



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL METAGENOMA DEL POZOL

Karina Rosete-Viveros, Catalina Cárdenas, Carmen Wachter y Romina Rodríguez-Sanoja. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología. México, D.F., CP 04510, karina.rosete.viveros@comunidad.unam.mx, romina@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: pozol, metagenoma, biología molecular

Introducción. El pozol es una bebida fermentada de origen maya, que se elabora a partir de maíz nixtamalizado sujeto a una fermentación ácido láctica espontánea. Durante el proceso de nixtamalización el almidón presente en el sistema sufre una gelatinización parcial que dificulta la extracción del metagenoma por métodos convencionales. Trabajos previos habían logrado la obtención de ácidos nucleicos de diferentes microorganismos a partir de la obtención primero de los microorganismos presentes en la masa, sin embargo el método de extracción del metagenoma no debe ser selectivo hacia los organismos presentes. Así, el objetivo de este trabajo es establecer una metodología de obtención del metagenoma directamente del pozol, que no sea selectivo y que permita la obtención de altos rendimientos en la extracción a fin de obtener una muestra representativa para su uso en técnicas moleculares.

Metodología. Se probaron tres diferentes metodologías, la principal diferencia entre estas residió en la composición de la solución de extracción: a) 0,5% SDS, 200mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM EDTA (1); b) 1,5% SDS, 100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 500mM NaCl, 0,38% NaHSO₃ (2); c) 2%CTAB, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1,4M NaCl, 0,4% β-mercaptoetanol (2). Los extractos obtenidos fueron extraídos con fenol: cloroformo, la fase acuosa recuperada y el ADN precipitado con etanol. La calidad del ADN se evaluó en geles de agarosa (0,8%) y se cuantificó por su absorbancia a 260nm (3)

El metagenoma purificado a distintos tiempos de fermentación fue amplificado con los cebadores universales *pA* (fwd) y *16R1093* (rev) que amplifican un fragmento entre 1 y 1.1 Kpb del gen ribosomal 16S. Las condiciones utilizadas fueron: un paso desnaturante a 94°C/2 min, 30 ciclos (94°C/1min: 65°C/1:30min y 72°C/1min) con un paso de elongación final a 72°C por 7 min.

Resultados. El mejor rendimiento en la extracción y pureza del ADN del pozol se obtuvo con la extracción realizada con la solución b (Fig. 1A) obteniéndose un rendimiento promedio de 248 µg ADN/g pozol. Usando esta metodología se realizó la extracción del metagenoma del pozol a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 48, 72 horas; 7 y 12 días) (Fig. 1B). El ADN obtenido fue amplificado utilizando los primers indicados, los resultados pueden observarse en la Fig. 2. La secuenciación de los productos de amplificación mostró que entre los organismos predominantes se

encuentran, a las 48h, *Weisella* la cual ya había sido reportada con anterioridad (4); y a los 12 días de fermentación *Acetobacter*, este último no reportado con anterioridad seguramente debido a que no existen estudios del pozol que muestren la diversidad microbiana a tiempos tan largos de fermentación.

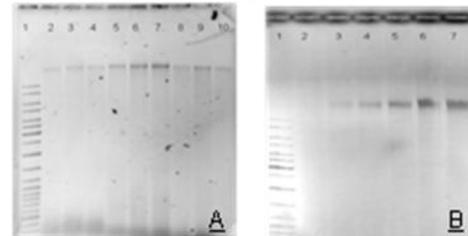


Fig. 1. Metagenoma del pozol. **A.** Extracción del ADN total con las 3 soluciones, Línea 1: MPM, L2-4: solución a, L 5-7: solución b; L 8-10: solución c. **B.** ADN obtenido a distintos tiempos de fermentación L1: MPM; L2:0h; L3:24h; L4:48h; L5:72h; L6:7 días; L7:2 días.

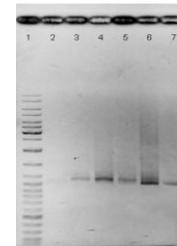


Fig. 2. Amplificación del fragmento del gen ribosomal 16S a partir del ADN obtenido a diferentes tiempos de fermentación. L1: MPM; L2:0h; L3:24h; L4:48h; L5:72h; L6:7d; L7:12 d.

Conclusiones. Se obtiene un mayor rendimiento al utilizar la solución de extracción con SDS al 1.5%, el CTAB no mejoro el rendimiento pese a lo descrito con anterioridad (4).

La amplificación del gen ribosomal 16S permite la identificación de *Weisella* a las 48h y *Acetobacter* a los 12 días como parte de los organismos predominantes.

Agradecimiento. A CONACYT por su apoyo con el donativo 49687-Z.

Bibliografía.

1. Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. (1991) *Nucl. Ac. Res.*, vol (19), 1349.
2. Ren, X., Zhu, X., Warndorff, M., Bucheli, P. & Shu, Q.,(2006). *Food Res. Int.* vol (39), 433-439
3. Stephenson F. H., (2003), Quantitation of nucleic acids, *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*, Hayhurst J., Elsevier Science, EEUU, 90-100.
4. Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. & Guyot, J.P.(1999).*Appl. Environ. Microbiol.* vol (65), 5464-5473.