cumple con cuatro de los principales criterios establecidos para ser considerado un microorganismo probiótico.

### 13. Referencias bibliográficas

- Abundis, V. B. 2007. Monografía de Agave Pulquero. Secretaría de Desarrollo Social del Estado de Puebla.1 (23):17-19.
- Anderson, R.K., Calvo, J., Payne, G. C. y Serrano, G. 1946. A Study of the Nutritional Status and Food Habits of Otomi Indians in the Mezquital Valley of Mexico. The American Journal of 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. 3ed. Ed. Ortigoza, F. J. y Ruiloba, L. S. L. Instituto Politécnico Nacional. México pp. 35-47.
- Backstrand J. R., Allen L. H., Black A. K., de Mata M., Pelto G. H. 2002. Diet and iron status of nonpregnant women in rural Central Mexico. The American Journal of Clinical Nutrition.76 (1):156-64.
- Begley, M., Hill, C., Cormac, G.,y Gahan, C. 2006. The interaction between bacteria and bile. Federation of European Microbiological Societies. 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. Federation of European Microbiological Societies. 235: 273-279.
- Boris S, Jiménez-Díaz R, Caso JL, Barbés C. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii*

- subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. Journal of Applied Microbiology. 91: 328-33.
- Boris S, Suárez JE, Barbés C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, avaginal isolate. Journal of Applied Microbiology. 83(4):413-20.
  - Bruman H.J. 2000. Alcohol in Ancient Mexico. The University of Utah Press, Salt Lake City, Utah, UT.
  - Castro L.A. y De Rovetto, C.2006. Probióticos: Utilidad clínica. Colombia Médica. 37 (4): 308-314.
  - Cervantes-Contreras, M. y Pedroza-Rodríguez, A. 2007. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-Instituto Politécnico Nacional. pp: 134-147.
  - Chellapandian, M., Larios, M., Sanchez, G.C., Lopez, M. 1988. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. Journal of Microbiology and Biotechnology. 21:51-56.
  - Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 71: 1-20.
  - Collado MC, Hernandez M, Sanz Y. 2005. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. Journal of Food Protection. 68(5):1034-40.

- Corcuera, S. 1991. El fraile, el indio y el pulque. México. Fondo de cultura económica.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology; 31(6):438-42.
- Desmazeaud M. 1996. Les bactéries lactiques Dans l' alimentation humaine; utilisation et innocuité. Cahier Agricultures. 5: 331-344
- Domínguez-Bello M.G. y Blaser M.J. 2008. Do you have a probiotic in your future? Microbes and Infection. 10 (9): 1072-1076
- 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. American Journal of Clinical Nutrition. 73: 386-392.
- Flynn S, van Sinderen D, Thornton GM, Holo H, Nes IF, Collins JK. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Microbiology. 148: 973-84.
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 79(3):339-54.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66:365-378.

- García-Mendoza, A. y R. Galván .1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la sociedad Botánica de México. 56:7-4
- Gentry, H.S. 1982. Agaves of continental North America. Universidad de Arizona, USA. pp 669.
- Gibson, G.R. y Fuller, R. 2000. "Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use". Journal of Nutrition. 84: 197-215.
- 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.
- Gonçalves de Lima O.1990. Pulque, balché y pajauarú. Fondo de Cultura Económica, Mexico.
- Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A, Brassart D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. Journal of Applied Environment Microbiology 65: 1071-1077.
- Guarner F. y Schaafsma G.J. 1998.Probiotics. International Journal of Food Microbiology. 39: 237-238

