



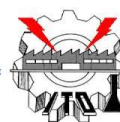
EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



TECNM
TECNOLÓGICO NACIONAL DE
MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y
TECNOLÓGICO

TESIS

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SAPONINAS DE AGAVE
EN LA FERMENTACION DEL MEZCAL”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

PRESENTA

Haydee Leonor Lazcares Contreras

DIRIGIDA POR

Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz

Dra. Claudia López Sánchez

ASESORES

Dr. Eduardo Lorenzo Pérez Campos

Oaxaca de Juárez Oaxaca, noviembre de 2024

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, 28/octubre/2024

No. de oficio: DEPI-811/2024

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis.

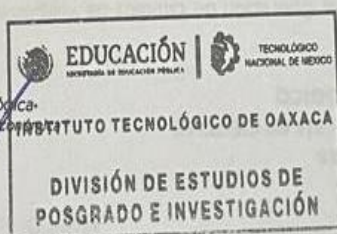
HUITZILÍ DÍAZ JAIMES
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

Por este medio, comunico a usted que de acuerdo con las disposiciones establecidas en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, la estudiante **Haydee Leonor Lazcares Contreras** con número de control M22161618, ha cumplido con todas las recomendaciones que el Comité Revisor hizo respecto a su tesis cuyo título es "Actividad antimicrobiana de las Saponinas de Agave en la fermentación del mezcal", para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico.

Por lo anterior, la División a mi cargo le concede la autorización para que proceda el trámite correspondiente y la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

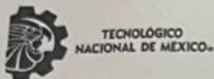
Excelencia en Educación Tecnológica
Tecnología Propia e Independencia



MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo
MASM/SEA*cmh





Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, 28/octubre/2024

Oficio No. DEPI-812/2024

ASUNTO: Autorización de Impresión de tesis.

HAYDEE LEONOR LAZCARES CONTRERAS
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO
PRESENTE

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo con respecto a su Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es "Actividad antimicrobiana de las Saponinas de Agave en la fermentación del mezcal", los abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora le concedemos la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Tecnología Propia e Independencia Económica

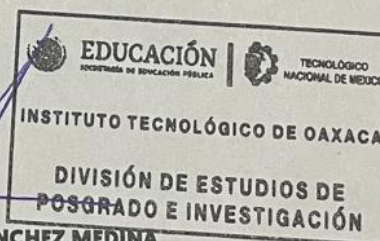
DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ
DIRECTOR DE TESIS

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ
CO-DIRECTORA

DR. EDUARDO LORENZO PÉREZ CAMPOS
ASESOR

Vo.Bo.

DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



ccp. Archivo
MASM/ESA*cmh



Av.Ing. Victor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.
E-mail: depi_oaxaca@tecnm.mx www.oaxaca.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE AGUAS
CIENCIAS Y TECNOLOGÍA



TECNM
MEXICO



CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, el día 22 del mes de noviembre del año 2024, la que suscribe Haydee Leonor Lazcares Contreras estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control M22161618, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz y cede los derechos del trabajo titulado:
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SAPONINAS DE AGAVE EN LA FERMENTACIÓN DEL MEZCAL

al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección o contacto: haydeelazcares@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente.

Haydee Leonor Lazcares Contreras
Nombre y firma

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A lo largo del desarrollo de esta tesis, conté con el apoyo de personas e instituciones cuya colaboración fue invaluable.

En primer lugar, agradezco profundamente a Antonio, por su constante motivación, compañía y confianza en mi capacidad. Tus palabras y acciones siempre me recordaron la importancia de seguir adelante, incluso en los momentos más desafiantes.

A mi querida familia, por su amor incondicional, paciencia y apoyo en cada paso de este proceso. Gracias por ser mi refugio y mi mayor fuente de fortaleza. Cada logro alcanzado es, en gran parte, gracias a ustedes.

Extiendo mi gratitud al CONACHYT, por su respaldo financiero y por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica. Este apoyo hizo posible no solo este trabajo, sino también mi crecimiento profesional y personal.

A mi director el Dr. Felipe de Jesús Palma Cruz, mi codirectora la Dra. Claudia López Sánchez, mis asesores, el Dr. Eduardo Lorenzo Pérez Campos y el Dr. Edgar García Sánchez, por su guía, paciencia y enseñanzas durante todo el desarrollo de este proyecto. Sus conocimientos y su compromiso han sido una inspiración constante para superar los retos y avanzar con seguridad.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las saponinas esteroidales halladas en los agaves son compuestos secundarios que las plantas emplean en su defensa contra ataques de hongos, bacterias, levaduras e insectos. Durante la fermentación de las bebidas de agave, estas saponinas pueden frenar el desarrollo de algunas levaduras, resultando en una disminución en la producción. Aunque no se comprenden completamente estos mecanismos de inhibición, algunos estudios han investigado los esteroides de la membrana celular. Sin embargo, hay escasa información sobre cómo las saponinas afectan a los polisacáridos de la pared celular y a los fosfolípidos de la membrana celular de las levaduras. Por lo tanto, el principal objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las saponinas sobre los microorganismos que participan en la fermentación del mezcal. Se identificó la presencia de saponinas en *Agave convallis*, por medio de cromatografía en capa fina (TLC). Este estudio se desarrolló usando el método de difusión en disco usando agar Mueller- Hilton adicionando diferentes concentraciones (2000, 4000 y 6000 $\mu\text{g/mL}$) de extracto de saponinas de *Agave convallis*, correspondiente a hoja, piña cruda y piña cocida. En donde no se mostró un efecto inhibitorio frente a las especies de levadura. Se observó una mayor resistencia al efecto inhibitorio de las saponinas por parte de *Candida parapsilosis* (ITOYIV039), *Saccharomyces cerevisiae* (ITOYIV040), *Pichia kluyveri* (ITOYIV046), *Candida tropicalis* (OAXY8H), *Meyerozyma guilliermondii* (OAXY9H), ya que probablemente tienen actividad saponinasa, capaz de hidrolizar las saponinas en los extractos.

Abstract

Steroidal saponins found in agaves are secondary compounds that plants use in their defense against fungal, bacterial, yeast and insect attacks. During the fermentation of agave beverages, these saponins can slow down the development of some yeasts, resulting in a decrease in production. Although these inhibition mechanisms are not fully understood, some studies have investigated cell membrane sterols. However, there is little information on how saponins affect cell wall polysaccharides and cell membrane phospholipids in yeasts. Therefore, the main objective of the present work was to evaluate the effect of saponins on microorganisms involved in mezcal fermentation. The presence of saponins in *Agave convallis* was identified by thin layer chromatography (TLC). This study was developed using the disk diffusion method using Mueller-Hilton agar with the addition of different concentrations (2000, 4000 and 6000 $\mu\text{g/mL}$) of *Agave convallis* saponin extract, corresponding to leaf, raw pineapple and cooked pineapple. Where no inhibitory effect was shown against yeast species. A greater resistance to the inhibitory effect of saponins was observed for *Candida parapsilosis* (ITOYIV039), *Saccharomyces cerevisiae* (ITOYIV040), *Pichia kluyveri* (ITOYIV046), *Candida tropicalis* (OAXY8H), *Meyerozyma guilliermondii* (OAXY9H), since they probably have saponinase activity, capable of hydrolyzing the saponins in the extracts.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	13
CAPITULO I MARCO TEÓRICO.....	19
1.1 Agave.....	19
1.1.1 <i>Agave convallis</i>	19
1.2 Agaves con presencia de saponinas.....	19
1.2.1 <i>Agave lechuguilla</i>	19
1.2.2 <i>Agave americana</i>	20
1.2.3 <i>Agave fourcroydes</i>	20
1.2.4 <i>Agave macroacantha</i>	20
1.3 Saponinas.....	21
1.3.1 Tipos de saponinas de <i>Agave</i>	22
1.4 Caracterización de las saponinas.....	23
1.5 Biosíntesis de saponinas esteroideas.....	27
CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 Obtención de muestras.....	31
2.1.1 Medición de parámetros fisicoquímicos.....	31
2.2 Aislamiento.....	31
2.2.1 Aislamiento de levaduras.....	31
2.2.2 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas.....	31
2.2.3 Aislamiento de bacterias ácido-acéticas.....	31
2.3 Purificación.....	32
2.4 Conservación.....	32
2.5 Caracterización fenotípica.....	32
2.5.1 Caracterización macroscópica.....	32
2.5.2 Caracterización microscópica.....	32
2.5.3 Pruebas bioquímicas.....	32
2.5.3.1 Pruebas bioquímicas para levaduras.....	32
2.5.3.2 Pruebas Bioquímicas para bacterias ácido-lácticas.....	33
2.5.3.2.1 Crecimiento en medio Elliker.....	33
2.7.2.2 Crecimiento en medio M17.....	33
2.7.2.3 Crecimiento en medio M5.....	33
2.7.2.4 Reducción de nitratos.....	33
2.7.2.5 Prueba de formación de gas en medio MRS.....	34
2.7.2.6 Prueba Catalasa.....	34

2.7.3 Pruebas bioquímicas para Bacterias Ácido-Acéticas.....	34
2.7.3.1 Prueba Catalasa	34
2.7.3.2 Oxidación de acetato de sodio.....	34
2.7.3.3 Crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético.....	34
2.7.3.4 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol	35
2.7.3.5 Crecimiento con metanol como fuente de carbono.....	35
2.7.3.6 Crecimiento en agar manitol	35
2.7.3.7 Crecimiento en 1% de KNO ₃	35
2.7.3.8 Crecimiento en 3% de NaCl.....	35
2.7.3.9 Crecimiento en 30% de glucosa	35
2.7.3.10 Crecimiento en agar glutamato.....	35
2.7.3.11 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes.....	36
2.7.3.12 Oxidación de etanol a CO ₂	36
2.8 Extracción de ADN.....	36
2.9 Amplificación de secuencias PCR.....	36
2.10 Alineación de secuencias.....	37
2.11 Saponinas de Agave	38
2.11.1 Extracción por maceración	38
2.11.2 Extracción por soxhlet	38
2.12 Cromatografía en capa fina TLC	38
2.13 Actividad antimicrobiana	39
CAPITULO III. RESULTADOS	40
3.1 Caracterización fenotípica.....	40
3.1.1 Levaduras.....	40
3.1.1.1 Caracterización macroscópica.....	40
3.1.1.2 Caracterización microscópica.....	41
3.1.1.3 Pruebas bioquímicas	42
3.1.2 Bacterias ácido lácticas	42
3.1.2.1 Caracterización macroscópica.....	42
3.1.2.2 Caracterización microscópica.....	43
3.1.2.3 Pruebas bioquímicas	45
3.1.3 Bacterias ácido acéticas	46
3.1.3.1 Caracterización macroscópica.....	46
3.1.3.2 Caracterización microscópica.....	47
3.1.3.3 Pruebas bioquímicas	49

3.2	Caracterización genotípica.....	49
3.2.1	Levaduras	49
3.2.2	Bacterias ácido lácticas	50
3.2.3	Bacterias ácido acéticas	51
3.3	Saponinas de Agave convallis	51
3.4	Actividad antimicrobiana	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		54
BIBLIOGRAFÍA		55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Síntesis de saponinas esteroidales en plantas (Martínez 2001).....	21
Figura 2 Estructura de sapogeninas de <i>Agave</i> (a) espirostano y (b) furostano	22
Figura 3 Ejemplo de saponina esteroideal (Cervantes 2016)	26
Figura 4 Ejemplo de saponina esteroideal (Díaz 2009)	26
Figura 5 Esqueletos de agliconas representativos de saponinas esteroidales. (Yang et. al., 2014).....	27
Figura 6 Síntesis de saponinas esteroidales en plantas (Alcázar 2010).....	28
Figura 7 Saponinas esteroidales y triterpénicas (Bruneton, 2001)	29
Figura 8 Pasos básicos de una cromatografía en capa fina. Fuente:(Vallejo rosero 2021).	39
Figura 9 TLC de extractos de <i>Agave convallis</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Caracterización macroscópica para levaduras	40
Tabla 2 Tinción simple para levaduras	41
Tabla 3 fermentación de azúcares para levaduras	42
Tabla 4 Caracterización macroscópica de BAL	42
Tabla 5 Tinción de Gram para BAL	43
Tabla 6 Crecimiento de bacterias ácido lácticas en medios específicos para determinar género	45
Tabla 7 Fermentación de azúcares de bacterias ácido lácticas	45
Tabla 8 Caracterización macroscópica de bacterias ácido acéticas.....	46
Tabla 9 Tinción de Gram para bacterias ácido-acéticas	47
Tabla 10 Fermentación de azúcares para bacterias ácido acéticas	49
Tabla 11 Identificación molecular de cepas de levaduras	49
Tabla 12 Identificación molecular de cepas de bacterias ácido lácticas.....	50
Tabla 13 Identificación molecular de cepas de bacterias ácido acéticas	51
Tabla 14 Datos de muestra de <i>Agave convallis</i>	51
Tabla 15 Datos de extracto de <i>Agave convallis</i>	51
Tabla 16 Prueba cualitativa para saponinas.....	52
Tabla 17 Resultados de actividad antimicrobiana	53

INTRODUCCIÓN.

