



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Caracterización de levaduras por medio de la secuencia de la
región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s durante la
fermentación del aguamiel para la producción de pulque en el
Estado de Hidalgo.**

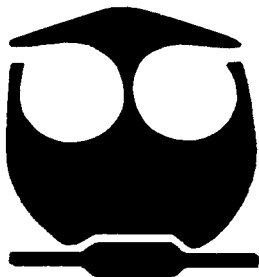
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Química de alimentos

Presenta

Ferrand Alcaraz Claudia Isabel



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Rodolfo Pastelin Palacios

Vocal Agustín Reyó Herrera

Secretario Francisco Ruiz Terán

1er suplente Ruth Edith Martin Fuentes

2do suplente Norma Trejo Medina

Sitio donde se desarrollo el tema

Laboratorio 321 conjunto E, departamento de alimentos y biotecnología,

Facultad de química, UNAM.



Dr. Francisco Ruiz Terán

Asesor del tema

Ferrand Alcaraz Claudia Isabel

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM

Por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran casa de estudios donde pase los mejores años de mi vida. Así como por proveerme de los conocimientos y valores necesarios para ser de mi una profesionista.

A mis profesores

Por la paciencia y dedicación que tuvieron para lograr mi objetivo.

A mi asesor de tesis el Dr. Francisco Ruiz Terán

Por la confianza y el apoyo que deposito en mi al iniciar este proyecto.

A mi madre

Por ser un gran ejemplo y por no dejarme caer nunca a pesar de la adversidad

DEDICATORIAS

A Dios

Por todas las bendiciones que me ha dado para poder cumplir este sueño.

A mi madre

Quien siempre ha estado conmigo para brindarme apoyo, consejos, tiempo y amor. Ahora con éste trabajo de equipo hemos llegado a esta meta que iniciaste hace ya tiempo y que no hubiera podido concluir sin ti.

A mis hermanos

Gerardo y Paris por brindarme siempre su apoyo y siendo los dos un ejemplo a seguir.

A mis amigos

Damian, Marvin, Mayra, Toño, Paty, Oswaldo y Misael por estar conmigo durante todo mi trayecto académico y quienes han plasmado en mi infinitas alegrías y enseñanzas.

A todos mis amigos de generación y de carrera (Araceli, Bety H., Ana Maria, Chirstian, Gilda, Omar, Daniel, Blanca, Alicia, Edna, Bety R., Paola A.) Por todos los momentos que vivimos juntos y por que todos son pieza fundamental para construir este gran sueño.

	Página
INDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
Pulque	3
Proceso de producción de pulque	4
Microorganismos encontrados en el pulque	5
Métodos de identificación tradicionales para levaduras	5
Métodos de identificación moleculares para levaduras	6
OBJETIVOS	
Objetivos generales	11
Objetivos particulares	11
METODOLOGIAS	
Toma de muestras del aguamiel y pulque	11
Aislamiento y purificación de levaduras	12
Conservación de cepas de levaduras	12
Pruebas bioquímicas para la identificación de levaduras	13
Pruebas moleculares para la identificación de levaduras	
Extracción de ADN a partir de células de levaduras	14
Cuantificación de ADN	15
Reacción de amplificación de ADN por PCR de la región D1/D2 del ARN	
ribosomal 26s	16
Secuenciación de la región D1/D2 del ARN ribosomal 26s	16

Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos presentes en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque	16
--	-----------

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Aislamiento y purificación de levaduras	19
--	-----------

Pruebas bioquímicas para la identificación de levaduras	20
--	-----------

Pruebas moleculares para la identificación de levaduras	
--	--

Extracción y cuantificación de ADN a partir de células de levaduras	22
--	-----------

Secuenciación de la región D1/D2 del ARN ribosomal 26s	23
---	-----------

Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos mediante HPLC	25
--	-----------

CONCLUSIONES	29
---------------------	-----------

APENDICES	30
------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	39
---------------------	-----------

Resumen

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana la cual, es producida a partir del aguamiel que es extraído de diferentes variedades de maguey pulquero de la especie *Agave atrovirens* (Sánchez-Marroquín 1967). Los estudios microbiológicos del aguamiel han sido enfocados al aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en la fermentación usando métodos de caracterización, basados en pruebas bioquímicas y morfológicas.

Se han desarrollado técnicas moleculares para la identificación de levaduras apoyadas en las similitudes o diferencias de secuencias en el ADN, ARN o proteínas. Los métodos que más se han utilizado para la identificación de las levaduras son: hibridación ADN-ADN, amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de las regiones ITS y su posterior análisis utilizando enzimas de restricción, RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), secuenciación del fragmento D1/D2 del gen ribosomal 26s.

En este trabajo se realizó la caracterización de levaduras, aisladas de la fermentación del pulque producido en Sta Mónica en el estado de Hidalgo, por medio de pruebas metabólicas y la secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s.

Introducción

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana la cual, es producida a partir del aguamiel que es extraído de diferentes variedades de maguey pulquero (Sánchez-Marroquín 1967).

Esta bebida se elabora y se produce principalmente, en los estados del centro de la republica mexicana. Para su producción se colecta el aguamiel en barriles o bolsas hechas

de cuero, el cual es transferido a un barril más grande, que contiene una cantidad de pulque (10 %) que sirve como cultivo iniciador para llevar a cabo la fermentación.

Los estudios microbiológicos del pulque se han basado en el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en el aguamiel y en el pulque fermentado usando métodos tradicionales, identificación por morfología y métodos bioquímicos.

Los microorganismos más frecuentemente identificados en el pulque son levaduras y diferentes especies de bacterias incluyendo bacterias lácticas homo y hetero fermentativas (Villalpando, 2004).

En años recientes, se han desarrollado métodos más rápidos y precisos para la identificación de levaduras. Algunos de estos métodos se basan en el análisis del perfil de proteínas y en el análisis por cromatografía de gases de los perfiles de los ácidos grasos de las levaduras (Esteve-Zarzoso, 1999). Adicionalmente, se han desarrollado nuevas técnicas para la identificación de levaduras basados en las similitudes o diferencias del ADN, ARN o proteínas, entre estos métodos se encuentran: hibridación ADN-ADN, análisis de microsatélites, amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de las regiones ITS y su posterior análisis utilizando enzimas de restricción, RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), secuenciación del fragmento D1/D2 de gen ribosomal 26s, etc.

En el presente estudio se caracterizaron a las levaduras presentes durante la fermentación del aguamiel para la producción de pulque por medio de la secuenciación del fragmento D1/D2 de gen ribosomal 26s. Estudios anteriores de los microorganismos de esta bebida sólo se han identificado a las levaduras del aguamiel por los métodos tradicionales, siendo estos muy laboriosos y en ocasiones poco confiables y pudiendo tener gran variabilidad en los resultados (Escalante, et. al. 2004).

Antecedentes:

Pulque.

El pulque es una bebida alcohólica, blanca y viscosa, la cual se obtiene mediante la fermentación del aguamiel. El aguamiel es la savia del maguey, es un líquido azucarado, translucido, con color ambarino de olor y sabor característicos; este líquido se obtiene al eliminar el qurote o brote floral y hacer una cavidad en donde se acumula. (Goncalves, et. al. 1972)

El aguamiel contiene gran cantidad de microorganismos de forma natural, principalmente bacterias y levaduras.

El pulque es consumido principalmente en el estado de México, Tlaxcala, Morelos, Guerrero, Michoacán, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca y Puebla.

Aunque el consumo de pulque se ha reducido considerablemente en las últimas décadas, el proceso de elaboración del pulque, que en forma tradicional ha persistido hasta la época actual, es el que se describe a continuación: se raspan los magueyes para extraer por medio del acocote el aguamiel, esta se recolecta dos veces en el día, mañana y tarde. Dependiendo del tiempo en el que se hayan castrado los magueyes se clasifican en tres categorías: magueyes recién castrados, maduros y añejos. El tiempo de castración es determinante para la calidad del aguamiel teniendo así el de mejor calidad el que proviene de los magueyes maduros; ya que el aguamiel en los magueyes recién castrados es bajo en azúcares al igual que en los magueyes añejos. Con la clasificación anterior se obtienen por lo tanto tres tipos de pulque, los cuales según su calidad se usan de diferentes formas: el pulque proveniente del aguamiel del maguey maduro se conoce como punta y sirve como inóculo para comenzar las fermentaciones del resto del aguamiel.

A continuación una parte de la punta es transferida al aguamiel proveniente de los magueyes nuevos y añejos, a este pulque se le conoce como contrapunta, cuando la contrapunta esta totalmente fermentada se pasa a otro barril con más aguamiel llamado corrida. Al final, parte de la corrida se pasa al tinacal donde se le conoce como barrida, este último es el pulque que sale a la venta. Las cantidades que se tienen van en incremento empezando por la punta, es decir hay una pequeña cantidad de punta, esta se conserva en las mejores condiciones posibles y llega a durar hasta un año; le sigue la contrapunta y al final esta la barrida en un tinacal de aproximadamente 750 litros y éste tiene un movimiento constante. El aguamiel se fermenta y se produce pulque en aproximadamente 24 horas.