- Harley, JP., Klein, DA. y Prescott, LM. 2003. La diversidad del mundo microbiano. En: Microbiología. 4ta Edición. McGraw-Hill. Interamericana, España. pp: 407-436.
- Herrera T.1953.Trabajos que se han hecho en México sobre bacterias de líquidos fermentados. Memoria del Congreso Científico Mexicano, pp. 36–53. IV Centenario de la Universidad de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.
- Hilton E., Rindos, P. y Isenberg H.D. 1995. *Lactobacillus* GG Vaginal suppositories and vaginitis. Journal of Clinical Microbiology. 33: 1433
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiology. 59: 171-200.
- Jakobsen M, y Narvhus J. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. International Dairy Journal. 6(8–9):755-68.
- Lappe P. y Ulloa M. 1993. Microbiología del pulque. Alimentos fermentados indígenas de México. WachterMC y LappeP, eds. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 75–80.
- Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizón-Gaviño J., Herrera-Suárez T., García-Mendoza G., Gschaedler-Mathis A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. Federation of European Microbiological Societies.8 (7): 1037-1052.
- Lemus-Fuentes, E. 2006. Los Enemas prehispánico como instrumentos para Aplicar probióticos. 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.
- Lilly, D. y Stillwell, R. 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science Direct. 147:3659:747-748.
- Maldonado, C., Bayona, M. y Poutou, R. 2001. Efecto antagónico de *Zymomonas mobilis* spp. Frente a *Salmonella* sp. y *Proteus mirabilis*. Unv Scient .6:17-25.
- Martínez del Río, C y Eguiarte, L.E. 1987. Bird Visitation to *Agave salmiana* comparisons among hummingbirds and perching birds. The Condor 89: 357-363
- Martins F, Ferreria, F., Penna, F., Rosa, C., Drumond , R., Neves, M., Nicol,J. 2005. Estudio del potencial probiótico de *Sacharomyces cerevisiae* a traves de ensayos in vitro. Revista de Biología y Ciencias de la Tierra 5:13.
- Marvan LL, Palacios, G. B., Perez, L. A. B. 2001. Bebidas alcohólicas. Sistema mexicano de equivalentes. p. 71.
- Massieu. G.H., J. Guzman, R.O. Cravioto y J. Calvo. 1948. Determination of some essential amino acids in several uncooked Mexican Foodstuffs. Journal Nutrition 38:297.
- Mennickent, S. y Green, K. 2009. Los probióticos y su actividad terapéutica. Ciencia Ahora.24:12:31-38.
- Mishra Ch, Lambert J. 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. Asia Pacific Journal of Clinic Nutrition. 5: 20-24.
- Nagendra P. 2007 .Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal. 17(17): 1262-1277

- Narendranath V, Thomas, K., Ingledew, W .2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Sacharomyces cerevisiae* in minimal medium. Journal of Industrial Microbiology and Tecnology 3:7.
- O'Sullivan, M.G. 1992. Probiotic Bacteria: Myth Or Reality? Trends in Food Science & Technology. 31: 309-314.
- Ouwehand AC. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Salminen S, von Wright A (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker, Nueva York. pp 139-160.
- Peña-Alvarez, A., Díaz L., Medina A., Labastida, C., Capella, S. y Vera, L. 2004. Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1027:131-136.
- Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proceedings of the National Academy of Sciences.101: 2512-2517.
- Prieto, P. J. y Ruiz, M. G. 1998. Características generales de los microorganismos. Nomenclatura y taxonomía. Medicine. 7(73): 3355-3360.
- Ramírez-Higuera, I. 2009.Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel del maguey (*Agave salamiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Tesis de maestría). Mexico, D.F.Universidad Politecnica Nacional. pp. 75

- Roos S, Jonsson H. 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 148: 433-442.
- Roostita R, Fleet GH.1993. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*.1 (1-3):205-19.
- Ruiz Oronoz M. 1953. Estudios en México sobre levaduras. Memoria del Congreso Científico Mexicano. IV Centenario de la Universidad de México. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 127–149
- Saenz, Y., Collado, M. y Dalmau. J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*. 61:9: 476-482.
- Schrezenmeir, J. y Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73:361S-364S.
- Simmering, M. y Blaut, M. 2001. Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels?. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*.55:19:28
- Smet, I. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 79(3): 292-301.
- Steinkraus, K.H. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. 8:311-317.
- Sychrovaé H, Ramirez, J.,Peña, A.1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Sacharomyces cerevisiae* *Microbiology Letters* 171:6.

- Thomas, K.C., Hynes, S.H. y Hingledey, 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 *Sacharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in Octanoic Acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Journal of Applied and Enviromental Microbiology* 64:5.
- Yildirim Z, Johnson MG. 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*. 61: 47-51.
- Young, R.J., y Huffman, S. 2003. Probiotic use in children. *Journal of Pediatric Health Care*. 17(16): 277-283.}