El mezcal es una bebida destilada que puede ser producido a partir de diferentes especies de Agave, por lo que los productores mexicanos pueden usar los recursos disponibles en sus regiones. (Martínez *et.al* 2009).

La producción del mezcal inicia con la cosecha de las cabezas maduras de agave también conocidas como “piñas”. Estas normalmente son cocidas en hornos en el piso, posteriormente son molidas en una “taona” para obtener el jugo que se deja fermentar y finalmente destilar. (Lappe *et. al* 2008).

El mezcal se obtiene a partir de la fermentación, la cual se da por los azúcares que se encuentran en el agave, este proceso se desarrolla en dos grandes etapas: la reproducción de levaduras y su consumo de azúcares, transformándolos en alcohol. La primera comienza al agregarle agua a las tinas que contienen el agave cocido y su duración varía dependiendo de las condiciones climáticas. La segunda, cuya duración comprende de dos a cuatro días comienza inmediatamente después de la reproducción de levaduras y se detecta con un burbujeo constante generando calor, alcohol y CO₂. (García, 2019).

La fermentación en la producción de mezcal inicia espontáneamente dando lugar a un amplio espectro de microorganismos. Que consumen los azúcares (fructosa y glucosa, principalmente) y otros compuestos (micronutrientes) como sustratos para el crecimiento, producción de etanol, dióxido de carbono y compuestos volátiles (esteres, alcoholes superiores, aldehídos) que contribuyen a la composición y las cualidades organolépticas del mezcal. Por lo tanto, el proceso fermentativo es crucial para la industria del mezcal. (Arrizon *et.al* 2006).

Las levaduras asociadas al mezcal elaborado en Oaxaca es de la más diversa del país, se han encontrado hasta 33 levaduras nativas. La más frecuente es la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Torulaspora delbrueckii* y *Pichia membranifaciens*, las levaduras restantes han sido identificadas de manera esporádica, así mismo las

bacterias cuyo rol en la fermentación ha sido plenamente identificado son las bacterias lácticas, donde figuran principalmente: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. Se han identificado también bacterias acéticas *Zymomonas mobilis* responsable de la fermentación acética aumentando la acidez del destilado. (García, 2019).

Las saponinas esteroidales presentes en los agaves son metabolitos secundarios involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas contra el ataque de hongos, bacterias, levaduras y algunos insectos. En los procesos de fermentación de las bebidas de agave, las saponinas inhiben el crecimiento de algunas levaduras, ocasionando una reducción en los rendimientos de producción. Estos mecanismos de inhibición no están del todo entendidos, sólo algunos estudios se han realizado con los esteroides de la membrana celular. Además, existe poca información acerca del efecto de las saponinas en los polisacáridos de la pared celular y los fosfolípidos de la membrana celular de las levaduras. (Alcázar 2016).

ANTECEDENTES.

Se encuentra poca información acerca de este tema, pero los pocos trabajos realizados con saponinas son los siguientes.

Se reportan por primera vez secuencias parciales de al menos tres distintos tipos de cDNAs nativos, clonados a partir de *Agave tequilana* Weber var. azul, con patrón de expresión tisular diferencial, similares al furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa, enzima responsable de la conversión de saponinas tipo furostano al tipo espirostano durante la biosíntesis de saponinas esteroideas. Se establecieron protocolos útiles para la cuantificación de los tres tipos de enzimas similares a F26G de *A. tequilana*, aplicables a estudios de regulación de su expresión durante la biosíntesis de saponinas en *Agave*. (Monroy 2019).

Las saponinas presentes en los *Agave duranguensis* y *Agave salmiana* ssp. *crassispina* presentaron actividad antimicrobiana que puede ser potencialmente utilizada en la industria farmacéutica y alimentaria. se observó tanto en los cultivos batch como en continuo que 10 minutos es tiempo suficiente para observar los efectos realizados por las saponinas en las levaduras, y que existe una relación directa entre la concentración de mananos y la actividad saponinasa en *K. marxianus*. Por lo que, la cepa *K. marxianus* empleada en este trabajo es tolerante a las saponinas, lo que ayudaría a mejorar los procesos de fermentación de las bebidas de *Agave*. (Alcázar 2016).

El género *Agave* se considera una fuente importante de metabolitos secundarios con diferentes propiedades biológicas. Los estudios fitoquímicos de extractos de hojas y raíces realizados a varias especies de agaváceas, muestran una riqueza en metabolitos secundarios y primarios como flavonoides, alcaloides, saponinas, terpenos, esteroides, cumarinas, fenoles, azúcares reductores, inulina, fructanos, entre otros. La presencia de varios de estos compuestos se asocia con diferentes propiedades biológicas como antibacteriana, insecticida y nematocida. (Camacho *et.al* 2020).

Planteamiento del problema

¿Existe conocimiento sobre el tipo de saponinas presentes en los agaves de Oaxaca?

¿Se conoce la forma de interactuar de las saponinas con el consorcio microbiano en el proceso de fermentación de mezcal?

¿Pueden modificar las saponinas a los consorcios microbianos de la fermentación del mezcal?

Justificación

Actualmente no existen muchos estudios sobre el efecto de las saponinas sobre los microorganismos del mezcal en Oaxaca, por lo que es un tema amplio y de interés, además la fermentación es un proceso crucial en la producción de mezcal, durante el cual las bacterias y levaduras utilizadas como iniciadores producen componentes que determinan las características organolépticas. Por eso es importante seleccionar cuidadosamente las bacterias y levaduras para controlar las características finales del mezcal.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de las saponinas sobre los microorganismos que participan en la fermentación del mezcal.

Objetivo específico

- Aislar, purificar e identificar el consorcio microbiano de la fermentación del mezcal.
- Realizar un estudio cualitativo de las saponinas de agave y determinar por TLC.
- Evaluar el efecto de las saponinas sobre el crecimiento de cepas de levaduras presentes en la fermentación.

CAPITULO I MARCO TEÓRICO

1.1 Agave

El género *Agave* pertenece a la subfamilia Agavoideae, que a su vez está integrada en la familia Asparagaceae (Porrás-Ramírez *et.al.*, 2016). El género *Agave* alberga alrededor de 200 especies, de las cuales más de 150 especies se encuentran en México (comúnmente conocidas como "Magueyes"), país considerado como el centro de origen de la alta diversidad genética encontrada en este género (Good-Ávila *et al.*, 2006; APG, 2009). Se pueden descubrir diversas formas y genotipos a nivel interespecífico e intraespecífico; debido a que los agaves han jugado un papel destacado en el desarrollo cultural y económico de México, con un ligero impacto en otros países donde también se han encontrado algunas especies (Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

1.1.1 Agave convallis

El *Agave convallis* Trel., conocido regionalmente como maguey "jabalí", es una especie silvestre y endémica del estado de Oaxaca. La planta es altamente apreciada en la elaboración de mezcal dado los atributos organolépticos de la bebida (Cruz-Luna *et.al.*, 2022). El *A. convallis* ha sido poco estudiado; sin embargo, en Oaxaca se ha utilizado en la elaboración de mezcal desde hace mucho tiempo debido a su particular sabor y a su difícil elaboración dado que posee alta concentración de saponinas (Starr, 2021).

1.2 Agaves con presencia de saponinas

1.2.1 Agave lechuguilla

En la lechuguilla se ha reportado la presencia de esmilagenina (sapogenina esteroidal), que es un precursor esteroidal, además de 8 sapogeninas más:

yucagenina, gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina ,por lo que podría emplearse como fuente de esteroides, para la elaboración de cortisona (antiinflamatorio), e incluso estrógeno y progesterona, o bien como suplemento alimenticio en la engorda de borregos debido a que sus hojas contienen entre 1 y 2 por ciento del peso seco de saponinas esteroidales.(Cervantes 2006).

1.2.2 *Agave americana*

Las fibras insolubles de la planta que se componen de celulosa, hemicelulosa y lignina, se proponen como refuerzo de materiales compuestos, aprovechando sus propiedades mecánicas y baja densidad, sin embargo, las investigaciones buscan aumentar su resistencia a la humedad y mejorar la adherencia entre la fibra y una matriz polimérica. (Aicha et. al 2010).

1.2.3 *Agave fourcroydes*

Los extractos de esta especie cultivada en Tailandia se solubilizaron en n-butanol, evidenciando citotoxicidad contra las células HeLa. Ohtsuki et. al. realizaron separación de componentes por Cromatografía en Columna y purificación final por HPLC, encontrando 5 saponinas esteroidales, una de las cuales es una clorogenina que no se había reportado con anterioridad cuya estructura se analizó mediante resonancia magnética nuclear. Por otro lado, García *et al.* afirman que el A. fourcroydes representa una alternativa como fuente de fructanos que podrían usarse como prebióticos en la alimentación de animales y del hombre. (Takashi et. al 2004).

1.2.4 *Agave macroacantha*

Las hojas de esta planta se obtuvieron del Jardín Botánico Público de El-Omar, en Giza, Egipto en ellas se encontró una nueva saponina monodesmosídica de espirostanol. Se determina la estructura mediante una combinación de técnicas NMR de 1D y 2D y MS. La extracción y aislamiento de las saponinas encontradas se realizó secando las hojas de la planta y posteriormente empleando metanol como solvente, precipitando las saponinas con acetona y eliminando los azúcares libres mediante el uso de una resina

porosa de intercambio iónico. Dos de las saponinas encontradas se habían reportado anteriormente como componentes del *A. americana*, *Agave cantala*, y *Hosta longipes*, pero una de ellas no se había aislado previamente. Estas saponinas, pueden emplearse como precursores de hormonas esteroides artificiales, como las empleadas para la producción de anticonceptivos. (Eskander *et al.* 2010).

1.3 Saponinas

Las saponinas son metabolitos glicosilados de alto peso molecular, utilizados por las plantas como mecanismo de defensa contra el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. Su presencia ha sido reportada en más de 100 familias de plantas. También se han reportado en animales marinos, como en Phylum Echinodermata y particularmente en especies de la clase Holoturoidea y Asteroidea (Oleszek 2006).

Su estructura consta de una parte glucídica que pueden ser cadenas de glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa, y una parte no glucídica denominada sapogenina o aglicona, que puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal. La clasificación de las saponinas se hace según la naturaleza de la aglicona. Así se distinguen entre saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales. Algunos autores dividen a las saponinas en un tercer grupo denominando aminas o alcaloides esteroidales (Sparg *et al.*, 2004). Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en las plantas monocotiledóneas, las cuales pertenecen a los géneros Liliácea, Dioscoreácea y Agavácea (Guclu 2007).

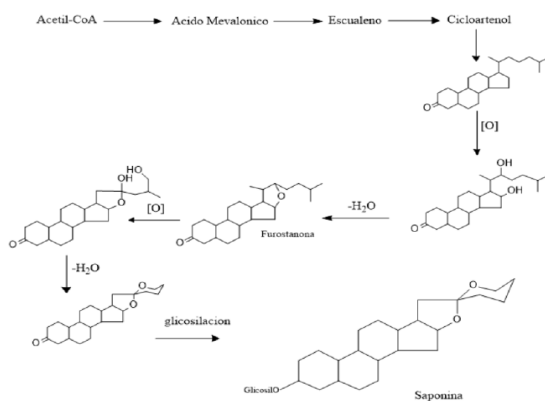


Figura 1 Síntesis de saponinas esteroidales en plantas (Martínez 2001)

Es importante mencionar, que la concentración de saponinas se ve afectada por la especie de planta, el origen genético, así como también de los factores ambiental y agronómico, como lo puede ser el crecimiento de la planta, los procedimientos de colecta y almacenamiento. (Guclu 2007).