Producción de pulque

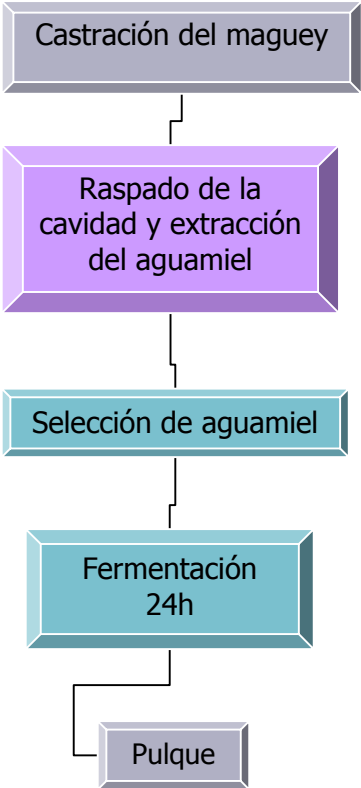


Diagrama 1. Proceso de la forma tradicional para la elaboración de pulque

Microorganismos aislados del pulque.

Los microorganismos que han sido identificados en el pulque han sido principalmente levaduras y bacterias: las bacterias lácticas homo y hetero-fermentativas, como las bacterias productoras de alcohol *Zymomonas mobilis* y las bacterias productoras de dextranos, *Leuconostoc mesenteroides*. Estos microorganismos han sido identificados por métodos tradicionales, como por características fenotípicas, es decir, el conjunto de propiedades celulares observables como son las fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares.

De 1936 a 1942 Ruiz Oronoz (Villalpando, 2004) estudió las levaduras del pulque y describió a las especies *S. carbajali*, *Pichia barragani*, *Torulopsis hydromelitis*, *T. aguamellis* y *Rhodotorula incarnata*.

En 1946 Pedro Brechtel (Villalpando, 2004) presentó un estudio bacteriológico del aguamiel y del pulque, describió las especies *Micrococcus candidus*, *M. ruizii*, *Sarcina flava*.

En 1970, Barragán (Villalpando, 2004) describió unas levaduras aisladas del pulque, las cuales identificó como pertenecientes del género *Cryptococcus*.

En 1986, Gaviño (Villalpando, 2004) logró aislar una especie de *Rhodotorula*, y varias especies de bacterias, cocos, diplococos y bacilos.

En 1989 Lappe (Villalpando, 2004) y colaboradores estudiaron aislamientos de levaduras del pulque, determinando como constantes a *Saccharomyces cereviciae*, *Pichia membranaeficiens* y *Kluyveromyces marxianus*. (Villalpando, 2004)

Métodos de identificación tradicionales para levaduras.

Se conoce como métodos tradicionales o convencionales para la identificación de levaduras a los métodos que se basan en las características fenotípicas de estos

microorganismos como son: Características morfológicas y de crecimiento, bioquímicas, serológicas, y fisiológicas o funcionales.

Las características de crecimiento de los microorganismos se dan por las diferencias en requerimientos nutricionales, estos pueden clasificarse de acuerdo a las diferencias de crecimiento y a las propiedades observadas en las cajas Petri con agar sólido, en medio líquido o por propiedades como el tipo de ácidos grasos. En las cajas Petri pueden ser diferenciadas por las características de las colonias como son elevación, color, textura, tamaño.

Las pruebas bioquímicas son usadas para diferenciar mediante las actividades metabólicas a los microorganismos.

Una de las pruebas para la identificación de levaduras son las pruebas API 20 C AUX; este es un sistema de identificación precisa. La galería API 20C AUX esta constituida por 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación. Las cúpulas se inoculan en medio mínimo semi-agar y las levaduras solo crecen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Las lecturas de estas reacciones se realiza por comparación con los testigos de crecimiento y la identificación se obtiene con la ayuda de un catalogo analítico o con un *software* de identificación.

Métodos moleculares empleados para la identificación de levaduras.

Los métodos moleculares de identificación de levaduras, se basan en el estudio de moléculas de ADN. (Orberán, *et. a*/2004)

El primer paso para obtener esta información es lograr la extracción de las células.

Las cepas se desarrollan en medios de cultivo óptimos para obtener la biomasa y la extracción de ADN se puede realizar mecánica o enzimáticamente, lo que se busca es la ruptura de la célula para permitir que el ADN se libere en una solución acuosa.

El siguiente paso es la purificación y cuantificación del ADN.

El ADN absorbe la luz UV, debido a los anillos de las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula tiene una absorbancia máxima a 260nm; por lo que la absorbancia es una forma común de medición de la concentración de ADN (Sambrook et. al. 1992).

Para determinar la pureza del ADN, se utiliza la relación de ADN/proteínas para lo cual las proteínas residuales en el extracto se determinan midiendo la absorbancia a 280nm.

Otro método se basa en la fluorescencia del bromuro de etidio cuando éste se intercala dentro de las moléculas de ADN. La fluorescencia es emitida por el bromuro de etidio logrando verse con la excitación causada por la luz UV; el ADN puede verse bajo la iluminación UV en un gel de agarosa, con este método se podría determinar concentraciones de hasta 2.5ng (Sambrook et. al. 1992) .

Polimorfismo longitudinal de los cromosomas. Electroforesis de cariotipo. Cariotipificación.

La molécula de ADN previamente digerida con endonucleasas de restricción de corte poco frecuente, es sometida a un campo eléctrico de velocidad constante en un gel de electroforesis, de manera que debido a la carga negativa que posee, el ADN, migre a hacia el polo positivo; la migración se realiza a una velocidad que depende del tamaño y la carga de las moléculas, de tal manera que en el gel de electroforesis se visualiza un patrón de bandas. (Gonzalo et. al. 2001)

Polimorfismo de ADN mitocondrial.

Las levaduras son organismos con un amplio grado de variabilidad en el tamaño del ADN mitocondrial, el cual puede variar entre los 6 y los 25µm; en la mayoría de las especies es de forma circular (Belloch et. al. 1998). La gran variabilidad del ADN mitocondrial lo ha hecho que sea atractivo para su uso en la identificación de especies de levaduras por

electroforesis, pero posee una limitante, y es que requiere el aislamiento de las mitocondrias y del ADN mitocondrial, lo cual hace impráctico este método para su uso en la identificación de gran cantidad de muestras (Orberán et. al, 2004).

Análisis de microsatélites.

Esta técnica se basa en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y consiste en la amplificación de fragmentos con cebadores de oligonucleotidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el ADN, denominadas microsatélites. Esta técnica difiere de otras, en que la temperatura de hibridación del cebador es mayor a 55°C, por lo que estos cebadores hibridan en zonas específicas del genoma con una buena reproducibilidad. (Loureiro et. al. 1999)

Polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado (RAPD)

Se basa en la amplificación por PCR simultánea del ADN genómico en presencia de un único cebador de pocos oligonucleotidos. Debido a la baja temperatura de hibridación (35-39°C) el cebador se une a sitios inespecíficos, en regiones aleatorias en todo el genoma, dando la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN. Los productos amplificados se ven por electroforesis. (Orberán et al, 2004)

El uso de RAPD permite obtener huellas digitales de los organismos, que no son más que las diferencias de número y tamaño en los fragmentos del ADN amplificado, las cuales son específicas para cada especie. (Loureiro, et. al 2000)

Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del (RFLP)

Consiste en la diferenciación de los organismos, basado en el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma cuando este es cortado con enzimas de restricción. De manera que, en un gel de electroforesis aparece un patrón de bandas polimórficas correspondientes a los fragmentos de diferentes tamaños que se

generan con el corte de cada endonucleasa. Estos fragmentos aparecen debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de corte para cada enzima de restricción. La similitud de patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas; la existencia de patrones únicos da la identificación. (Henrick et. al. 2000)

El mayor uso que se le ha dado a la técnica de RFLP es utilizando la región del rADN 5.8s y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 (Esteve et. al. 1998).

La región 5.8s es codificada, conservada y muestra una baja variabilidad que impide la delimitación entre cepas de una misma especie; sin embargo la zona de los ITS, que es una región no codificadora y variable, permite el reconocimiento a nivel íter específico. (Belloch, et. al 2000)

Existe una variante de esta técnica conocida como PCR-RFLP. Para ella, se amplifican fragmentos específicos de del ADN por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos. Las diferencias en las secuencias nucleótidos de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis. Los productos de la PCR del rADN muestran gran variación longitudinal para las diferentes especies. (Esteve et. al. 1999)

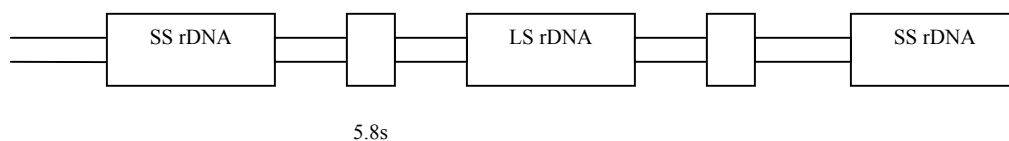


Fig. 1. Esquema de la región ITS-5.8s (Margarida et. al 1996)

Secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s.

La secuenciación consiste en una amplificación por PCR de una región del gen ARN ribosomal 26s.

Las secuencias obtenidas se comparan con las de la base de datos de secuencias genéticas GenBank utilizando el programa BLAST del National Center of Biotechnology Information para obtener el grado de identidad, porcentaje de homología, y la correspondencia entre las bases del ADN, etc. de la secuencia obtenida con respecto al total de secuencias de la base de datos, con el fin de determinar el género y especie a la que pertenece el microorganismo. Las secuencias de más de 400 bp permiten identificar todos los microorganismos al nivel de género y, en la mayoría de los casos, hasta el nivel de especie (Cuauhtémoc Jacques et. al. 2003).

La principal razón del uso del ARN ribosomal es que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas y que estas copias están repetidas (Bruns, et. al. 1991). La secuenciación de fragmentos de ADN amplificados ha reducido el tiempo requerido para el análisis comparativo de secuencias (Bruns, et. al. 1991).

Las técnicas tradicionales de identificación para levaduras basadas en las características fisiológicas y morfológicas, además de ser lentas son incapaces de discernir entre las numerosas cepas que existen entre las especies (Gil *et. al* 2002) ya que éstas dependen de las condiciones de cultivo de las cepas, por lo que han introducido errores en la ubicación taxonómica. Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de las técnicas moleculares (Oberán, 2004).

Objetivos:

Objetivo general:

- Caracterización de las levaduras aisladas durante la fermentación del aguamiel, proveniente de Santa Mónica, Edo. de Hidalgo, por medio de la secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s

Objetivo particular:

- Asilar y purificar a las levaduras presentes en el aguamiel a los diferentes tiempos de fermentación (T = 0, 3, 6, 18h) en el pulque de Santa Mónica, estado de Hidalgo.
- Identificación, utilizando pruebas metabólicas, de las levaduras presentes en el aguamiel recién colectado y durante su fermentación para la producción de pulque del estado de Hidalgo.
- Caracterización de las levaduras por medio de la secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s presentes en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque.

Metodología

Toma de muestras

En frascos estériles, se tomaron muestras de aproximadamente 25ml directamente del aguamiel recién extraído del maguey, al tiempo después de cuando el aguamiel es mezclado con el pulque y del pulque durante los tiempos de fermentación 0, 3, 6, y 18 horas en frascos viales estériles.

Las muestras se conservaron en congelación.

Para llevar a cabo la cuenta en placa de los microorganismos se realizaron diluciones decimales en agua peptonada (Bioxon) estéril a 0.1 %. La inoculación de las muestras se realizó utilizando dispersión en placa y se utilizaron diferentes medios selectivos para la diferenciación y aislamiento de las levaduras, YM/ penicilina (2% glucosa (Sigma), 0.5% de extracto de malta (Bioxon), 0.5% extracto de levadura (Bioxon), 0.3% de peptona (Bioxon), 0.5% de penicilina (Lakeside)), MRS (medio MRS (Fluka biochemika) 5.2%, 2% de agar (Fluka biochemika)), WL (0.4% de extracto de levadura (Bioxon), 0.5% triptona (Bioxon), 5% sacarosa (Sigma), 0.055% fosfato dihidrogenado de potasio (Sigma), 0.0425% de cloruro de potasio (Sigma), 0.0125 de cloruro de calcio (Sigma), 0.0125% de sulfato de magnesio (Sigma), 0.00025% de cloruro férrico (Sigma), 0.00025% de sulfato de manganeso (Sigma), 0.0022% de verde de bromocresol, 1.5% de agar (Fluka biochemika) y medio con lisina (6.6% de medio lisina (Fluka biochemika), 1ml de ácido láctico (Sigma) al 10%, pH 8). Se inocularon, por triplicado, bajo condiciones de esterilidad 0.1ml de la muestra en diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , y posteriormente las cajas se incubaron en una estufa (Felisa) a 30°C durante 48h.

Asilamiento y purificación de cepas de levaduras

Se aislaron las colonias de levaduras encontradas en el aguamiel y el pulque en medio YM, tomando en cuenta sus características morfológicas y de crecimiento en los medios selectivos. Se tomaron cinco colonias de cada una de las morfologías diferentes encontradas, tomando como criterio sus características fenotípicas, y se purificaron en medio sólido YM.

Conservación de Cepas de levaduras

Las cepas se conservaron a una temperatura de -4°C en medio YM y a -20°C en medio YM con glicerol estéril al 15% por quintuplicado.

Caracterización de las cepas asiladas.

Pruebas bioquímicas.

Las pruebas realizadas fueron de crecimiento y fermentación con diferentes fuentes de carbono: glucosa, sacarosa, maltosa, inulina, almidón y xilosa. Se prepararon las fuentes de carbono en tubos de ensayos en una concentración 0.5M cada una.

Se inoculó una asada de las cepas previamente aisladas en medio YM líquido y se dejó crecer durante 48h a 30°C , en tubos de ensayo con campanas de Durham para ver la producción de gas, las pruebas se realizan a 5 cepas seleccionadas de la misma morfología.

Después del transcurso de las 48h se observó si las cepas crecieron en la fuente de carbono disponible en el medio y si hubo una fermentación con dicha fuente de carbono, la fermentación se observó por la producción de gas.

Pruebas API 20 C AUX

Se tomó una asada de cada una de las diferentes cepas aisladas se incubaron a 29°C en medio YM, las colonias de levaduras jóvenes (18-24h) se lavaron con agua destilada estéril centrifugando durante 5min a velocidad de 13000 rpm en una micro centrífuga

(Hemle Z106M), se realizó una suspensión de las levaduras en una solución de 0.85% de cloruro de sodio con una turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland.

Se colocaron 5ml de agua destilada estéril al fondo de la cámara API 20 C AUX.

Se transfirieron 100 μ L de esta suspensión a una ampolleta del medio líquido API C. Se llenaron las cúpulas y se incubó a 29°C durante 48-72 horas.

La turbidez en los medios se registró después de 48 horas y de 72 horas de incubación, el crecimiento de las levaduras se observó comparativamente con la cúpula de control negativo.

La identificación se obtuvo a partir del perfil numérico y con la ayuda del catálogo analítico por medio del *software* de identificación a partir de la base de datos (V 3.0).

Extracción de ADN de las cepas de levaduras

Las células se cultivaron en medio líquido YM durante 48 horas con una agitación de 250 rpm en una incubadora Lab-line con agitación a una temperatura de 37°C.

Las células se lavaron con agua estéril centrifugando (Hemle Z106M) a 13000 rpm durante 10min, el sobrenadante se desechó y se adicionó 20ml de agua desionizada estéril al paquete celular volviendo a centrifugar a 13000 rpm, el lavado de las células se repitió y posteriormente se resuspendieron en 2ml de agua desionizada estéril. La suspensión se colocó en un tubo Ependorff, por duplicado.

Las células lavadas se centrifugaron a velocidad máxima 15000 rpm durante 10min en una micro centrífuga (Hemle Z106M), el sobrenadante se desechó y se adicionó 500 μ L de buffer de extracción más aproximadamente 200 μ L en volumen de perlas de vidrio. La suspensión se agitó en el vortex durante 3min y se colocaron en la incubadora (Stable Temp. Oakion) durante 1 hora a 65°C para romper la pared celular. Después de la incubación se agitó en el vortex durante 3min, se centrifugó a 13000 rpm durante 10min

en la micro centrífuga (Hemle Z106M) y se transfirió el sobrenadante a un tubo Ependorff limpio.

A éste tubo se le adicionó 700 μ L de solución fenol-cloroformo-isoamilico mezclando en el vortex, se centrifugo a 13000 rpm durante 10min en una micro centrífuga (Hemle Z106M); el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se repitió la adición de fenol-cloroformo-isoamilico para asegurar la precipitación total de las proteínas; se centrifugó a 13000 rpm durante 10min. en una micro centrífuga (Hemle Z106M). Se removió 550-600 μ L del sobrenadante a un tubo Ependorff limpio. Al sobrenadante recolectado se le agregó 500 μ L de cloroformo para limpiar el ADN, el tubo se agitó en el vortex y se centrifugó a 13000 rpm durante 5min en una micro centrífuga (Hemle Z106M). Se removieron 400 μ L de la fase acuosa a un tubo Ependorff limpio, al cual se le adicionó 320 μ L de isopropanol, se dejó reposar 5min a temperatura ambiente y se mezcló brevemente en el vortex.