1.3.1 Tipos de saponinas de *Agave*

Los jugos de las hojas de los agaves (*Agave difformis*, *A. lechuguilla*, *A. toumeyana*, *A. vilmoriniana*, *A. schott*, *A. duranguensis*, *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. cupreata*, por ejemplo) presentan saponinas de carácter esteroidal (Novel 1998). Las saponinas esteroidales se pueden dividir de acuerdo con su estructura en saponinas esteroidales de tipo espirostano o furostano.

Las saponinas esteroidales espirostano la estructura de su sapogenina consta de 27 carbonos, generalmente comprimidos por una estructura de seis anillos, mientras que las saponinas esteroidales del tipo furostano presentan en la posición 26 un enlace glicosilado y la estructura de la sapogenina permanece pentacíclica (Yang *et.al.* 2006; Figura 2).

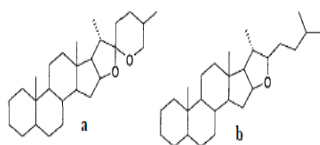


Figura 2 Estructura de sapogeninas de *Agave* (a) espirostano y (b) furostano

En el caso de las saponinas de agave, se han realizado estudios para reportar la actividad antimicrobiana de algunas especies de *Agave* (*A. americana*, *A. montana*, *A. marginata*, *A. ferox*, *A. scabra*, *A. lechuguilla*, *A. picta*, *A. lophanta*) principalmente en levaduras y hongos patógenos, Además, debido a su naturaleza esteroidal las saponinas de agave pueden presentar actividad antitumoral, hipoglucémica, inmonuregulatoria en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. (Yang 2006).

1.4 Caracterización de las saponinas

La identificación de la estructura de la saponina se puede dar por la combinación de los métodos químicos y espectrofotométricos. Se ha encontrado que la mayoría de las agliconas en los agaves 21 son esteroidales del tipo espirostano, que exhiben en el infrarrojo (IR) absorciones a los 918 y 900 cm^{-1} . (Martínez 2001).

Como menciona (Kind 2010), al utilizar la espectrometría de masas para el análisis de las saponinas, se pueden usar diferentes fuentes de ionización suave, como lo son:

Electro spray (ESI), que es usada para moléculas ionizables disueltas en un solvente polar volátil bombardeadas a través de un capilar de acero mediante nitrógeno formando un aerosol de pequeñas gotas con moléculas cargadas promovidas por un campo eléctrico.

-Bombardeo rápido de haz atómico (FAB), donde la muestra es disuelta en una matriz líquida (por ejemplo, glicerol) no volátil que es bombardeada por un rayo atómico de un gas inerte (Ar, Xe).

-Desorción laser asistida por una matriz (MALDI), la muestra es mezclada con una matriz de moléculas altamente ionizable (por ejemplo, 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)). La matriz ayuda a ionizar la muestra una vez que el haz del láser incide sobre la mezcla de matriz-muestra, y exista a los iones por el impacto tanto de la muestra como los de la matriz.

Los efectos de la temperatura afectan fuertemente la extracción de las saponinas y por ende su eficiencia en la purificación y en la caracterización debido a que las saponinas podrían ser hidrolizadas a una polaridad más baja a temperaturas por arriba de los 60 °C. Este cambio en la polaridad afectaría las actividades biológicas que pudieran tener las saponinas, como por ejemplo su actividad antimicrobiana. (Zhang 2013).

Las saponinas son glicósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpénico, esteroideal o esteroideal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Díaz 2009). Las saponinas son glicósidos hidrosolubles, con

propiedades tensoactivas y hemolíticas, ambas atribuidas a sus características estructurales de naturaleza anfifílica. Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto piscida, insecticida, anti-protozoos, antiinflamatorio, leishmanicida, anti-trichomonas, antiagregante plaquetario, broncolítico, hipo-colesterolémico, así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias. Estos informes sitúan a las saponinas del género *Sapindus* L. (Mena, *et. al.*, 2015).

Pueden tener un esqueleto tipo esteroideal (de basegonano) o de tipo triterpenoide (derivados del escualeno), las cuales dan lugar a las 2 grandes familias de estos metabolitos: las saponinas esteroidales y las saponinas triterpénicas. En ambas familias de saponinas el enlace glucosídico se establece a través del hidroxilo en posición 3 del anillo A de la aglicona. Las esteroidales, se localizan en monocotiledóneas principalmente de las familias de las liliáceas, amarilidáceas y dioscoreáceas y las triterpénicas en éstas y en algunas dicotiledóneas. Entre las saponinas esteroidales, cabe destacar aquéllas que tienen como aglicona a la hecogenina y la diosgenina, compuestos vegetales que sirven de base para la industria de hormonas esteroidales. Las sapogeninas triterpénicas están ampliamente distribuidas en los reinos vegetal y animal, se presentan en 3 estructuras químicas diferentes (30-45 carbonos): acíclicas como el escualeno, considerado como el precursor natural de esta familia: tetracíclicas como el panaxadiol y pentacíclicas como la estallogenina. Estas sustancias pueden presentarse en sus fuentes naturales: en forma libre: formando ésteres, o como parte de un glicósido (saponina). Las sapogeninas pentacíclicas se subdividen a su vez en 3 grupos: tipo lupane: tipo ursane (derivado de la α amirina), ambos no están presentes en los forrajes y los de tipo oleanane (derivados de la β amirina) presentes en estos últimos. Las 2 familias de saponinas referidas presentan un grupo de características generales que sirven de base para su identificación rápida: a) producción de espuma al ser agitadas sus soluciones acuosas, lo cual es la base de la reacción de selivoflo empleada en el tamizaje fitoquímico; b) producción de hemólisis de los glóbulos rojos por la mayoría de ellas, propiedad que se aprovecha en las técnicas en que se cuantifica la potencia de estas sustancias; c) toxicidad en animales

poiquilotérmicos, en especial los peces(sapotoxinas), a los cuales provocan parálisis de las agallas (se emplean en formas destructivas de pesca); d) producción de una reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchard. Por lo general, las esferoidales en esta prueba manifiestan colores que van desde el azul hasta el verde y las triterpénicas, rosado, rojo o violeta. Además, la mayoría de las saponinas son solubles en diferente grado en soluciones de etanol al 80%, propiedad que se emplea en diversas técnicas para su extracción y purificación (Valencia *et. al.*, 2005).

Las saponinas son un grupo de glucósidos oleosos, los cuales son solubles en agua produciendo espumosis cuando las soluciones son agitadas. Las saponinas esteroidales son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroide hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Estas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y aunque en mayor o menor medida se encuentran en una gran cantidad de plantas, son especialmente abundantes en algunas familias, entre ellas la Agavaceae (Cervantes 2016).

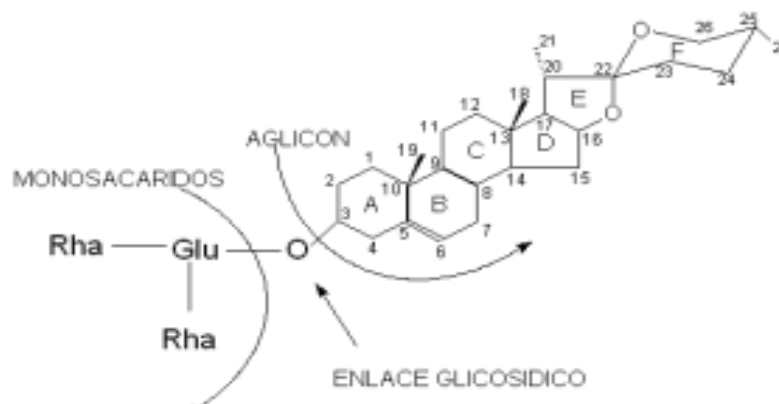


Figura 3 Ejemplo de saponina esteroideal (Cervantes 2016)

En la naturaleza, las plantas se protegen del ataque de los patógenos, plagas, y herbívoros secretando varias saponinas. (Yang *et.al*, 2014).

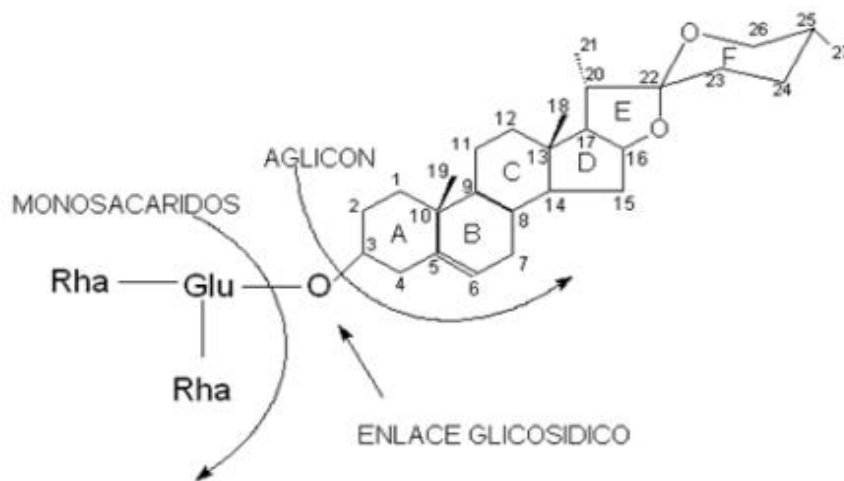


Figura 4 Ejemplo de saponina esteroideal (Diaz 2009)

Las saponinas tienen un amplio rango de propiedades biológicas, Sus propiedades tensoactivas son lo que distingue estos compuestos de otros glucósidos. Se disuelven en agua para formar soluciones coloidales que forman espuma al sacudir (Sparg *et al.*, 2004). Además, “poseen actividad antimicrobiana, fungicida, insecticida, molusquicida

y antiparasítica (Yang *et al.*, 2014). También presentan actividades farmacológicas potente antiinflamatorio, antihipertensivo, anticáncer (Ghoghari *et al.*, 2006).

Estos compuestos, dependiendo del número azúcares unidos, puede además ser clasificado como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- o hexa- glicósidos. Si el azúcar (o cadena de azúcares) está presente únicamente en una posición de la sapogenina, la saponina es llamada monodesmosídica. La mayoría de las saponinas espirostanol de Agave es monodesmosídica y tiene una unidad de azúcar presente en el C-3 de la aglicona. Las saponinas bidesmosídicas, por otra parte, tienen dos unidades de azúcar localizadas en dos puntos diferentes del núcleo de aglicona. (Sidana *et al.*, 2016).

Además, si son tres cadenas de azúcar unidas a la aglicona en diferentes puntos, a las saponinas se las denomina tridesmosídicas, Como se observa en la Figura 3, Las saponinas esteroidales... comprenden cuatro tipos representativos de esqueleto esteroidales, llamados, espirostan hexacíclico, furostan pentacíclico, colestano tetracíclico, y cardenólido contenedor de lactona. (Yang *et al.*, 2014).

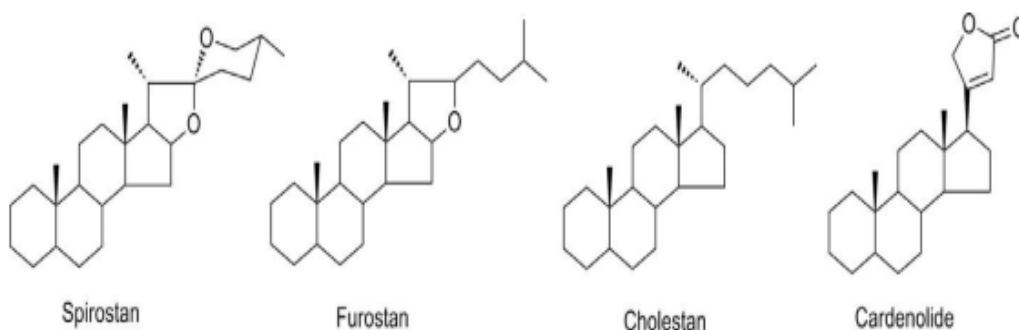


Figura 5 Esqueletos de agliconas representativos de saponinas esteroidales. (Yang *et. al.*, 2014)

1.5 Biosíntesis de saponinas esteroidales

La biosíntesis de las saponinas esteroidales (Figura 4), se produce de la siguiente manera: Su síntesis en plantas es por la ruta del acetil-CoA vía ácido mavalónico y escualeno. En donde una vez formado un precursor esteroide con 27 átomos de

carbono, este es deshidrogenado para originar 3-colestona. La colestona es hidroxilada en los carbonos 16, 22 y 27. Este compuesto intermediario al ser altamente hidroxilado en la cadena lateral, puede sufrir una deshidratación en los hidroxilos unidos a los carbonos 16 y 22, lo que origina la 3-furestanona; o también puede sufrir además otra deshidratación entre los hidroxilos restantes de las posiciones 22 y 27, lo que da lugar al anillo de espirostano propiamente dicho. La 3-espirostanona puede ser reducida a 3-espirostanol, el cual puede sufrir procesos enzimáticos de glicosilación para originar las saponinas esteroidales. (Alcázar, 2016).

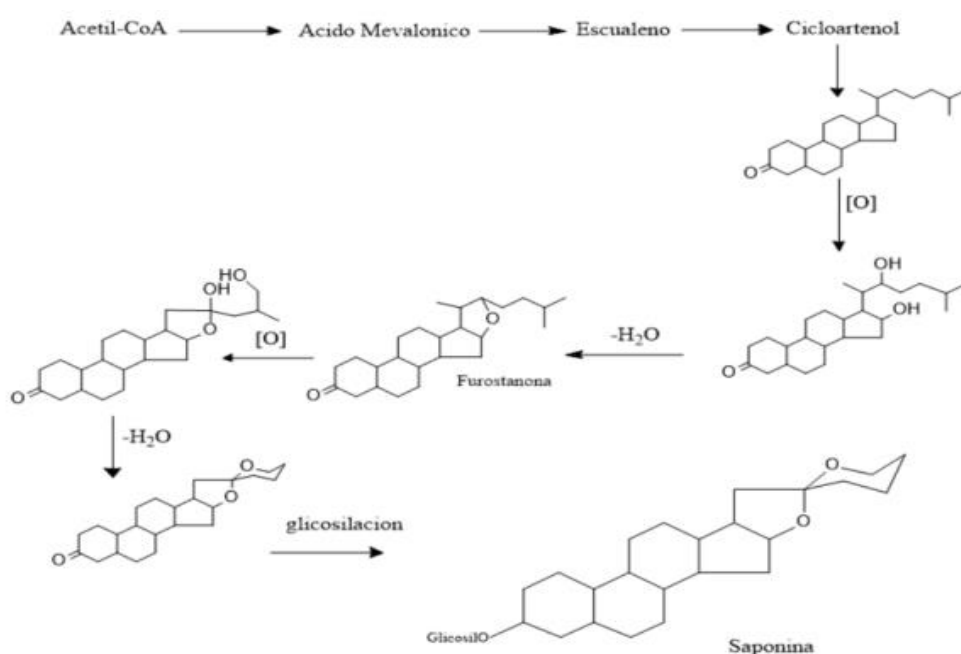


Figura 6 síntesis de saponinas esteroidales en plantas (Alcázar 2010)

Las saponinas corresponden a un amplio grupo de heterósidos y se caracterizan por sus propiedades tensoactivas (forman disoluciones espumosas en el agua), son compuestos orgánicos que contienen uno o varios azúcares. Además, poseen propiedades hemolíticas y la mayoría son tóxicas para animales de agua fría, principalmente peces. Según la naturaleza de la genina se clasifican en saponinas

esteroidales y triterpénicas, su diferencia radica en que las saponinas esteroidales y triterpénicas y su diferencia radica en que las saponinas esteroidales han eliminado tres de sus radicales metilos, mientras que las saponinas triterpénicas lo mantienen intactos (Bruneton, 2001).

Saponinas esteroidales y triterpénicas

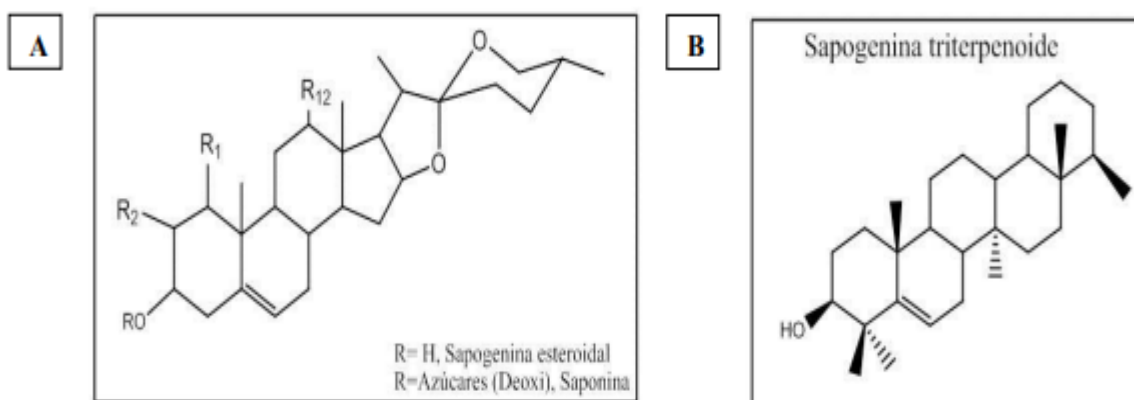


Figura 7 Saponinas esteroidales y triterpénicas (Bruneton, 2001)

Saponinas en el agave

Agave lechuguilla Torrey es una planta que pertenece a la familia de las *Agavaceae*, crece en zonas áridas, en terrenos calizos y rocosos. Se explota para la obtención de la fibra, conocida en México como *ixtle*, la cual se utiliza ampliamente en las industrias de la fabricación de cepillos y de la construcción debido a sus características abrasivas y alto índice de retención de agua (65 por ciento). Las saponinas esteroidales se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliácea (*Agavaceae*), Dioscoreácea y Amarilidácea. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias Solanácea y Scrofulariaceae. En el género agave se han identificado varias sapogeninas como: hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina. Dentro de los primeros estudios sobre la composición de *Agave lechuguilla* encontraron la presencia de esmilagenina y gitogenina con rendimientos de 5 g/kg y 0.6 g/kg en base seca respectivamente. En la lechuguilla se ha reportado la presencia de

esmilagenina (sapogenina esteroideal), que es un precursor esteroideal, además de 8 sapogeninas más: yucagenina, gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina, por lo que podría emplearse como fuente de esteroides, para la elaboración de cortisona (antiinflamatorio), e incluso estrógeno y progesterona, o bien como suplemento alimenticio en la engorda de borregos debido a que sus hojas contienen entre 1 y 2 por ciento del peso seco de saponinas esteroidales.(Hernández et. al 2005).

Todas las plantas del género Agave contienen glucósidos esteroideos, entre los que destaca la hecogenina, así como saponinas. A ellos deben, la raíz y las hojas, su efecto diurético y depurativo de la sangre, por lo que se utiliza con buenos resultados en caso de edemas y retención de líquidos. (Pamplona 2006).

Las saponinas esteroidales se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliácea (Agavaceae), Dioscoreácea y Amarilidácea. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias Solanácea y Scrofulariaceae, el género Agave se han identificado varias sapogeninas como: hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina. (Cervantes 2006).

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se realizó el muestreo a partir del cuarto día de fermentación en una fábrica de mezcal artesanal ubicada en la población de San Pedro Teozacoalco (coordenadas 17.0175299, -97.2961261) del estado de Oaxaca, bajo las medidas necesarias para evitar la contaminación en las tinas de fermentación y en la muestra tomada, todo el material fue esterilizado previo a la visita.

MAPA DE UBICACIÓN

2.1.1 Medición de parámetros fisicoquímicos

Se realizó la medición de pH con la ayuda de un potenciómetro marca HANNA modelo HI 2210, la cantidad de sólidos suspendidos se midió utilizando un refractómetro portable Brix digital 0-90% y para la temperatura se usó un termómetro de mercurio.

IMAGEN

2.2 Aislamiento

El aislamiento se realizó utilizando una dilución de la muestra en caldo peptonado al 1%, se utilizaron 6 tubos de ensayo y se les adicionaron 9 ml del caldo peptonado a cada tubo. En el primer tubo se agregó 1 ml del mosto de mezcal y se agitó, este tubo fue la dilución a 1×10^{-1} , se le extrajo 1 ml a la primera dilución y se agregó ese ml al tubo 2, el tubo 2 fue la dilución a 1×10^{-2} , se siguió el mismo procedimiento hasta el tubo 6 que fue la dilución a 1×10^{-6} . Se realizó siembra por plaqueo o extensión de placa (colocando 50 μ l del tubo 6 en una caja Petri) en los medios correspondientes para los microorganismos de interés y se incubaron de 24 a 72 horas a 28 °C.

2.2.1 Aislamiento de levaduras

Se utilizó el medio selectivo YPD (agar, Extracto de levadura, Peptona, Dextrosa), adicionando 20 gotas/L de Cloranfenicol para hacerlo selectivo para levaduras y evitar el crecimiento de bacterias.

2.2.2 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas

Se utilizó el medio selectivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) adicionando 20 mg/L de Nistatina para impedir el crecimiento de levaduras.

2.2.3 Aislamiento de bacterias ácido-acéticas

Se utilizó el medio selectivo GYC (agar, extracto de levadura, dextrosa y carbonato de sodio) adicionando Nistatina para impedir el crecimiento de levaduras.

2.3 Purificación

Se realizó en los medios anteriormente especificados para cada tipo de microorganismo, seleccionando las colonias más diferenciadas, el método de cultivo se hizo por la técnica de estría cruzada por agotamiento para obtener un cultivo axénico.

2.4 Conservación

Se realizó la conservación de los microorganismos por congelamiento utilizando glicerol al 10% como crioprotector.

Se tomaron 3 asadas de cada una de las cepas purificadas y se depositaron en tubos eppendorf de 2mL esterilizados, se agregó 1 mL de glicerol al 10% (previamente esterilizado) para proteger las células de la baja temperatura en la que se conservará, los tubos utilizados se colocaron en una microcentrífuga a 10 000 RPM por 5 minutos, se sellaron los tubos con Parafilm y se colocaron en frascos, se rotularon y almacenaron a una temperatura de -20 °C.

2.5 Caracterización fenotípica

2.5.1 Caracterización macroscópica

Se observaron las colonias purificadas en el microscopio estereoscopio identificando características de forma, tamaño, color, elevación, etc. de cada una de las cepas seleccionadas.

2.5.2 Caracterización microscópica

Se realizó un montaje húmedo y una tinción simple con azul de metileno para levaduras y para bacterias se llevó a cabo un frotis y tinción de Gram. Se observaron en microscopio óptico (VELAB Serie P-VE-B4).

2.5.3 Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación hasta género de las cepas de levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias ácido-acéticas obtenidas a partir de las purificaciones realizadas.

2.5.3.1 Pruebas bioquímicas para levaduras

Se realizó la prueba de fermentación de carbohidratos para cada una de las cepas obtenidas, el medio a emplear fue el Caldo Base Rojo de Fenol (CBRF), cuyos componentes son: 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de cloruro sódico y 0.018 g/L de rojo de fenol. Se disolvió CBRF en agua destilada y se colocaron 4 ml en tubos de ensayo (el número de tubos dependerá de las cepas obtenidas) además de un tubo Durham para así esterilizar a 10 lb de presión por 10 min. Caldo base rojo de fenol (CBRF) representa un 99% de la composición total, el 1% lo formó el azúcar a fermentar, para ello se hizo una solución al 5% del azúcar o alcohol a utilizar, se disolvió en agua esterilizada y se agregó 1 ml de la solución al 5% a los tubos con el

medio CBRF para así tener una solución al 1% de carbohidrato, se utilizó un filtro para esterilizar el carbohidrato a utilizar, después se inoculó cada cepa de levadura con la ayuda de un asa de cultivo. Los carbohidratos para fermentar fueron los siguientes: glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa, manosa, maltosa, xilosa, manitol y sorbitol. Si el medio cambia de rojo a amarillo entonces la prueba se leerá como positiva y si en la campana Durham aparece una burbuja se leerá que la levadura es capaz de producir CO₂.