El paquete celular se centrifugó durante 10min a 13000 rpm en una micro centrífuga (Hemle Z106M) y se decantó el sobrenadante.

El paquete celular de ADN se lavó con 100 μ L de etanol al 70% adicionándolo por las paredes, se centrifugó durante 3min a 13000 rpm en una micro centrífuga (Hemle Z106M), el etanol se desechó, y se dejó evaporar el exceso del mismo. Se agregó agua desionizada estéril para despegar el paquete celular del fondo calentando en un baño Maria (Stable Temp. Oakion) a 53°C durante 15min.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 400mA, 90v durante 40min para corroborar la presencia del ADN.

El ADN se resuspendió en agua desionizada estéril y se guardó en refrigeración.

Cuantificación del ADN.

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 y 260nm, considerando que una unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50ng/ml de ADN (Sambrook et. al. 1992).

La pureza se obtuvo de la relación de las absorbancias 260nm/280nm sabiendo que, para considerar que el ADN tiene una pureza aceptable esta relación debe ser de 1.8-2 (Sambrook et. al. 1992).

Reacción PCR del ADN extraído

La reacción de PCR se realizó con el ADN extraído. Se colocó una concentración de 50ng/ μ L de ADN, en una mezcla de reacción para PCR la cual contenía 10 μ M del primer NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'), 10 μ M del primer NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 10 μ M deoxynucleotidos, 50mM de MgCl₂, 2.5u/ml de taq ADN polimerasa y 10x de buffer (Kurtzman, 1997). Las condiciones de PCR fueron las siguientes, desnaturalización a 95°C durante 1minuto, 36 ciclos de desnaturalizando a 94°C durante 1minuto, alineamiento a 52°C durante 0.45minuto, extensión a 72°C durante dos minutos y una extensión final a 72°C durante 7minutos.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 400mA, 90v durante 40min para ver si el ADN ha sido amplificado.

Secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s.

El producto de PCR obtenido se secuenció en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas depositadas en la base de datos de secuencias genéticas GenBank utilizando el programa BLAST del National Center of Biotechnology Information.

Cuantificación de azúcares, etanol y ácidos orgánicos presentes en el aguamiel por HPLC

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (Waters 1525 binary HPLC) con detectores Perkin LC 101 y Perkin LC-30 RI detector y columna Shodex RSpak KC-811 para la cuantificación de azúcares como sacarosa y fructosa, etanol y ácidos orgánicos como ácido láctico y ácido acético.

Se realizó las curvas patrón de los compuestos, sacarosa, fructosa, etanol, ácido láctico y ácido acético y posteriormente estos compuestos se cuantificaron en la muestra de aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque utilizando las siguientes condiciones en el cromatógrafo de líquidos:

Presión: 2000 Pa

Flujo: 1ml/min.

Fase móvil ácido fosfórico al 0.1N

Metodología:

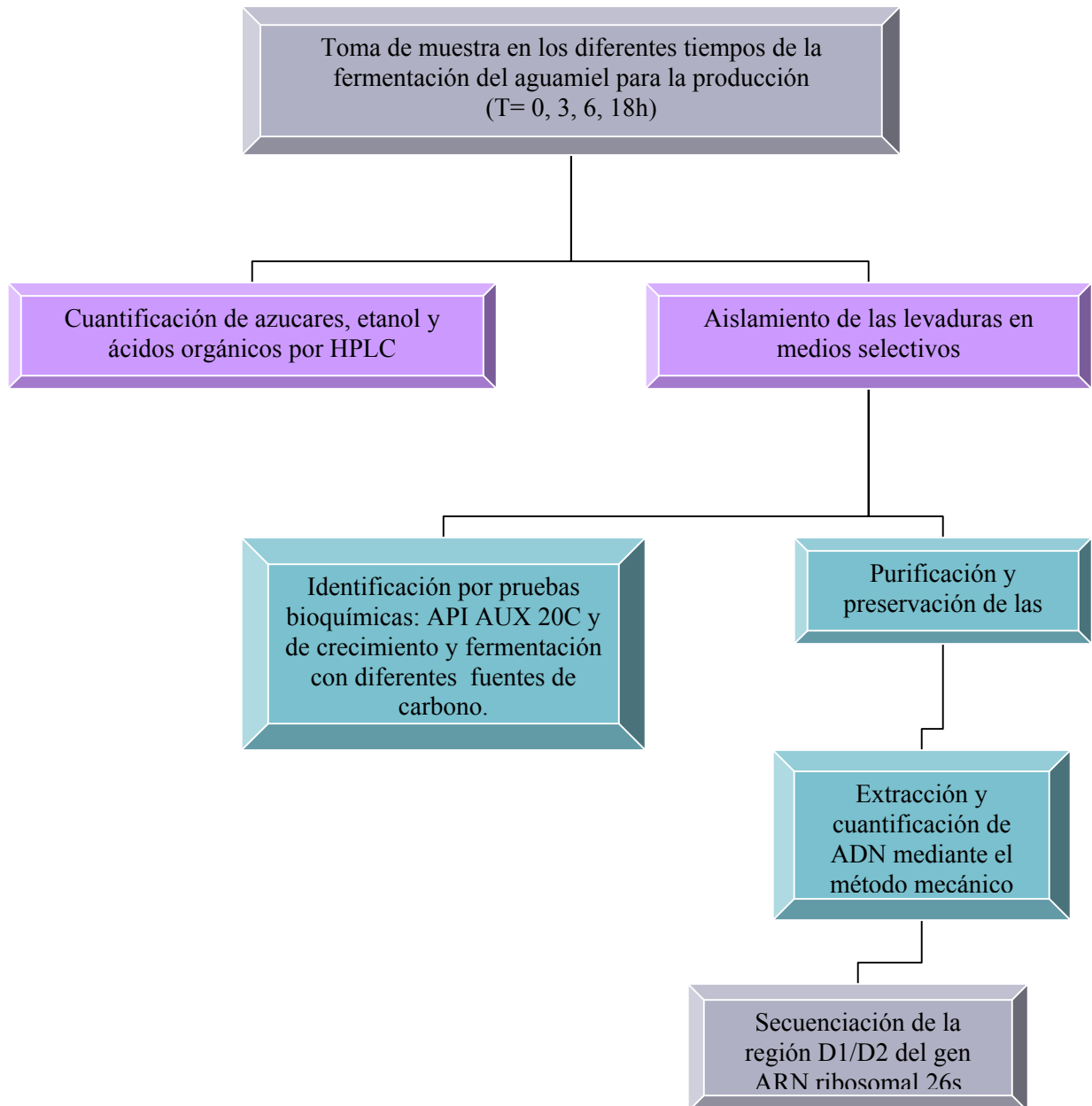
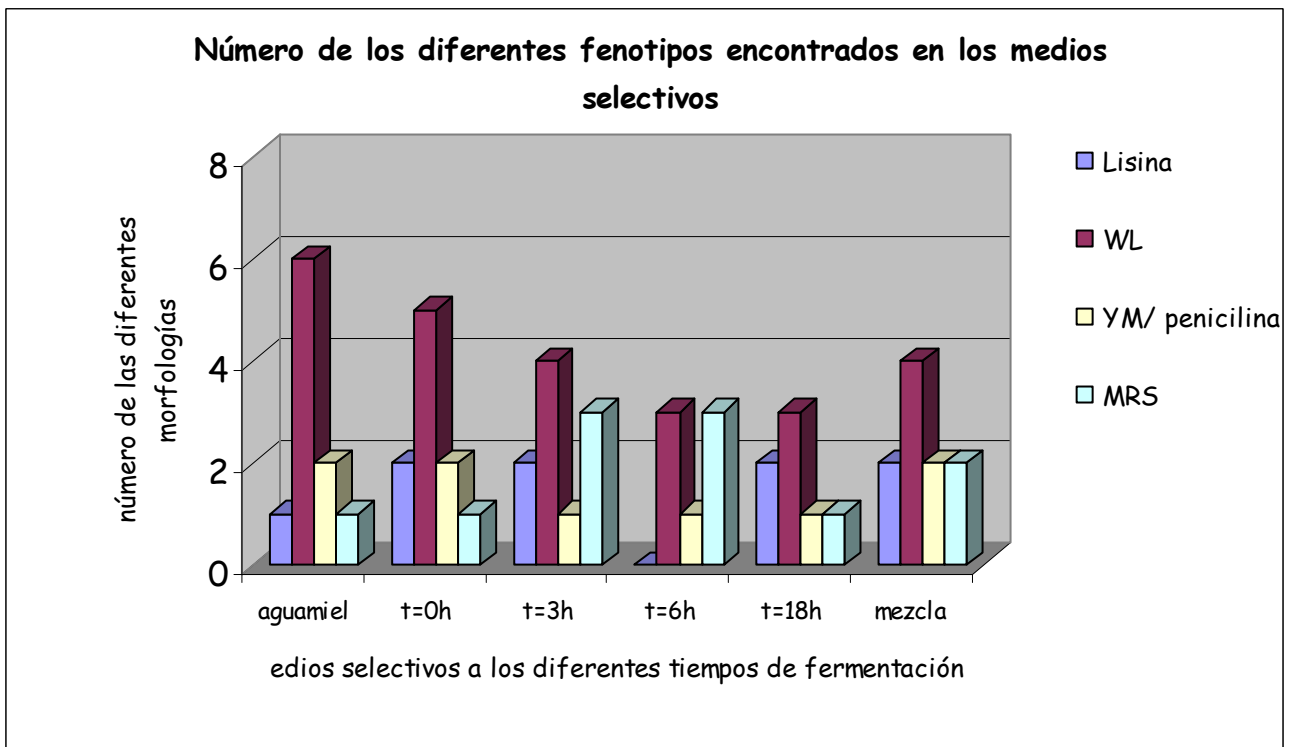


Figura 1 Metodología para la identificación de levaduras aisladas del aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque en el estado de Hidalgo

Resultados y discusión de resultados:

Se observaron seis colonias diferentes por color, elevación de la colonia, formación de halo, forma y tamaño en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque.

Tabla 1. Número de morfologías distintas de las levaduras aisladas en los diferentes medios selectivos en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque en Sta. Mónica, Edo. de Hidalgo



Pruebas metabólicas

En las pruebas metabólicas se identificaron a las cepas que se diferenciaron morfológicamente, observando que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* se encuentran en el aguamiel y durante la fermentación para la producción de pulque asimismo, se observó la presencia de dos especies de *Candida*: *C. apicola* y *C. parapsilosis*. También se encontraron las cepas *Geotrichum fermentans* y *Rhodotorula sp.* Aunque estas especies no se encuentran en todo el proceso para la producción de pulque estas ya habían sido identificadas por Oronoz en 1953 (Villalpando).

Tabla 2. Levaduras caracterizadas por pruebas metabólicas

* Barnett. et. al. 2000

Microorganismos	Aguamiel	Mezcla	t = 0h	t = 3h	t = 6h	t = 18h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Candida apicola</i>	X	X	X			
<i>Candida parapsilosis</i>	X			X		
<i>Geotrichum fermentans</i>		X	X			
<i>Rhodotorula sp</i>				X		

Pruebas API C AUX 20

Mediante las pruebas API C AUX 20 se complementaron las pruebas bioquímicas para las cepas encontradas por las pruebas metabólicas obteniendo el porcentaje de identificación para cada una de las cepas teniendo así una mayor certeza de la identificación. Se observó que únicamente había una especie de *Candida*: *C. parapsilosis*, y se logró obtener la especie de *Rhodotorula*: *R. mucilaginosa*

Tabla 3. Microorganismos y porcentajes de similitud obtenidos mediante el perfil numérico y con la ayuda del catálogo analítico del software de identificación a partir de la base de datos (V 3.0) de las pruebas API C AUX 20.

Microorganismos	% Similitud
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.8
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	97.8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	84.9
<i>Candida parapsilosis</i>	98.7
<i>Candida parapsilosis</i>	98.7
<i>Pichia sp.</i>	79.2

Extracción de ADN

La pureza del ADN debe de estar entre 1.8-2 para descartar que tenga proteínas, que alteren los resultados de la secuenciación y la concentración nos indica que tan buena fue la extracción además de que para poder secuenciar debe de tener mínimo 50ng/ml. Por lo que aquí observamos que la extracción para todas las cepas fue buena y que se encuentran dentro las especificaciones requeridas para su tratamiento posterior.

Tabla 4. Cuantificación y pureza del ADN, de 5 cepas caracterizadas fenotípicamente

Microorganismos	ng/μL de ADN	Pureza de ADN
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1440	2.11
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1320	1.9
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3180	2.2
<i>Candida parapsilosis</i>	5940	2.1
<i>Pichia sp.</i>	1350	1.9

Secuencia de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s

Mediante la secuenciación de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s podemos identificar de una manera rápida y precisa a las cepas encontradas en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque obteniendo también su porcentaje de identificación para cada una de las cepas. En esta tabla se corrobora que como lo observado con las pruebas anteriores tanto *Saccharomyces cerevisiae* como *Kluyveromyces marxianus* están presentes en todo el proceso para la producción de pulque, al igual que la presencia de *Candida parapsilosis*, se logra identificar con un mayor porcentaje de identificación que con las pruebas API a las cepas *Candida glabrata* y *Zygosaccharomyces bailii*.

Tabla 5. Microorganismos identificados mediante la secuenciación de la región D1/D2 del gen ARN ribosomal 26s.

Microorganismos	% Similitud
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	98
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	98
<i>Candida parapsilosis</i>	98
<i>Candida glabrata</i>	97

En la tabla 6 se hace una comparación de los resultados obtenidos por las pruebas morfológicas/ bioquímicas con los porcentajes de identificación de las pruebas API AUX C 20 y las pruebas moleculares observando que en los casos donde el porcentaje de identificación en las pruebas API no es muy alta, en las pruebas moleculares obtenemos un porcentaje mayor, logrando descartar así una identificación que puede ser errónea como es el caso de la cepa *Rhodotorula sp* y *Geotrichum fermentans* ya que en los dos casos por los métodos moleculares obtuvimos resultados muy distintos, aunque los dos géneros

encontrados por los métodos moleculares (*Zygosaccharomyces bailii* y *Candida glabrata*) no habían sido reportados como presentes en el aguamiel. Las características bioquímicas de ambos muestran que sí son cepas fermentadoras, tolerantes a medios ácidos y al alcohol, además de que se han encontrado en muestras de cervezas y vinos, por lo que es posible que se encuentren también en un medio como el aguamiel y el pulque.

Tabla 6. Comparación de las especies identificadas por métodos no moleculares y el método molecular de las levaduras aisladas del aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque.

Col.	Morfológicas-Bioquímicas			Moléculares	
	Conclusión Morfológica-Bioquímica	Pruebas API AUX C 20	%ID		%ID
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	97.8	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	98
3	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	84.9	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	98
4	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	98.7	<i>Candida parapsilosis</i>	98
5	<i>Candida apicola</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	98.7	<i>Candida parapsilosis</i>	98
6	<i>Geotrichum fermentans</i>	<i>Pichia sp.</i>	79.2	<i>Candida glabrata</i>	97

Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos mediante HPLC.

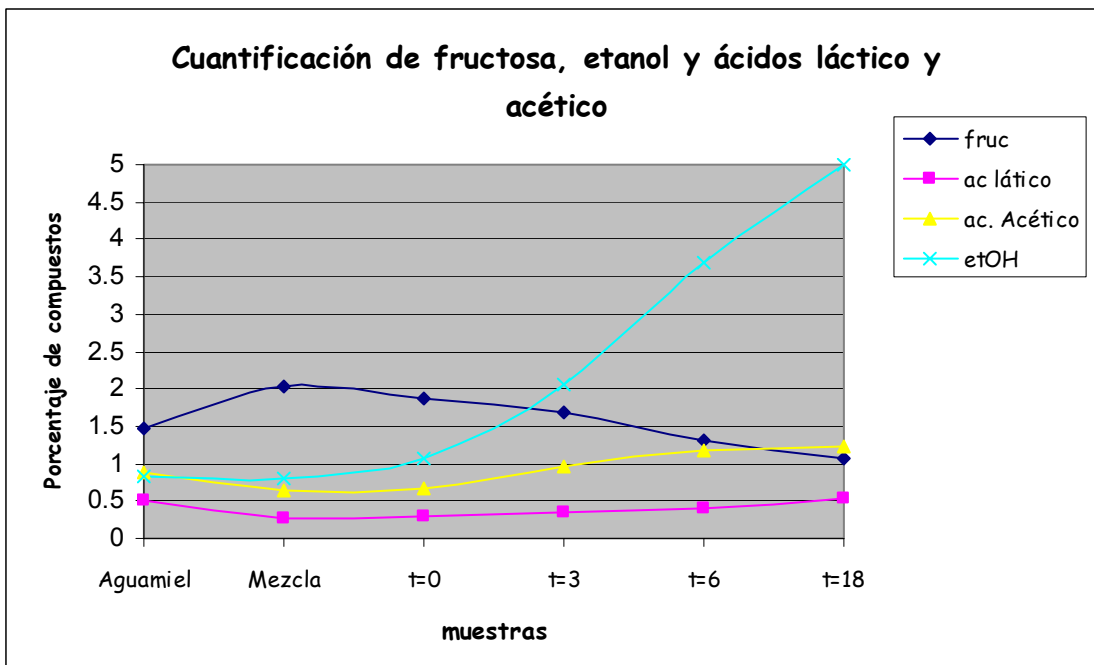
En la tabla 7 se observa la cantidad en porcentaje de los compuestos cuantificados mediante el HPLC presentes en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque, esto se realiza con la finalidad de ver el medio en el que crecen las levaduras encontradas y corroborar así el metabolismo de las mismas.