2.5.3.2 Pruebas Bioquímicas para bacterias ácido-lácticas

2.5.3.2.1 Crecimiento en medio Elliker

Se elaboró el medio Elliker que está compuesto por 5 g/L de dextrosa, 2.5 g/L de gelatina, 1.5 g/L de acetato de sodio, 5 g/L de sacarosa, 5 g/L de extracto de levadura, 0.5 g/L de ácido ascórbico, 5 g/L de lactosa, 4 g/L de cloruro sódico y 20 g/L de triptona. Se diluyeron los compuestos en agua destilada para esterilizarse a 10 lb por 10 min. Se colocó el medio en cajas Petri y se inocularon las bacterias ácido lácticas para incubarlas a 33 - 37 °C durante 18 - 48 horas. Se observó si hay un crecimiento considerable de bacterias para considerarla positiva de ser así de forma presuntiva probó la presencia del género *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

2.7.2.2 Crecimiento en medio M17

Se elaboró el medio M17 que está compuesto por 0.5 g/L de ácido ascórbico, 5 g/L de extracto de carne, 5 g/L de lactosa, 2.5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de soja, 12.75 g/L de agar, 2.5 g/L de peptona de caseína, 0.25 g/L de sulfato magnésico, 19 g/L de glicerofosfato sódico y 2.5 g/L de extracto de levadura. Se disolvieron los compuestos en agua destilada después se esterilizó en autoclave a 10 lb por 10 min y se reguló el pH entre 7 a 7.4. Se colocó el medio en cajas Petri, se inocularon las BAL y se incubaron a 28 – 30 °C por 48 horas. Si se observa un crecimiento considerable de bacterias la prueba se considera positiva y de forma presuntiva se prueba la presencia del género *Streptococcus*.

2.7.2.3 Crecimiento en medio M5

Se elaboró el medio M5 que está compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L de fructosa, 2.5 g/L de fosfato de potasio monobásico, 1 ml de Tween 80, 0.2 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.05 g/L de sulfato de manganeso monohidratado, 20 ml de verde de bromocresol y 20 g/L de agar. Se ajustó el pH del medio a 6.5, se colocó el medio en cajas Petri y se inocularon las cepas de BAL obtenidas, si incubaron a 28 °C por 48 horas. Se consideran BAL homolácticas si el medio azul vira a amarillo y serán BAL heterolácticas si el medio permanece azul.

2.7.2.4 Reducción de nitratos

Se elaboró el caldo nitrado que se compone de 5 g/L de extracto de carne, 10 g/L de peptona de carne, 1 g/L de nitrato de potásico y 1 g/L de cloruro sódico. Se disolvió en agua destilada y se distribuyeron 5 ml del medio en tubos de ensayo para esterilizar a

10 lb por 10 min. Se inocularon las BAL con la ayuda de un asa de cultivo y se incubaron a 35 – 39 °C por 24 horas. Después de pasar las 24 horas se extrajo 1 ml del cultivo para colocarlo en un tubo nuevo, se elaboró reactivo Griess-ilosvay que se compone por 1 ml de solución A (8 g ácido sulfanílico con 1 litro de ácido acético 5N) con 1 ml de solución B (5 g de alfa-Naftilamina con 1 litro de ácido acético 5N), se adicionó la solución Griess-ilosvay al ml anteriormente extraído, si el medio se torna rojo se probará la existencia de nitritos lo que confirma la reducción de Nitratos.

2.7.2.5 Prueba de formación de gas en medio MRS

Se elaboró el medio MRS líquido, compuesto por 10 g/L de peptona bacteriológica, 20 g/L de dextrosa, 2 g/L de fosfato dipotásico, 0.2 g/L de sulfato magnésico, 0.05 g/L de sulfato de manganeso, 8 g/L de extracto de carne, 5 g/L de acetato de sodio, 1 g/L Tween 80, 4 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de citrato amónico. Se disolvió en agua destilada, se colocaron 5 ml en tubos de ensayo y se le agregaron campanas de Durham, se esterilizaron a 10 lb por 10 minutos. Se inocularon las BAL con la ayuda de un asa de cultivo. Se incubaron a 35 °C por 72 horas, la formación de una burbuja en la campana de Durham indicará la formación de Gas.

2.7.2.6 Prueba Catalasa

Una vez terminadas las pruebas anteriores, se agregó unas gotas de peróxido de hidrogeno al 30% a las BAL, si se observa un burbujeo indicará la presencia de la enzima catalasa.

2.7.3 Pruebas bioquímicas para Bacterias Ácido-Acéticas

2.7.3.1 Prueba Catalasa

Con la ayuda de un asa de cultivo, se tomó de la caja Petri del medio GYC una muestra de células, se colocó en un portaobjeto y se le adicionaron 2 a 4 gotas de peróxido de hidrógeno al 30%, si comienza a burbujear la prueba se tomará como positiva.

2.7.3.2 Oxidación de acetato de sodio

Se elaboró el medio compuesto por 0.3% de peptona, 0.2% de extracto de levadura, 0.2% de acetato de sodio y 0.002% de azul de bromotimol, se ajustó el pH a 6.4. Se colocó el medio en tubos de ensayo y se inocularon las BAA con la ayuda de un asa de cultivo. Se incubaron durante 7 días a 29 – 31 °C. El cambio de color de verde a amarillo, producido por la alcalinización del medio debido a la oxidación del sustrato se interpretará como prueba positiva.

2.7.3.3 Crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético

Se inocularon las BAA en un medio compuesto por 1% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de malta y 0.35% (v/v) de ácido acético. Se incubaron en tubos de ensayo durante 10 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro.

2.7.3.4 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol

Se elaboró un medio compuesto por 3% glicerol, 0.5% de extracto de levadura, 1% de peptona y 1.5% de agar, ajustando el pH a 6, se vació en cajas Petri y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días. Después de incubar se agregó reactivo de Fehling sobre la superficie de la placa Petri. La aparición de un color naranja oscuro probará la presencia de dihidroxiacetona indicando un resultado positivo.

2.7.3.5 Crecimiento con metanol como fuente de carbono

Se probó la asimilación de metanol en el medio Hoyer-Frateur compuesto por, 0.1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% de K_2HPO_4 , 0.09% de KH_2PO_4 , 0.025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3% (v/v) de metanol. Se agregó el medio en tubos de ensayo y se inocularon en ellos las BAA. Se incubaron por 7 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro.

2.7.3.6 Crecimiento en agar manitol

Se observó el crecimiento de las BAA en un medio formado por 2.5% de manitol. 0.5% de extracto de levadura, 0.3% de peptona y 2% agar, se ajustó el pH a 6. Se colocó el medio en cajas Petri y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C.

2.7.3.7 Crecimiento en 1% de KNO_3

Se elaboró el medio compuesto por 1% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de malta y 1% de KNO_3 . Se distribuyó el medio en tubos de ensayo y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en espectrofotómetro.

2.7.3.8 Crecimiento en 3% de NaCl

Se formuló el medio compuesto por 1% glucosa, 0.3% extracto de levadura, 0.5% de peptona, 0.3% de extracto de malta y 3% de NaCl . Se distribuyó el medio en tubos de ensayo y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. Se evaluó el crecimiento midiendo densidad óptica a 540 nm en espectrofotómetro.

2.7.3.9 Crecimiento en 30% de glucosa

El medio compuesto por 30% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona y 0.3% de extracto de malta fue distribuido en tubos de ensayo en el cual se inocularon las BAA y se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm en espectrofotómetro.

2.7.3.10 Crecimiento en agar glutamato

Se elaboró el medio compuesto por 0.5% de glutamato de sodio, 0.5% de extracto de levadura, 0.3% de peptona y 2% de agar, se ajustó el pH a 6. Se distribuyó el medio en cajas Petri y se inocularon las BAA. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C.

2.7.3.11 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes

Para probar la formación de ácidos se formuló el medio compuesto por 0.5% de extracto de levadura, 0.002% de púrpura de bromocresol y 1% de azúcar/alcohol. Se colocó el medio en tubos de ensayo utilizando los siguientes azúcares y alcoholes: sacarosa, manitol, glucosa, lactosa, sorbitol, galactosa, manosa, glicerol, etanol y propano, se inocularon las BAA y se incubaron durante 7 días a 29 – 31 °C. El cambio de color de púrpura a amarillo, producido por la acidificación del medio debida a la oxidación del sustrato, se interpretó como prueba positiva.

2.7.3.12 Oxidación de etanol a CO₂

Se utilizaron cultivos de etanol verde de bromocresol, cuya composición es: 3% de extracto de levadura, 0,0022% verde de bromocresol y 3,85% (v/v) de etanol. Se incubaron durante 10 días a 29 – 31 °C. La producción de ácido acético a partir de etanol se observa por el cambio de color del medio (amarillo) y la oxidación posterior del ácido formado, a CO₂ y H₂O por un nuevo cambio de color (verde azulado).

2.8 Extracción de ADN

La aplicación de técnicas moleculares inicio con la extracción de ADN. La extracción consistió en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN basado en las características fisicoquímicas de la molécula, Se realizó extracción de ADN mediante el kit de extracción de ADN genómico YeaStar Kit de Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante, para levaduras se siguió el protocolo de Osorio 2009, la calidad del ADN se verifico mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, utilizando el agente intercalante Gel Red en amortiguador TAE (Tris base, ácido acético glacial y ácido etilendiaminotetraacético), usando como referencia un marcador molecular de 1Kb. La electroforesis se corrió a 80 Volts durante 30 minutos.

La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución.

Los geles de agarosa se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante

2.9 Amplificación de secuencias PCR

La PCR es un rápido procedimiento usado para amplificar un segmento específico de ADN, técnica análoga al proceso de replicación del ADN que tiene lugar en las células. Una de las razones de su éxito es la simplicidad de la reacción y la facilidad para realizar cada una de las etapas, por lo que es usada en análisis de ADN y en los análisis de los procesos celulares y moleculares. Las aplicaciones de esta técnica son muy diversas, estas incluyen la clonación directa del ADN genómico o ADN complementario, mutagénesis in vitro e ingeniería del ADN, ensayos para detectar la presencia de agentes infecciosos, diagnósticos prenatales o enfermedades genéticas, análisis de la variación de secuencias alélicas y la secuenciación directa del ADN genómico y complementario. Para su implementación es necesario conocer las

secuencias del ADN que flaquean el fragmento que se desea amplificar, y a partir de esta información se pueden sintetizar químicamente los oligonucleótidos u oligonucleótidos complementarios a cada una de las hebras de la doble hélice de ADN. Los reactivos requeridos para la PCR incluyen la enzima Taq ADN polimerasa, los eslabones de las hebras de ADN o deoxiribonucleósidos trifosfatos (dNTP's) y al amortiguador apropiado para la enzima, el cual es generalmente optimizado con diferentes concentraciones de magnesio, un cofactor de la reacción de polimerización. Este último elemento es uno de los componentes críticos de la PCR, ya que no solo afecta la enzima, sino también al ensamblaje de los oligonucleótidos. La técnica de PCR incluye tres etapas críticas definidas por tiempos y temperaturas específicas: 1) desnaturalización, 2) alineación y 3) extensión. Cada una de estas etapas es repetida 30-40 veces en ciclos térmicos. En el primer ciclo la doble hélice template o molde es desnaturalizada por calor a una temperatura de 90° C, al separarse las dos hebras de ADN, la región de interés por ser amplificada se vuelve más accesible. La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura entre 40-60° C permitiendo que el grueso de las hebras se mantenga separadas, pero a la vez, permitiendo la hibridación de las secuencias pequeñas más homologas presentes, en este caso los oligonucleótidos adicionados, los cuales se encuentran presentes en exceso. Durante la última etapa caracterizada por la temperatura a 72° C, se lleva a cabo la extensión del nuevo ADN, mediante la acción de una ADN polimerasa termoestable, la Taq ADN polimerasa (Hernández Mota, 2009).

Se amplificó el gen 16s ADN_r en bacterias ácido-lácticas usando los oligos 8F 5' (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) 3' Y 1492R 5' (GTT ACC TTG TTA CGA CTT) 3', las condiciones de los ciclos fueron: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 29 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Espinoza, 2022). En levaduras se aplicó el gen 5.8 S utilizando los oligos ITS1 5' (TCC GTA GCT GAA CCT GCG G) 3' y el ITS4 5' (TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3' las condiciones de los ciclos fueron: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 92°C, seguida de 29 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los amplicones se cuantificaron en NanoDrop a una absorbancia de 260/280 nm para estimar la pureza y determinar qué cantidad de proteínas conservaban las ampliaciones; y a una absorbancia de 260/230 para cualificar la pureza. Se estimó el tamaño del segmento amplificado de cada muestra mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% utilizando el agente intercalante Gel Red en amortiguador TAE, usando como referencia un marcador molecular de 1Kb. La electroforesis se corrió a un voltaje de 80 Volts durante 50 minutos. Las muestras que obtuvieron una buena apariencia de la banda al colocar sólo 1µL del producto de PCR se mandaron a secuenciar a la empresa MacroGen (MacroGen Inc. Korea).