Tabla 7. Azúcares y ácidos orgánicos cuantificados mediante HPLC en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque.

Compuestos en %	Aguamiel	Mezcla Aguamiel/pulque	t = 0	t = 3	t = 6	t = 18
Fructosa	1.473	2.039	1.864	1.683	1.308	1.060
Ac. Láctico	0.51175	0.28040	0.28759	0.35714	0.39259	0.53690
Ac. Acético	0.88173	0.64037	0.6700	0.9705	1.17430	1.23681
Etanol	0.8178	0.8003	1.0771	2.0667	3.6776	4.999

El gráfico 1 muestra los datos de la tabla 7, aquí podemos ver que conforme la fructosa va disminuyendo la cantidad de alcohol y de ácidos orgánicos va aumentando, esto se debe a que las levaduras son fermentadoras de fructosa por lo que se van consumiendo este azúcar y produciendo alcohol así como también ácidos orgánicos como el ácido láctico y ácido acético.

Grafico 1. Cuantificación de fructosa, etanol y ácidos orgánicos como ácido láctico y ácido acético encontrados en el aguamiel, su mezcla con pulque y durante su fermentación para la producción de pulque.



Del aislamiento y purificación de cepas se obtuvieron siete colonias morfológicamente distintas, presentando diferencias de forma, color, tamaño, textura, concavidad, formación de halo.

Con las pruebas metabólicas se observa que el aguamiel recién extraído del maguey contiene una diversidad microbiana la cual, es constante durante todo el proceso de producción de pulque *S. cerevisiae* y *K. marxianus*. Las especies de levaduras que se encuentran en algunos tiempos de la fermentación del aguamiel y que después ya no

aparecen puede deberse a que siguen presentes en la muestra pero, las UFC/ml son tan bajas que no lograron aislarse.

Las cuantificaciones que se realizaron mediante la cromatografía de líquidos nos dan una idea de las características metabólicas de las levaduras encontradas, ya que estas deben de poder fermentar la fructosa y ser tolerantes al alcohol, ya que conforme pasa la fermentación la cantidad de alcohol va aumentando. También se observó que hay un incremento de ácido acético debido a *Saccharomyces cerevisiae* y de ácido láctico éste último producido principalmente por las bacterias que se encuentran en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque.

Anteriormente se sabía que las levaduras que se encontraban en el pulque eran *Saccharomyces carbajali*, *Pichia barragani*, *Torulopsis hydromelitis*, *T. aguamellis*, y *Rhodototula incarnata* estos microorganismos fueron descritos en 1953 (Villalpando, 2004) por lo que conforme ha ido avanzando el conocimiento de los microorganismos algunos de ellos han resultado sinónimos de otros como por ejemplo *Torulopsis hydromelitis* = *Candida parapsilosis*. Esto llevó a realizar el estudio con pruebas moleculares partiendo desde el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque para la identificación de las levaduras presentes a los diferentes tiempos, tomando en cuenta a estos microorganismos reportados con anterioridad y utilizando también los métodos moleculares se puede ver que las levaduras identificadas son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *Pichia sp.* En general los generos encontrados son los mismos que los reportados con anterioridad aunque las especies en algunos casos cambian, además de que estas especies se encuentran desde el aguamiel y durante toda su fermentación para la producción del pulque.

Las pruebas moleculares requieren de complementarse con las pruebas bioquímicas y morfológicas para tener una mayor precisión en los resultados. Las pruebas moleculares tienen la ventaja de que son más rápidas en comparación con las pruebas tradicionales y tienen un alto porcentaje de identificación por lo que son muy confiables.

Conclusiones:

* Se aislaron y purificaron a seis diferentes cepas encontradas en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque, las cuales fueron seleccionadas por sus características fenotípicas.

* Con las pruebas metabólicas se obtuvo un parámetro adicional en la identificación de las levaduras, aunque no siempre es el método más adecuado para la identificación ya que en algunos casos el porcentaje de similitud es muy bajo, por lo que estas pruebas deben de complementarse con pruebas más específicas como lo son las pruebas moleculares.

* La identificación de cepas de levaduras a partir del análisis del dominio D1/D2 del rRNA 26s que es una región altamente variable, con diferencias entre especies hasta una única base, es lo que nos ha permitido la identificación de las levaduras en el presente trabajo logrando caracterizar a cinco especies de levaduras que se encuentran en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque.

* Levaduras que se encuentran presentes en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque son *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*.

Estando presente durante todo el proceso las cepas *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*.

Apéndices

Apéndice A Buffer de extracción.

Buffer de extracción (buffer de lisis)

Tris base 50mM (OXOID)

NaCl 25Mm (Sigma)

EDTA 50mM (Sigma)

SDS 0.3%

Ajustar pH a 8

Apéndice B Cuantificación de ADN

Cuantificación de ADN

El ADN extraído se cuantificó midiendo la absorbancia a 260nm, tomando en cuenta el factor de dilución utilizando y considerando que 1asb a 260nm equivale a 50ng/ml de ADN (Sambrook et. al. 1992).

Ejemplo:

Saccharomyces cerevisiae

Abs_{260nm} = 0.072

$$0.072 \text{ Abs} * \frac{2000}{5} * \frac{50 \text{ ng/ml}}{1 \text{ Abs}} = 1440 \text{ ng/ml}$$

Query 120 TTCCTTGGAACAGGACGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTTCAGTT
179
Sbjct 126 TTCCTTGGAACAGGACG---TCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTTCAGTT
182

Query 180 CTTTGTAAGGGTGCTCGA 198
Sbjct 183 CTTTGTAAGGGTGCTCGA 201

Score = 48.1 bits (24), Expect = 0.023
Identities = 26/27 (96%), Gaps = 0/27 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 260 AGACCNATAGCGAACAAGTACAGTGAT 286
Sbjct 272 AGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGAT 298

2) Cepa B

TTCGCACCACCGGGATTGCCTTAGTACGGCGAGTAAGCGGCAAAAGCTAAATT
TGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACTCTGGG
GCTGGTCCTTGTGTATGTTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCC
GTATGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTAGAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGATTGTT
TGGAATAGTCGAGT

Candida parapsilosis strain 157V 26S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=713

Score = 319 bits (161), Expect = 2e-84
Identities = 171/173 (98%), Gaps = 1/173 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 50 AATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACTCTGGGGC
109
Sbjct 10 AATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACTCTGGGGC
69

Query 110 TGGTCCTTGTGTATGTTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTATGGCG
169
Sbjct 70 TGGTCCTTGTCTATGTTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTATGGCG
129

Query 170 AGGATCCCAGTTCTTTGTAGAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGATTGTTTGGGAAT 222
Sbjct 130 AGGATCCCAGTTCTTTGTAGAGTGCCTTCGAAGAGTCGAG-TTGTTTGGGAAT 181

Zygosaccharomyces bailii partial 26S rRNA gene, strain ABT1801
Length=557

Score = 325 bits (164), Expect = 4e-86
Identities = 177/180 (98%), Gaps = 1/180 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 43 AAAGCTAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACT
102
      |||||||
Sbjct 11 AAAGCTCAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACT
70

Query 103 CTGGGGCTGGTCCTTGTGTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCG
162
      |||||||
Sbjct 71 CTGGGGCTGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCG
130

Query 163 TATGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTAGAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGATTGTTTGGGAAT
222
      |||||||
Sbjct 131 TATGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTAGAGTGCCTTCGAAGAGTCGAG-TTGTTTGGGAAT
189
```

3) Cepa C

CCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAAT
CTGGCGTCTTCGAGGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGGT
CCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGG
CGAGGATCCCAGTTATTTGTAAAGTGCTTTCGACGAGTCGGTTGCGGGTTAAGA
GGTCAAGGCCATTTCAACCTTGGTACCTCTAATCGTTCGGTTTTCCCTCCGCTTAT
TGATATGGACATGGATACATTAAGGTAAGAGGTTACTAAGAGCCTGAAAAGG
AGCTTAATGTTGAA

Kluyveromyces sp. YS 9F partial 26S ribosomal RNA gene, strain
YS 9F
Length=562

Score = 375 bits (189), Expect = 8e-101
Identities = 195/198 (98%), Gaps = 0/198 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGT
60
      |||||||
Sbjct 25 CCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGT
84

Query 61 CTTCGANNNCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGGTCCTTGTCTATGTT
120
      |||||||
Sbjct 85 CTTCGACGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGGTCCTTGTCTATGTT
144
```

```

Query 121 CCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTATTTG
180
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 145 CCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTATTTG
204

Query 181 TAAAGTGCTTTTCGACGAG 198
      ||||||||||||||||||
Sbjct 205 TAAAGTGCTTTTCGACGAG 222

```

4) Cepa D

```

ACCCGGGATTGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCTCAAATTTGAAATCTGGC
GTCTTCGAGGCCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGGTCCTTG
TCTATGTTCTTGGAAAGTGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGNGTGGCGAG
GATCCCAGTTATTTGTAAAGTGCTTTTCGACGAGTGGAGTTGTTTGGTATTAGGC
GACGTGTTTGCAAATCTTTTCCACCAATTAGTGTTATACACGTCGGTTTGGTGA
AATGCA

```

Saccharomyces cerevisiae partial 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=200

Score = 210 bits (106), Expect = 2e-51
Identities = 160/176 (90%), Gaps = 9/176 (5%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 3 CCGGGATTGCCTTAGTA-CGGCGAGTGAAGCGGC-----TCAAATTTGAAATCTGGCGT
55
      |||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct 179 CCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGT
120

Query 56 CTTCGANCCCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGGT-CCTTGTCTATGT
114
      ||||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct 119 CTTCGACGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCAACTTTGTAGCTGGTGCCTTGTCTATGT
60

Query 115 TCCTTGGAANNGGACGTCATAGAGGGTGAGAAT-CCCGNGTGGCGAGGATCCCAGT 169
      ||||||||| |||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||
Sbjct 59 TCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATNCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGT 4

```

Apéndice E Curvas patrón utilizadas para la cuantificación de azúcares, ácidos orgánicos y alcohol en el HPLC

Curvas patrón para el HPLC

Ejemplo de cálculos:

Curva patrón de sacarosa

Tabla 8. Tiempos de retención y áreas de la curva patrón de sacarosa. Se midieron en el HPLC los tiempos de retención de cada uno de los compuestos así como el área bajo la curva. Esto se realiza en a diferentes concentraciones para poder obtener una curva patrón de cada compuesto.

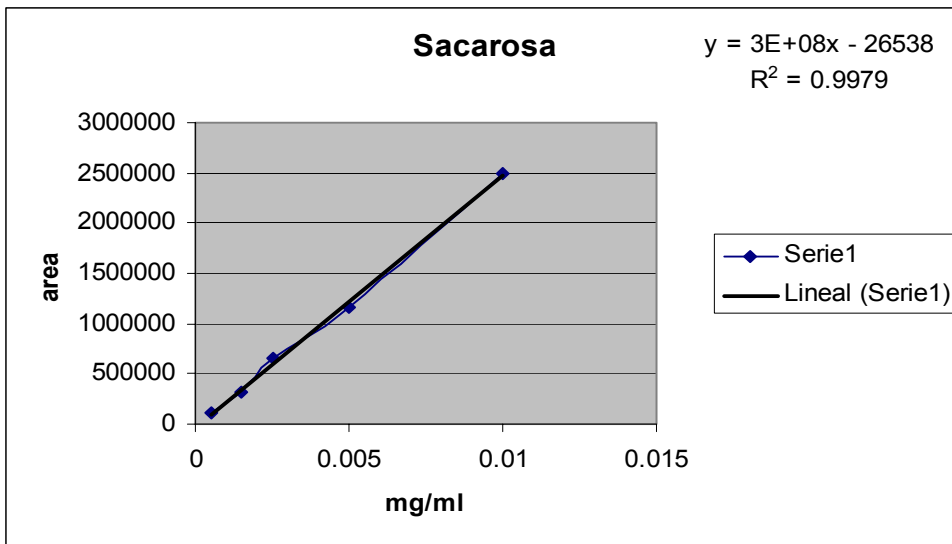
Sac 1%		Sac 0,5%		Sac 0,25%		Sac 0,15%		0.05%	
t retención	Área	t retención	Área	t retención	Área	t retención	Área	t retención	Área
5.89	2545854	5.93	127331	5.924	1141473	5.915	656791	5.922	322141
5.887	2462865	5.926	110871	5.897	1128911	5.913	666703	5.922	318921
5.884	2476449	5.927	101478	5.896	1235709	5.912	639203	5.921	310726
Prom.5.887	2495056	5.92766	113226.6	5.9056	1168697.67	5.9133	654232.333	5.9216	317262.667
DE 0.0021	9605.338	0.00070	6641.854	0.0158	58372.4255	0.0015	13927.404	0.0005	5885.41488

Tabla 9. Concentración de sacarosa y promedios de área para realizar la curva patrón de sacarosa. Se obtienen los promedios de las áreas bajo la curva de cada concentración para graficar las curvas patrón.

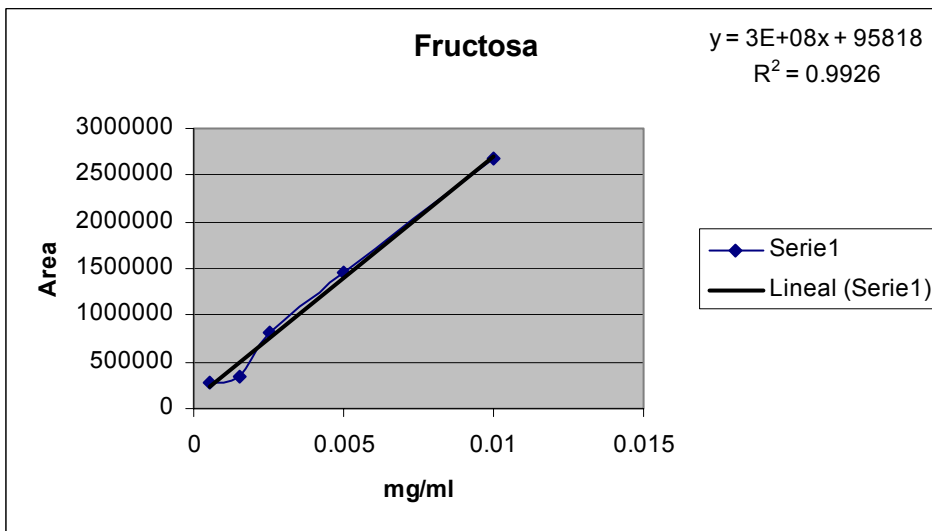
sac (mg/ml)	Áreas Promedio
0.01	2495056
0.005	1168697.67
0.0025	654232.333
0.0015	317232.667
0.0005	113226.667

Curvas patrón para la determinación de la concentración de azúcares y ácidos orgánicos en el aguamiel y durante su fermentación para la producción de pulque

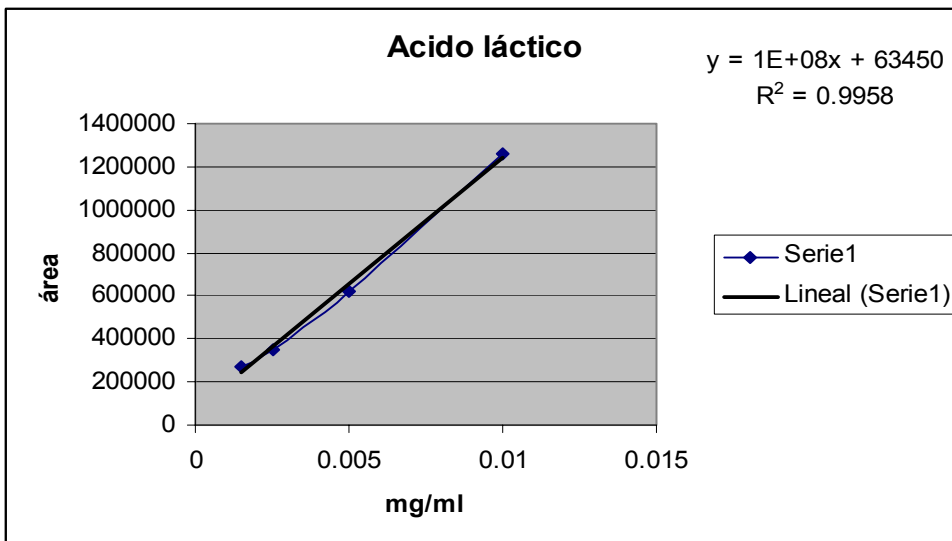
Grafica 1. Curva patrón de sacarosa



Grafica 2. Curva patrón de fructosa



Grafica 3. Curva patrón de ácido láctico



Grafica 4. Curva patrón de ácido acético

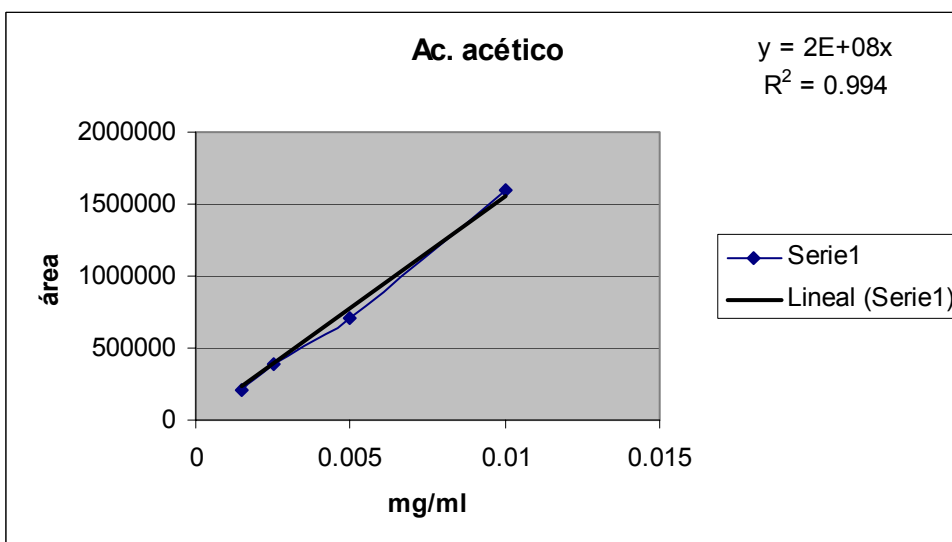
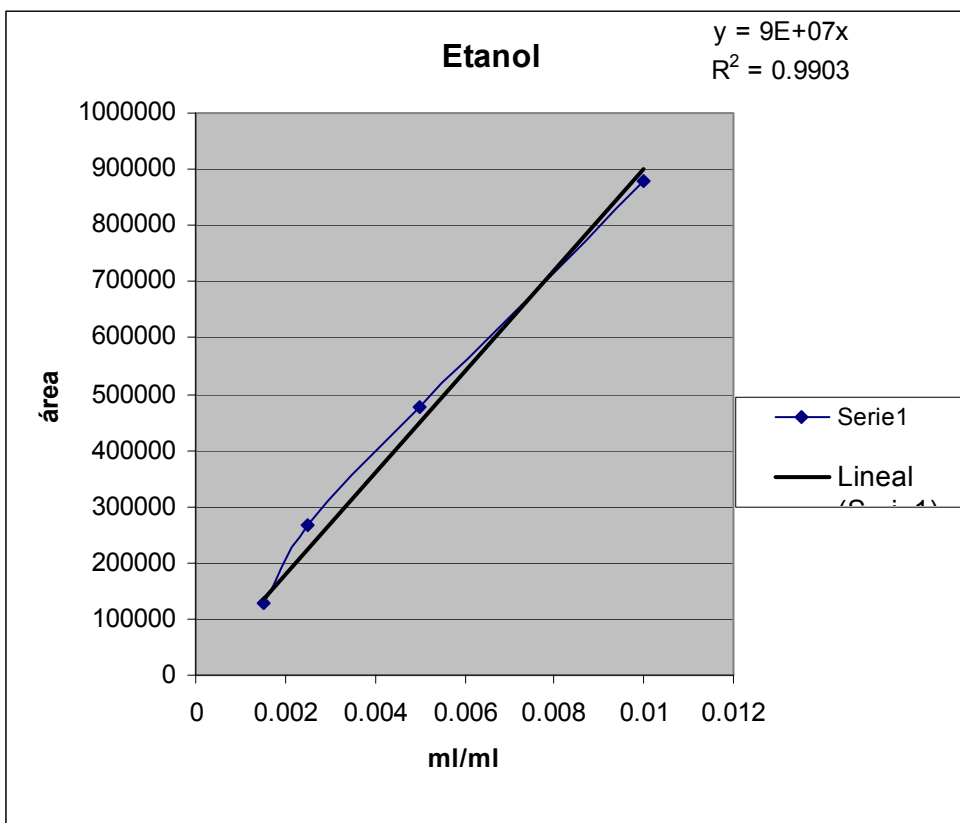


Grafico 5. Curva patrón de etanol



Ejemplo de cálculos para la concentración de fructosa en el aguamiel.

Tabla 10. Datos para el cálculo de la concentración de sacarosa en el aguamiel

# de inyección	Tiempo de retención	área
1	7.029	473264
2	7.097	395732
3	7.036	456734
Promedio	7.054	441910
Desviación estándar	0.0374	

Para la fructosa se obtuvo la siguiente concentración el aguamiel:

$$C = (441910 / 3E+08) * 100 = 1.47303\text{mg}/100\text{ml}$$

Bibliografía:

- 1) Álvarez-Martín, P Ana Belén Flórez, Teresa María López-Díaz, Baltasar (2007)
Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. International Dairy Journal. DOI 10.1016/j.idairyj.2006.11.005

- 1) Barnett J. A., Payne R. W. Yarrow D (2000) Yeast: Characteristics and identification. Third edition. Cambridge university press. London