2.10 Alineación de secuencias

Podemos definir la Bioinformática como la aplicación de tecnología informática para la gestión y el análisis de datos biológicos. Por otra parte, El Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos utiliza una definición más completa y define a la bioinformática como la investigación, el desarrollo o aplicación de herramientas computacionales y enfoques informáticos para ampliar el uso de datos médicos, de salud o de comportamiento biológico. BLAST o “Basic Local Alignment Search Tool” es posiblemente la herramienta bioinformática más popular. El programa fue creado por Eugene Myers, Stephen

Altschul, Warren Gish, David J. Lipman y Web Miller en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) y publicado en 1990, convirtiéndose en uno de los artículos más citados de la década de los 90 (en la actualidad tiene más de 32.000 referencias). La característica que distingue a BLAST de herramientas más tradicionales, como Smith-Waterman, es su énfasis en reducir el tiempo necesario para realizar el alineamiento local, a cambio de sacrificar la sensibilidad. Dicha eficiencia temporal se logra gracias al uso de un algoritmo heurístico, no garantizándose, por tanto, el descubrimiento de la solución (alineamiento) óptimo. (Collado, 2010)

El propio NCBI proporciona una versión de código abierto del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Este hecho ha permitido la aparición de un gran número de variantes, desde optimizaciones hasta implementaciones ad-hoc que resuelven con soltura determinados problemas. Asimismo, el NCBI tiene habilitado un servidor web público que permite realizar búsquedas contra las bases de datos contenidas en el NCBI. Aunque, de esta manera, se garantiza que las bases de datos utilizadas están actualizadas, el uso limitado del servidor impide alinear un gran número de secuencias. Para hacer uso de BLAST, en primer lugar, es necesario conocer sus parámetros principales.

2.11 Saponinas de Agave

2.11.1 Extracción por maceración

La muestra de *Agave convallis* se cortó en cuadros de 2cm x 2cm, y se puso a secar en horno marca RIOSA modelo H-48 a 50 °C, durante 3 días, la muestra seca se puso a macerar en 450ml de etanol absoluto y se concentró el extracto en rotavapor marca BUCHI modelo R-210.

2.11.2 Extracción por soxhlet

La muestra de *Agave convallis* se cortó en cuadros de 2cm x 2cm, y se puso a secar en horno, durante 3 días, la muestra seca se puso en un saco de papel filtro que se introdujo en el equipo soxhlet con 450ml de etanol absoluto, una vez terminado el proceso se concentró el extracto en rotavapor marca BUCHI modelo R-210.

2.12 Cromatografía en capa fina TLC

La cromatografía en capa fina (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography) consistió en la separación de los componentes del extracto crudo de *Agave convallis*. Se usó una fase móvil de ácido acético, ácido sulfúrico y etanol (0.4:0.4:4.1) y una fase estacionaria de sílica.

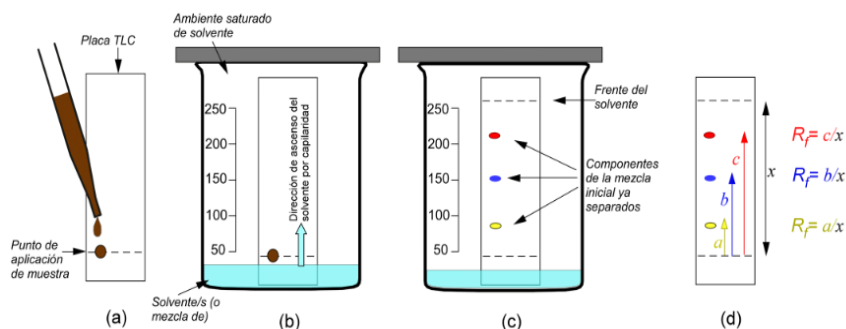


figura 8 Pasos básicos de una cromatografía en capa fina. Fuente: (Vallejo rosero 2021).

2.13 Actividad antimicrobiana

Para las pruebas de actividad antimicrobiana se utilizaron extractos etanólicos de hoja, piña cruda y piña cocida de *Agave convallis*. Se realizaron diluciones de cada uno de los extractos (2000 µg/mL, 4000 µg/mL, 6000 µg/mL), preparado en una solución de DMSO al 1.5% y agua destilada, las cuales se utilizaron en los diferentes ensayos. Se utilizaron para la actividad antimicrobiana los siguientes microorganismos: *Candida parapsilosis* (ITOYIV039), *Saccharomyces cerevisiae* (ITOYIV040), *Pichia kluyveri* (ITOYIV046), *Candida tropicalis* (OAXY8H), *Meyerozyma guilliermondii* (OAXY9H).

Se obtuvieron de aislados identificados en el laboratorio de control ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca. Se recultivaron en agar YPD, incubadas a 29°C por 24 horas. Para la determinación de la actividad antimicrobiana se impregnaron discos estériles de papel filtro de 10mm de diámetro y se les adicionaron 25 µl del extracto, los cuales fueron colocados en una placa de agar Mueller- Hinton con la ayuda de unas pinzas estériles, previamente inoculada con células de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) con el uso de un hisopo estéril. Posteriormente, las placas inoculadas se incubaron por 48h a 29°C. La acción antimicrobiana se evidenció midiendo el diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento microbiano alrededor del disco. Se realizaron tres réplicas por cada extracto evaluado.

CAPITULO III. RESULTADOS

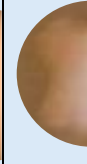
3.1 Caracterización fenotípica

3.1.1 Levaduras

3.1.1.1 Caracterización macroscópica

Tabla 1 Caracterización macroscópica para levaduras

Cepa	ITOY IV03 4	ITOY IV03 5	ITOY IV03 6	ITOY IV03 7	ITOY IV03 8	ITOY IV03 9	ITOY IV04 0	ITOY IV04 1	ITOY IV04 2	ITOY IV04 3	ITOY IV04 4	ITOY IV04 5	ITOY IV04 6
Tamaño	Pequeño	Grande	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Grande	Pequeño	Grande	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanca	Amarilla	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Amarillo	Blanco
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Entero	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Ondulado	Entero	Ondulado	Entero	Entero	Entero	Ondulado
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Umbonada	Convexa	Umbonada	Convexa	Convexa	Convexa	Umbonada
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Aspecto	Húmedo	Seco	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Seco	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Luz transmitida	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca

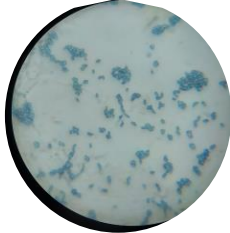
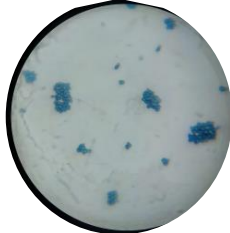
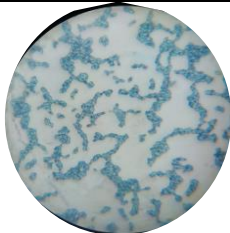
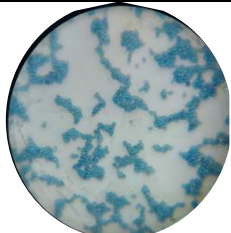
Luz reflejada	Brillante	Opaca	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Opaca	Brillante	Opaca	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Imagen													

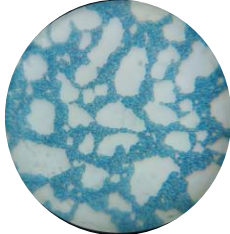
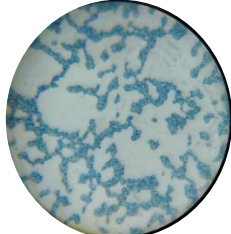
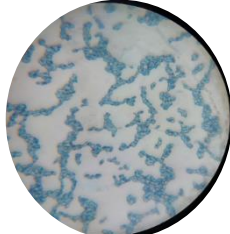
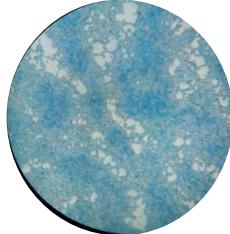
Se realizo una caracterización morfológica de cada una de las cepas de levaduras seleccionadas en agar extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD), en base al tamaño, color, forma, borde, elevación, superficie, consistencia, aspecto, luz transmitida y luz reflejada, esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento a 30° C. Se observa que una característica común en las cepas es su superficie lisa, consistencia cremosa, luz transmitida opaca.

3.1.1.2 Caracterización microscópica

La tinción, así como la lectura de microscopio fue basado en las técnicas básicas de microbiología descritas en Bergeys 1984.

Tabla 2 Tinción simple para levaduras

Cepa	ITOYIV034	ITOYIV035	ITOYIV037	ITOYIV038
Tinción simple				
Cepa	ITOYIV039	ITOYIV040	ITOYIV041	ITOYIV042
Tinción simple				

Cepa	ITOYIV043	ITOYIV044	ITOYIV045	ITOYIV046
Tinción simple				

3.1.1.3 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas fueron sacadas de Bergeys 1984.

Tabla 3 Fermentación de azúcares para levaduras

Cepa	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	++	++	+	-	+	+	+++	-	-	-	++	+	+
Sacarosa	++	+++	+	++	++	++	+++	+	+	+	++	++	+
Manosa	++	+++	++	+	+	++	+++	+	+	+	++	++	++
Lactosa	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	++	++

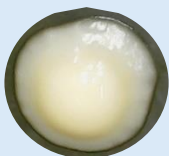
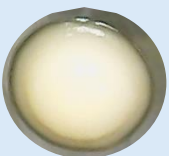
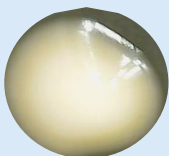
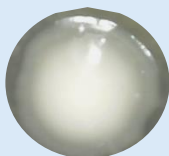
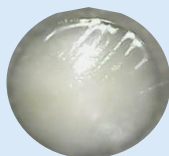
3.1.2 Bacterias ácido lácticas

3.1.2.1 caracterización macroscópica

La caracterización se basó en las técnicas básicas de microbiología basado en Bergeys 1984.

Tabla 4 Caracterización macroscópica de BAL

Cepa	ITOLIV024	ITOLIV025	ITOLIV026	ITOLIV027	ITOLIV028
------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Tamaño	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño
Color	Blanco	Blanco	blanco	Blanco	Blanco
Forma	Irregular	Circular	Circular	Irregular	Circular
Borde	Ondulado	Entero	Entero	Ondulado	Entero
Elevación	Umbonada	Convexa	Convexa	Convexa	Plana
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Aspecto	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
Luz transmitida	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Imagen					

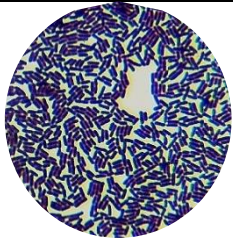
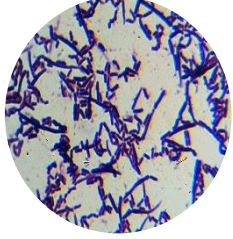
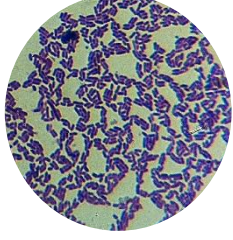
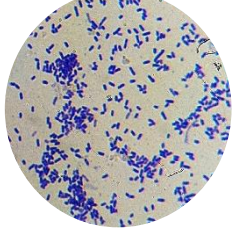
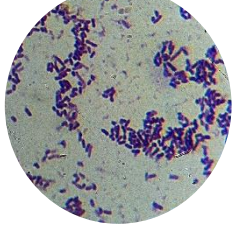
Se realizó una caracterización morfológica de cada una de las cepas de bacterias ácido-lácticas seleccionadas en agar Man Rogose and Sharpe (MRS), en base al tamaño, color, forma, borde, elevación, superficie, consistencia, aspecto, luz transmitida y luz reflejada, esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento a 30° C. Se observa que una característica común en las cepas es su superficie lisa, consistencia cremosa, aspecto húmedo, luz transmitida opaca y luz reflejada brillante.