- 2) Barado Marian, Gorraiz Cristina. (2004) La identificación de microorganismos en productos cárnicos mediante secuenciación. Revista de la asociación de industrias de la carne de España (AICE) #87

- 3) Bruns, T.D., T.J: White y W. Tylor. (1991) Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 22:525-564.

- 4) Covadonga R. Arias, Jacqueline K. Burns, Lorrie M. Friedrich, Renee M. Goodrich and Mickey E. Parish. (2002) Applied and environmental microbiology. April: 1945-61.

- 5) Couto, B.M.M., Van Der Voosen, J.M.B.M., Hofstra, H., and Huis In't Veld, J.H.J. (1994) RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. Int. J. Food Microbiol. 24: 249–260.

- 6) Cuauhtémoc Jacques H, Asnett Irayda López H., Carmina L. Anaya G., Ana Maria Sifuentes R., Patricia Taillandier, Felipe Ramón. (2003) Identificación (ID) de

levaduras aisladas de mostos de mezcal: ID morfológica-bioquímica (M-B) vs. molecular (mol). *Applied and environmental microbiology* 49: 156-62

- 7) Díaz Ruiz Gloria, Wachter Rodarte Carmen. (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana de microbiología*. Vol. 45 No. 1-2:30-40.
- 8) Escalante Adelfo, Rodríguez Maria Elena, Martínez Alfredo, López-Munguía Agustín, Bolívar Francisco, Gosset Guillermo. (2000) Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16s rDNA analysis. *FEMS microbiology letters* 235: 273-279.
- 9) Esteve-Zarzoso, Belloch C. et al. (1999) Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.5s rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spaces. *Internal Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 329-337.
- 10) Flores Berrios, Alba Gonzáles, et al. (2005) The uses for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeast isolated from Mexican agave-ditilles beverages and from grape most. *Letters in applied microbiology*. 41: 147-152.
- 11) Gennadi I. Naumova, Elena S. Naumova, Johan Schnürerb. (2001) Genetic characterization of the nonconventional yeast *Hansenula anomala*. State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, I-Dorozhnyi 1, Moscow 113545,

Russia Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-750-07

- 12) Goncalves de Lima O., Larios C. (1972) Aislamiento y estudio de nuevas cepas de *Pseudomonas lindneri* en aguamieles de la meseta central mexicana. *Ciencia* XI 10:273-277
- 13) H.-M. Daniela, W. Meyera. (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 86: 61– 78.
- 14) Kurtzman C.P., Robnett C.J. (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene, *J. Clin. Microbiol.* 35: 1216–23.
- 15) Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- 16) Las Heras-Vazquez, et al. (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of 5.8s rRNA gene and two internal transcribes spacers. *FEMS Yeast Research* 3:3-9.
- 17) Lopandic K., Zelger S. Bánszky L. K., Eliskases-Lencher F., Prinlliger H. (2005) Identification of yeast associate with milk products using traditional and molecular techniques. *Food microbiology* 65: 165-172

- 18) Margarida Balerias Couto, Bob Eijmsa, Harmen Hofstra, Jos H. J. Huis and Jos M. B. M. Van Der Vossen. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assing genetic diversiti among *Saccharomyces cereviciae* strains. Applied and environmental microbiology. January: 41-46
- 19) M.M. Baleiras CoutoT, R.G. Reizinho, F.L. Duarte. (2005) Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. International Journal of Food Microbiology. 102: 49– 56.
- 20) Oberá Teresa. (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol; 21: 15-19.
- 21) Romano, A., Casaregola, S., Torre, P. and Gaillardin, C. (1996) Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. Syst. Appl. Microbiol. 19: 255-264.
- 22) Sambrook Joseph, Frietsch, and T. Maniatis. (1992) Molecular Cloning Handbook laboratory. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, NY.
- 23) Sánchez-Marroquín. (1967) Estudios sobre la microbiología del pulque XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. Rev. Lat. Microbiol. Parasit. 9: 65.

24) Villalpando Alberto. (2000) Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel bajo procesos controlados. Tesis de licenciatura. UNAM. México, DF. pp.

4,8