3.1.2.2 caracterización microscópica

Esta técnica de microbiología se basó en Bergeys 1984.

Tabla 5 Tinción de Gram para BAL

Cepa	Tinción de Gram
------	-----------------

ITOLIV024	
ITOLIV025	
ITOLIV026	
ITOLIV027	
ITOLIV028	

Se realizo una caracterización microscópica usando la tinción de Gram, se puede observar que en su mayoría son bacilos, pero la ITOLIV027 muestra la forma de cocos

3.1.2.3 Pruebas bioquímicas

Se realizaron las pruebas propuestas en el manual de microbiología Bergeys 1984.

Tabla 6 Crecimiento de bacterias ácido lácticas en medios específicos para determinar género

Cepa	Catalasa	NO ₃	LBS	MSE	M5	M17	ELLIKER	LITMUS MILK	MRS	
									CO ₂	Crecimiento
ITOLIV0 24	-	-	+	-	Homoláctica	+	+	Cuajada ácida	-	+
ITOLIV0 25	-	-	+	+	Homoláctica	+	+	Acidificación	-	+
ITOLIV0 26	-	-	+	+	Homoláctica	+	+	Acidificación	-	+
ITOLIV0 27	-	-	+	+	Heteroláctica	+	+	Acidificación	+	+
ITOLIV0 28	-	+	+	+	Homoláctica	-	+	Cuajada ácida	-	+

En la tabla se pueden apreciar que para la prueba de catalasa todas las cepas dieron negativo lo que indica que ninguna posee la enzima catalasa, en cuanto a la prueba de nitrato solo la cepa ITOLIV028 mostro tener la capacidad de reducir nitratos a nitritos, para los medios LBS, ELLIKER y MRS se mostró un resultado positivo en todas las cepas, las variaciones se encuentran en las cepas ITOLIV024 la cual tuvo nulo crecimiento en agar MSE, y la cepa ITOLIV028 que no tuvo desarrollo en agar M17. En cuanto al medio M5 solo la cepa ITOLIV027 mostro que produce ácido láctico, etanol y CO₂ a partir de la fermentación de la lactosa, caso contrario a las demás cepas homofermentativas que solo producen ácido láctico.

Finalmente, solo la cepa ITOLIV028 tuvo un efecto negativo para el medio M17.

Tabla 7 Fermentación de azúcares de bacterias ácido lácticas

Azúcares	ITOLIV024	ITOLIV025	ITOLIV026	ITOLIV027	ITOLIV028
----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Fructosa	+	+	+	+	D
Sacarosa	+	+	+	+	D
Glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	D
Inulina	D	D	D	D	D
Maltosa	D	D	+	+	D

En la tabla se puede apreciar que la gran mayoría de las bacterias fueron capaces de fermentar los diferentes monosacáridos utilizados, sola para la inulina todas mostraron un resultado débil.

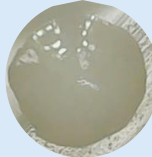
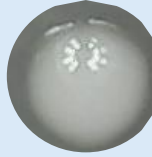
3.1.3 Bacterias ácido acéticas

3.1.3.1 Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica se realizó basados en Bergeys 1984.

Tabla 8 Caracterización macroscópica de bacterias ácido acéticas

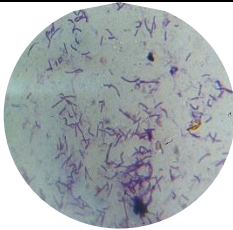
Cepa	ITOAIV0 33	ITOAIV0 34	ITOAIV0 35	ITOAIV0 36	ITOAIV0 37	ITOAIV0 38	ITOAIV0 39
Tamaño	Pequeño	Grande	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño
Color	Blanca	Amarillo	Blanca	Blanca	Blanca	Blanca	Blanca
Forma	Irregular	Irregular	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Circular
Borde	Entero	Ondulado	Ondulado	Entero	Ondulado	Entero	Entero
Elevación	Convexo	Umbonado	Umbonado	Convexo	Umbonado	Convexo	Convexo
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa

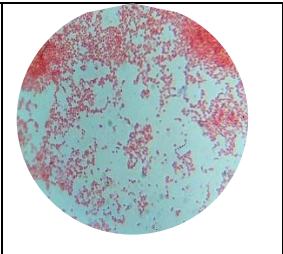
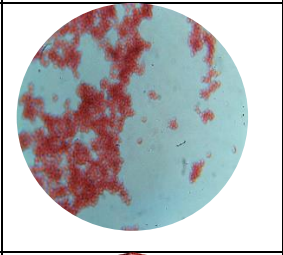
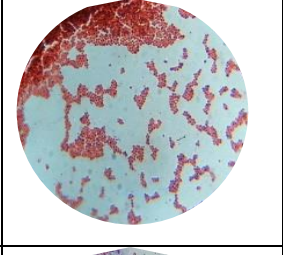
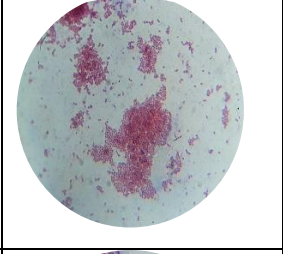
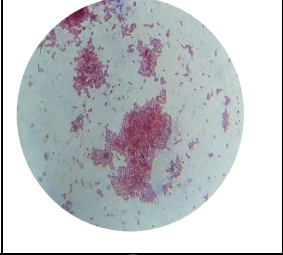
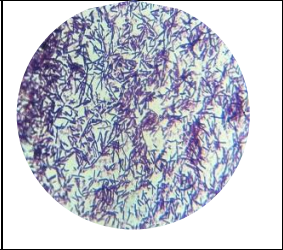
Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Aspecto	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Luz transmitida	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Transparente
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Imagen							

Se realizó una caracterización morfológica de cada una de las cepas de bacterias ácido acéticas seleccionadas en agar glucosa, extracto de levadura y carbonato de calcio (GYC), en base al tamaño, color, forma, borde, elevación, superficie, consistencia, aspecto, luz transmitida y luz reflejada, esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento a 30° C. Se observa que una característica común en las cepas es su superficie lisa, consistencia cremosa, aspecto húmedo y luz reflejada brillante.

3.1.3.2 Caracterización microscópica

Tabla 9 Tinción de Gram para bacterias ácido-acéticas

Cepa	Tinción de Gram
ITOAV033	

ITOAIV034	
ITOAIV035	
ITOAIV036	
ITOAIV037	
ITOAIV038	
ITOAIV039	

Se realizó una caracterización microscópica usando la tinción de Gram, se puede observar que el resultado obtenido para las cepas ITOAIV033 y ITOAIV039 es positivo proba

3.1.3.3 Pruebas bioquímicas

Tabla 10 Fermentación de azúcares para bacterias ácido-acéticas

Cepa	ITOAIV033	ITOAIV034	ITOAIV035	ITOAIV036	ITOAIV037	ITOAIV038	ITOAIV039
Xilosa	D	+	+	D	+	D	+
Fructosa	D	+	+	+	+	D	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	D	+
Glucosa	D	+	+	+	+	D	+
Manitol	D	+	D	D	+	D	D
Manosa	D	+	+	D	+	D	+
Etanol	D	+	+	D	+	D	+
Glicerol	D	+	D	D	+	D	+
Propanol	-	+	-	-	+	-	+

En la siguiente tabla podemos observar como la cepa ITOAIV034 e ITOAIV037 mostraron un resultado positivo a todos los azúcares y alcoholes con los cuales se realizó la prueba.

3.2 Caracterización genotípica

3.2.1 Levaduras

Tabla 11 Identificación molecular de cepas de levaduras

Cepa	Especie	Q covery (%)	E value	Per ident (%)	Accession
ITOYIV034	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0.0	100	OQ788296.1
ITOYIV035	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	1e-145	99.31	MT641217.1

ITOYIV036	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0.0	100	MH545914.1
ITOYIV037	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0.0	100	OR243746.1
ITOYIV038	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0.0	100	OR243746.1
ITOYIV039	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0.0	100	OQ788296.1
ITOYIV040	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	0.0	100	MH979683.1
ITOYIV041	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0.0	100	OR199907.1
ITOYIV042	<i>Candida parapsilosis</i>	22	6e-37	95.05	KM113960.1
ITOYIV043	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0	100	OP895157.1
ITOYIV044	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible	No disponible
ITOYIV045	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	0	100	MH979683.1
ITOYIV046	<i>Pichia kluyveri</i>	99	1e-153	86.61	MN268784.1

En la identificación genotípica para levaduras encontramos tres especies diferentes, de las cuales *Candida parapsilosis* fue la que más se encontró.

3.2.2 Bacterias ácido-lácticas

Tabla 12 Identificación molecular de cepas de bacterias ácido-lácticas

Cepa	Especie	Q covery (%)	E value	Per ident (%)	Accession
ITOLIV024	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100	0.0	99.93	MT613642.1
ITOLIV025	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	0.0	99.93	MT613661.1
ITOLIV026	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	100	0.0	100	OR335422.1
ITOLIV027	<i>Bacillus siamensis</i>	99	3e-121	73.10	OR3442273.1
ITOLIV028	<i>Levilactobacillus brevis</i>	100	0.0	99.22	MF662454.1

Para el caso de las bacterias ácido-lácticas se encontraron 3 géneros diferentes y 5 especies diferentes, todos con un porcentaje de cobertura arriba del 90%.

3.2.3 bacterias ácido acéticas

Tabla 13 Identificación molecular de cepas de bacterias ácido-acéticas

Cepa	Especie	Q coverty (%)	E value	Per ident (%)	accession
ITOAIV033	<i>Bacillus siamensis</i>	100	0.0	100	MT645306.1
ITOAIV034	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98	0.0	98.31	MN603648.1
ITOAIV035	<i>Aerococcus viridans</i>	100	0.0	100	CP046334.1
ITOAIV036	<i>Staphylococcus hominis</i>	100	0.0	97	ON063342.1
ITOAIV037	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100	0.0	99.86	MT545101.1
ITOAIV038	<i>Bacillus sp.</i>	100	0.0	92.02	MK459368.1
ITOAIV039	<i>Bacillus sp.</i>	40	1e-71	93.37	KJ175238.1

De las cepas de bacterias ácido-acéticas la mayoría tuvo un porcentaje de cobertura arriba de 90% exceptuando la ITOAIV039 que tuvo una cobertura del 40%.

3.3 Saponinas de *Agave convallis*

Tabla 14 Datos de muestra de *Agave convallis*

	Hoja	Piña
Peso húmedo	1000g	1300g
Peso seco	105.2g	500g
% Humedad	89.48%	80%

Después de haber secado las hojas y la piña de *Agave* se determinó el % de humedad el cual fue de 89.48 y 80 % respectivamente.

Tabla 15 Datos de extracto de *Agave convallis*

	Hoja	Piña cruda	Piña cocida
--	------	---------------	----------------

Peso de extracto	3.75g	5.71g	6.48g
Rendimiento	3.56%	3.81%	4.32%

El rendimiento mayor se encontró en la piña cocida con 4.32% en comparación con la hoja que fue menor con 3.56%.

Tabla 16 Prueba cualitativa para saponinas

Tiempos de duración de espuma				
	t (min)	peso (mg)	H ₂ O (mL)	altura (mm)
Extracto crudo	20	250	2.5	5

De acuerdo con Akinjogunla *et.al.* 2010. Si la espuma dura más de 10 min puede tomarse como un resultado positivo a saponinas, como se muestra en la tabla el extracto duro 20 min.

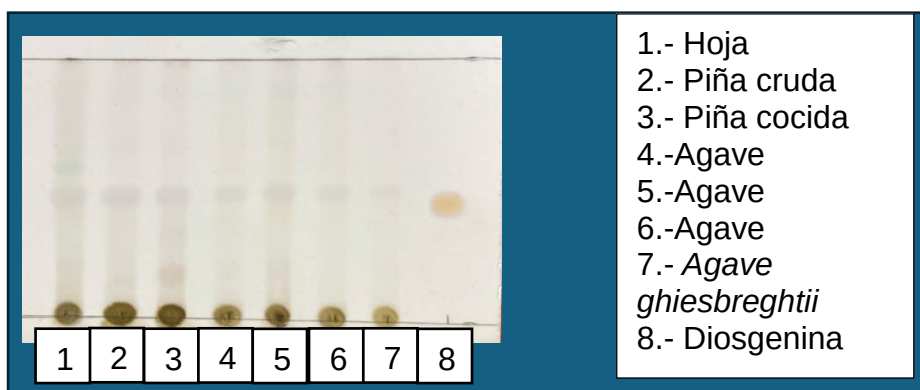
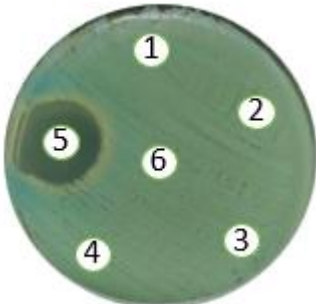


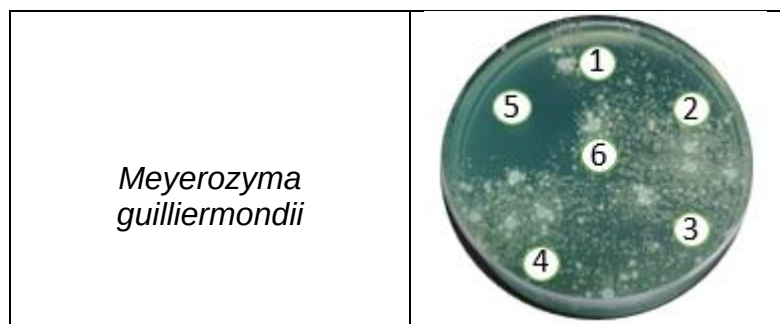
Figura 9 TLC de extractos de *Agave convallis*

En la siguiente figura se observa los extractos obtenidos, así como un estándar que fue diosgenina, se puede observar que hay una banda en cada uno de los extractos lo que indica presencia de saponinas.

3.4 Actividad antimicrobiana

Tabla 17 Resultados de actividad antimicrobiana

Especie	Resultado de inhibición
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Pichia kluyveri</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	



Se realizó la actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos en el número 1 se encuentra la concentración 2000µg/mL, en el número 2 la concentración 4000 µg/mL, número 3 la concentración 6000 µg/mL en el número 4 está el control negativo caldo YPD, en el número 5 se puso el control positivo Nistatina, el cual se observa es confiable debido a que inhibió por completo el crecimiento, para el número 6 se puso solo el solvente DMSO al 1.5% esto con la finalidad de comprobar que efectivamente no afecta el crecimiento de los microorganismos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se seleccionó una fábrica de mezcal artesanal ubicada en la población de San Pedro Teozacoalco (coordenadas 17.0175299, -97.2961261) del estado de Oaxaca. De la cual se obtuvo la muestra de mosto de *Agave convallis*.

Se aislaron, purificaron e identificaron las siguientes especies, levaduras: *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, bacterias ácido-lácticas: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Bacillus siamensis*, *Levilactobacillus brevis*, bacterias ácido-acéticas: *Bacillus siamensis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus hominis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus sp.*

Se obtuvo el extracto crudo etanólico de *Agave convallis*, mediante maceración se obtuvo un rendimiento de 3.56% para la hoja, 3.81% para la piña cruda y 4.32% para la piña cocida, Se identificó la presencia de saponinas esteroidales mediante pruebas cualitativas de Lieberman-Burchard, formación de espuma y cromatografía en capa fina (TLC), se usó Diosgenina como estándar lo que indicó que existe la presencia en los extractos obtenidos.

De la actividad antimicrobiana realizada a los diferentes microorganismos no mostraron una inhibición ante los extractos crudos de saponinas, esto puede deberse a dos factores el primero es debido a que son extractos crudos y no una saponina pura el efecto antimicrobiano no es medible, el segundo puede deberse a una actividad saponinasa es decir que la parte glucídica de las saponinas interactúa con las levaduras hace que no se tenga una lisis celular haciéndolo tolerante a las saponinas, lo que ayudaría a mejorar los procesos de fermentación de las bebidas de Agave.

Recomendaciones

Se recomienda seguir con la purificación y fraccionamiento de las saponinas de *Agave convallis* para poder determinar que saponinas se encuentran presentes y cuáles de ellas son las responsables de la actividad antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

Aïcha Menyar Ben Hamissa, Alessandra Lodi, Mongi Seffen, Elisabetta Finocchio, Rodolfo Botter, and Attilio Converti. 2010. Sorption of cd (ii) and pb (ii) from aqueous solutions onto agave americana fibers. Chemical Engineering Journal, 159(1):67–74.

Akinjogunla, O., Yah, C., Eghafona, N. O., & Ogbemudia, F. (2010). Antibacterial activity of *Nymphaea lotus* (Nymphaeaceae) leave extract against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from clinical samples. Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry, 9, 1064-1073.

Alcázar, E. M. (2016). Caracterización de saponinas de *Agave duranguensis* y *salmiana*, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces Marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*.. Tomado de: <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/421>

Arrizon, J., Fiore, C., Acosta, G., Romano, P., & Gschaedler, A. (2006). Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape

must yeasts in high sugar Agave tequilana and grape must fermentations. Antonie van Leeuwenhoek, 89(1), 181-189. doi:10.1007/s10482-005-9022-1

Brunetonm J, 2001, Farmacognosia fitoquímica. Plantas medicinales, zaragoza: Acribia.

Camacho-Campos, Conrado, Pérez-Hernández, Yunel, Valdivia-Ávila, Aymara, Rubio-Fontanills, Yasmay, & Fuentes-Alfonso, Leticia. (2020). Phytochemical, antibacterial and molluscicidal evaluation of leaf extracts of Agave spp. *Revista Cubana de Química*, 32(3), 390-405. Epub 03 de diciembre de 2020.

Canosa RM (2008) Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Tesis Doctorado en Química. Universidad de Santiago de Compostela. pp. 1-290

Carvajal TZ, Ramírez ZL, Ducurú MG, Valery CG, Méndez J, Rodríguez OM (2013). Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 33(1): 35-39.

Carrión JAV, García GCR (2010) Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica. Tesis en Bioquímica y Farmacéutica. Universidad de Cuenca. Ecuador. pp. 1-138.

Cervantes Dueñas Aleydis (20016). Presencia de saponinas en Agave spp. de México. *Bioz*, Revista electrónica de Biología, Universidad Autónoma de Zacatecas.

Cruz Luna, Aída Rubí, Vásquez López, Alfonso, Martínez Gutiérrez, Gabino Alberto (2022). HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DE Agave convallis EN OAXACA, MÉXICO. Contribución al Conocimiento Científico y Tecnológico en Oaxaca Año 6, Vol. 6, No. 6, P. 53-55.

Delgado-Lemus A, Torres I, Blancas J, Casas A (2014). Vulnerability and risk management of Agave Species in the Tehucán Valley, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10:2-15.

Díaz Puentes, Luz Nelly (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revision. *RETIRADO. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1 (2),32-55. [fecha de Consulta 26 de agosto de 2022]. ISSN: 1856-9161. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179214945004>

Espada DL, Ferrer SA, Padró RL, Arias RL, León DL (2020). *Dendropanax arboreus*: estudio fitoquímico de la savia del tronco. *Revista Cubana de Química* 32(1): 74 - 87

García Garza, Domingo (2019) *Mezcal. Un espíritu artesanal de clase mundial*. México: 1450 ediciones. P. 62-69.

Good-Ávila SV, Souza V, Gaut BS, Eguiarte LE (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(24):9124-9129.

Guclu-Ustundang O., Mazza G. (2007) Saponins: properties, applications, and processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 47: 231-258.

Hernández Mota, E. G. (2009). Análisis Metagenómico y fisicoquímico de mostos de mezcal tamaulipeco. Reynosa, Tamaulipas: Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

Hernández S., Rosa, & Lugo C., Eugenia C., & Villanueva, Socorro, & Díaz J., Lourdes (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. *e-Gnosis*, (3),0. [fecha de Consulta 25 de agosto de 2022]. ISSN. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000311>.

Jacqueline Eskander, Catherine Lavaud, and Dominique Harakat. Steroidal 2010. saponins from the leaves of *Agave macroacantha*. *Fitoterapia*, 81(5):371–374.

Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizon-Gaviño J., Herrera-Suarez T., Garcia-Mendoza A., Gschaedler-Mathis A. (2008) Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic no distilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research* 8: 1037-1052.

López AE (2008) Producción de bebida alcohólica de alta calidad. Tesis Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de las Américas, Puebla Cholula, México. pp. 1-51.

Martínez-Aguilar J. F., Peña-Alvarez A. (2009) Characterization of five typical agave plants used to produce mezcal through their simple lipid composition analysis by gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1933-1939.

Martinez-Martinez A (2001) Saponinas Esteroidales. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín 22 pp.

Mena Valdés Licet, Tamargo Santos Beatriz, Salas Olivet Eva, Plaza Paredes Luis Enrique, Blanco Hernández Yisel, Otero González Anselmo, Sierra González Gustavo, 2015, Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo), *Rev. Cubana Plant Med* vol.20 no.1 Ciudad de la Habana.

Monroy-González, Zurisadaí, & Martínez-Hernández, Aída. (2019). Identificación de cDNAs de *Agave tequilana* weber var. Azul similares a furostanol glicósido 26-o- β -glucosidasas. *Revista fitotecnica mexicana*, 42(4), 439-447. E pub 16 de octubre de 2020. Recuperado en 22 de abril de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000400439&lng=es&tlng=es.

Narváez-Zapata J. A., Sánchez-Teyer L. F. (2009) Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3: 185-191.

Núñez CE (2008) Extracciones con Soxhlet. (<http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>).

Ramírez LS, Marín CD (2009) Metodologías para evaluar in vitro la actividad bacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica* 15(42): 263-268. <https://doi.org/10.22517/23447214.2687>.

Rojas AL, Jaramillo JC, Barros LM (2015) Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios. Universidad Técnica de Machala. Ecuador. pp. 1-106

Oleszek W. A. (2002) Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* 967: 147-162.

Osorio-Cadavid, E., Ramírez, M., Andrés López, W., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XI (1), 125-131.

Osumi M. (2012) Visualization of yeast cell by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61 (6): 343-365.

Pamplona, J., Enciclopedia de las Plantas Medicinales., Tomo II., 2ª. ed., Buenos Aires – Argentina., Editorial Safeliz.,2006., pp. 558, 694-695, 718.

Porras-Ramírez, es, Sosa-Marcos, y., Palma-Cruz, f., & Cisneros, A. (2016). Fenotipado de la diversidad genética de especies silvestres de agave que coexisten en la misma región espacial. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44 (2), 640–648.

Sánchez GE, Castillo HSL, García PP (2016). Actividad antimicrobiana. Investigación en plantas de importancia médica. Omnisciente. Barcelona, España.

Sidana, J., Sharma, O., & Singh, B. 2016. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity [Saponinas de Agave: Química y bioactividad]. *Phytochemistry*.

Starr, G. D. (2021). A Reevaluation of the Agave kerchovei Complex (Asparagaceae/Agavoideae) Including Expanded Descriptions of Three Species. *Haseltonia*, 27(1), 60-72.

Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Kawahara, N., Goda, Y., ... & Ishibashi, M. (2004). New chlorogenin hexasaccharide isolated from Agave fourcroydes with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(14), 3841-3845.

Mac Donald, D., Valencia, E. F., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en Agaricus bisporus. *Biotempo*, 5, 3-36.

Vallejo Rosero Yeraldine, Correa Barrios, Luis, Gil Anaya Jorge (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica ISSN: 1012-3946, Revista de Química, Vol. 35: 2.

Vizaino Goyes Diego Javier 2021, Concentración de saponinas en hojas de cabuya negra (Agave americana Linneo) afectadas sanitariamente; en la parroquia Tulcán provincia del Carchi.

Yang C. R., Zhang Y., Jacob M. R., Khan S. I., Zhang Y. J., Li X. C. (2006) Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50 (5): 1710-1714.

Yang, Y., Laval, S., & Yu, B. (2014). Chemical synthesis of saponins [Síntesis química de las saponinas]. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 71, 137-226.

Zhang Y., Liu C., Qi Y., Li S., Wang J. (2013) Application of accelerated solvent extraction coupled with counter-current chromatography to extraction and online isolation of saponins with a broad range of polarity from *Panax ginseng*. *Separation and Purification Technology* 106: 82-89.